

# Mecanismes implicats en la diferenciació de les cèl·lules progenitores endotelials durant el remodelat vascular pulmonar

Marta Díez Cuñado

**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.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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.tesisenred.net](http://www.tesisenred.net)) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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.tesisenxarxa.net](http://www.tesisenxarxa.net)) service 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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.

Universitat de Barcelona  
Departament de Medicina  
Facultat de Medicina

# Mecanismes implicats en la diferenciació de les cèl·lules progenitores endotelials durant el remodelat vascular pulmonar

Marta Díez Cuñado



**MECANISMES IMPLICATS EN LA DIFERENCIACIÓ DE LES  
CÈL·LULES PROGENITORES ENDOTELIALS DURANT EL  
REMODELAT VASCULAR PULMONAR**

Memòria presentada per

**MARTA DíEZ CUÑADO**

per optar al títol de Doctora en Biotecnologia

Treball realitzat sota la direcció del **Dr. Víctor I. Peinado Cabré** i del **Dr. Joan A. Barberà Mir**, en el laboratori de Malalties Respiratòries de l'IDIBAPS

Marta Díez Cuñado

Dr. Víctor I. Peinado Cabré  
Director

Dr. Joan A. Barberà Mir  
Director

Tesi inscrita en el programa de doctorat de Medicina  
Departament de Medicina, Facultat de Medicina

*Als meus pares  
i al meu germà*

## ***ABREVIACIONS***

MPOC	Malaltia pulmonar obstructiva crònica
HP	Hipertensió pulmonar
SMC	Cèl·lula muscular llisa
$\alpha$ -SMA	$\alpha$ actina de múscul llis
EC	Cèl·lula endotelial
NO	Òxid nítric
ET-1	Endotelina tipus 1
ET-2	Endotelina tipus 2
ET-3	Endotelina tipus 3
ETB	Receptor B de l'endotelina
ETA	Receptor A de l'endotelina
eNOS	Òxid nítric sintasa endotelial
EPC	Cèl·lula progenitora endotelial
VEGF	Factor de creixement derivat de l'endoteli vascular
VEGFR2	Receptor tipus 2 del factor de creixement de l'endoteli vascular
LDL	Lipoproteïna oxidada de baixa densitat
G-CSF	Factor estimulador de colònies de granulòcits
SDF-1 o CXCL12	Factor tipus 1 derivat de l'estroma
CXCR4	Receptor del factor tipus 1 derivat de l'estroma
MCP-1 o CCL2	Proteïna quimioattractant de monòcits 1
CCR2	Receptor de la proteïna quimioattractant de monòcits 1
PECAM o CD31	Molècula d'adhesió de cèl·lules endotelials i plaquetes
EnMT	Transició de cèl·lula endotelial a cèl·lula mesenquimal

EMT	Transició de cèl·lula epitelial a cèl·lula mesenquimal
Tie-1	Receptor d'angiopoietina tipus 1
Tie-2	Receptor d'angiopoietina tipus 2
FVIII	Factor VIII de coagulació
bHLH	Proteïnes hèlix-loop-hèlix
DNA	Àcid desoxirribonucleic
FGF-2	Factor de creixement de fibroblasts tipus 2
EGF	Factor de creixement epitelial
HGF	Factor de creixement d'hepatòcits
TGF $\beta$	Factor transformant de creixement $\beta$
TGF $\beta$ -1	Factor transformant de creixement $\beta$ tipus 1
TGF $\beta$ RI o ALK	Receptor tipus 1 del factor transformant de creixement $\beta$
Erk	Proteïna cinasa reguladora de senyals extracel·lulars
MAPK	Proteïnes cinasa activada per mitògens
ILK	Cinasa lligada a integrines
PI3K	Fosfoinositol 3 cinasa
GSK-3 $\beta$	Glicogen sintasa cinasa 3 $\beta$
acLDL-DiI	Lipoproteïna acetilada de baixa densitat conjugada amb perclorat de 1,1-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil- indocarbocianina
UEA	Aglutinina <i>Ulex europeaus</i>
RNA	Àcid ribonucleic
PA	Artèria pulmonar
vWF	Factor de Von Willebrand
RT-PCR	Reacció en cadena de la polimerasa en temps real

FITC	Isotiocianat de fluoresceïna
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
FACs	Citometria de flux
PBS	Tampó salí fosfat
FBS	Sèrum fetal boví
PDGF-BB	Factor de creixement derivat de plaquetes BB
CM	Medi condicionat
siRNA	Petit àcid ribonucleic d'interferència

# *Índex*



## INTRODUCCIÓ

1. Malaltia pulmonar obstructiva crònica i hipertensió pulmonar: Marc conceptual.....	1
2. Remodelat vascular en la malaltia pulmonar obstructiva.....	2
2.1 Caracterització.....	2
2.2 Estímuls potencials del remodelat vascular en la MPOC.....	3
2.3 Etiopatogènia del remodelat vascular en la MPOC: Disfunció endotelial.....	4
3. Cèl·lules progenitores endotelials derivades de medul·la òssia.....	6
3.1 Diferenciació de les cèl·lules mare derivades de la medul·la òssia.....	7
3.1.1 Possibles mecanismes de diferenciació.....	8
3.1.2 Nínxol de les cèl·lules mare.....	10
3.2 Identificació de les cèl·lules progenitores endotelials.....	11
3.3 Mobilització de les cèl·lules progenitores endotelials des de la medul·la òssia a la circulació.....	12
3.4 Reclutament i incorporació de les cèl·lules progenitores endotelials.....	14
3.5 Aplicació de cèl·lules progenitores endotelials com a teràpia per la hipertensió pulmonar.....	16
3.5.1 Estudis en models animals.....	16
3.5.2 Estudis clínics.....	17
3.6 Cèl·lules progenitores endotelials: contribuint al remodelat vascular.....	18

4. Transició de la cèl·lula endotelial a la cèl·lula muscular llisa:	
Implicacions en el remodelat vascular.....	21
4.1. Regulació transcripcional .....	24
4.1.1 Família Snail .....	24
4.1.2 Família ZEB .....	25
4.1.3 Família Helix-loop-helix .....	26
4.2 Factors iniciadors d'EMT .....	26
4.2.1 Factor transformant de creixement $\beta$ -1 .....	26
4.2.2 Endotelina-1 .....	29
<b>HIPÒTESI</b> .....	31
<b>OBJECTIUS</b> .....	33
<b>RESULTATS</b> .....	35
1. <b>Primer treball.</b> "Plasticity of CD133+ cells: Role in pulmonary vascular remodeling" .....	37
1.1. Resum de resultats del primer treball .....	39
2. <b>Segon treball.</b> "Endothelial progenitor cells undergo an endothelial-to-mesenchymal transition-like process mediated by TGF $\beta$ RI" .....	43
2.1. Resum de resultats del segon treball .....	45
<b>DISCUSSIÓ</b> .....	51
<b>CONCLUSIONS</b> .....	59
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	61
<b>AGRAÏMENTS</b> .....	75

# *Introducció*

## **1. Malaltia pulmonar obstructiva crònica i hipertensió pulmonar: Marc conceptual**

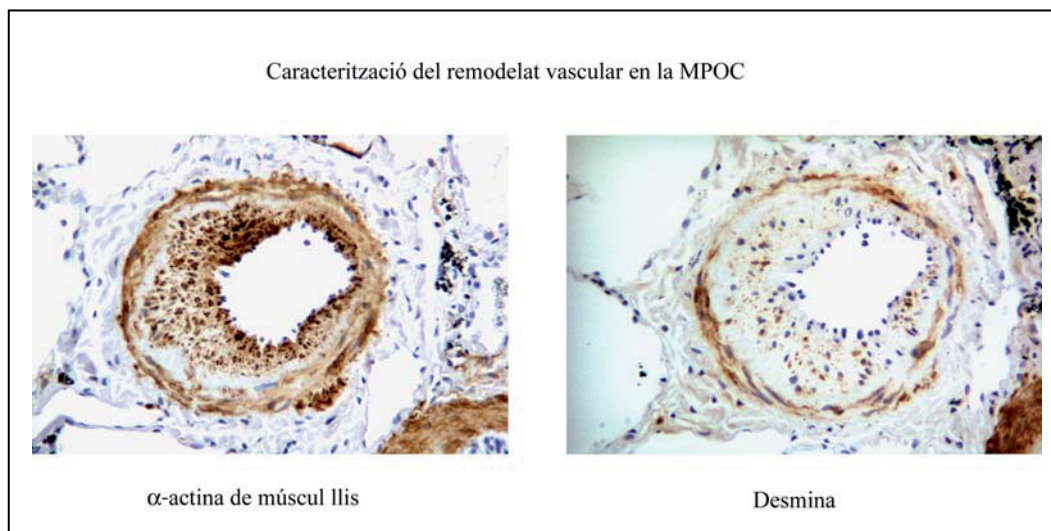
La malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC) és un procés de gran prevalença, amb morbiditat i mortalitat associades molt importants. Actualment, la MPOC representa la quarta causa de mort en el món (Pauwels et al, 2001). La malaltia es caracteritza per la limitació progressiva i poc reversible del flux aeri, associada a una resposta inflamatòria anormal del pulmó com a conseqüència fonamentalment de l'exposició al fum de tabac (Barberà et al, 2001; Pauwels et al, 2001). La limitació al flux aeri ve condicionada sobretot per les alteracions de la via aèria perifèrica i la destrucció del parènquima pulmonar, tot i que les alteracions en l'estructura dels vasos sanguinis pulmonars també representen un component important en el desenvolupament de la malaltia (Liebow, 1959).

La hipertensió pulmonar (HP) és una complicació freqüent de la MPOC, que constitueix un factor predictiu de deteriorament clínic i s'associa amb una menor taxa de supervivència (Kessler et al, 1999; Weitzenblum et al, 1981). La HP ve definida com l'augment de la pressió mitjana de la artèria pulmonar amb valors superiors a 25 mmHg en repòs i a 30 mmHg durant l'exercici (Simonneau et al, 2009). Actualment, el remodelat vascular pulmonar, denominació que s'aplica al conjunt de canvis estructurals pels quals es produeix una reducció del calibre de la llum de les artèries pulmonars, es considera la principal causa de HP en la MPOC. Existeixen nombrosos estudis, no només en el marc de la MPOC, dirigits a millorar la caracterització d'aquest procés i el coneixement de la seva fisiopatologia (Galie et al, 2004; Tuder et al, 2007).

## **2. Remodelat vascular en la malaltia pulmonar obstructiva crònica**

### 2.1 Caracterització

Els canvis morfològics que pateixen les artèries pulmonars en la MPOC consisteixen en l'engruiximent de la capa íntima de les artèries musculars, que condiciona un estretament de la llum vascular, i la muscularització de les arterioles (Galie et al, 2004; Wilkinson et al, 1988b; Wright et al, 1992). Aquests canvis podrien explicar l'increment irreversible de la resistència vascular pulmonar. La majoria de les cèl·lules que proliferen a la íntima hiperplàsica de les artèries pulmonars són cèl·lules musculars llises (SMC), tal i com mostra el marcatge positiu per l'actina de múscul llis ( $\alpha$ -SMA) (Santos et al, 2002). Anàlisis comparatius de les seccions seriades mostren que algunes SMC de la íntima no expressen filaments de desmina, mentre que totes elles expressen filaments de  $\alpha$ -SMA (Figura 1).



**Figura 1.** Seccions transversals seriades d'artèries pulmonars de pacients amb MPOC, positives per  $\alpha$ -actina de múscul llis i desmina mitjançant immunohistoquímica. Figura adaptada de Barberà et al, 2003

El patró d'expressió d'aquests dos filaments intermediaris permet discriminar entre dos fenotips diferents de SMC, el "fenotip sintètic" i el "fenotip contràctil" observat en les cèl·lules madures. Per tant, les SMC positives per  $\alpha$ -SMA i negatives per desmina

representen una subpoblació menys diferenciada de SMC, que posseeixen capacitat sintètica i participen en un procés actiu de remodelat vascular (Santos et al, 2002).

També s'ha descrit que l'engruiximent de la capa íntima es produeix pel dipòsit de fibres elàstiques i de col·lagen (Santos et al, 2002).

Finalment, és important destacar que els canvis estructurals de les artèries a la MPOC són poc o gens reversibles, tot i el cessament de l'hàbit tabàquic.

## 2.2 Estímuls potencials del remodelat vascular en la MPOC

Clàssicament, s'accepta que el remodelat vascular pulmonar associat a la MPOC es dona en les fases avançades de la malaltia com a conseqüència d'una vasoconstricció pulmonar hipòxica persistent. Aquest concepte es basa en la similitud que tenen els canvis estructurals dels vasos pulmonars observats en els estadis més avançats de la MPOC amb els que s'observen en persones que viuen en un ambient hipòxic per l'elevada altitud (Heath et al, 1990), i en models animals exposats a hipòxia crònica (Hislop and Reid, 1976). Tot i així, la presència de remodelat vascular en pacients amb MPOC moderada, sense hipòxia, i en fumadors amb funció pulmonar normal (Barberà et al, 1994; Peinado et al, 1998) suggereix l'existència d'una altra via patogènica causada pels productes derivats del fum de tabac.

També existeixen proves que recolzen un mecanisme inflamatori com element que contribueix en la gènesi o en la progressió de la HP associada a la MPOC. Aquesta hipòtesi deriva d'estudis que demostren un increment en el nombre de cèl·lules inflamatòries que infiltren l'adventícia de les artèries pulmonars (Peinado et al, 1999). Tot i això, no està clar quin és el paper de les cèl·lules inflamatòries, però aquestes poden constituir una font important de citosines i factors de creixement que podrien fer diana en les EC i contribuir al desenvolupament de les alteracions estructurals i

funcionals de la paret del vasos. Aquesta hipòtesi és consistent amb el fet de que el nombre de cèl·lules inflamatòries es correlaciona de forma inversa amb la funció endotelial i directament amb el gruix de la paret (Peinado et al, 1999). També és important remarcar que la inflamació present als pulmons dels pacients amb MPOC és un procés poc reversible tot i el cessament de l'hàbit tabàquic.

### 2.3 Etiopatogènia del remodelat vascular en la MPOC: Disfunció endotelial

Les cèl·lules endotelials (EC) juguen un paper crucial en la regulació de la homeòstasi vascular (Furchgott and Zawadzki, 1980). L'endoteli pulmonar contribueix a reduir el to vascular mitjançant l'alliberació d'agents vasodilatadors, com l'òxid nítric (NO) i la prostaciclina, i vasoconstrictors, com l'endotelina-1 (ET-1) o l'angiotensina. La disfunció endotelial s'entén com un desequilibri de la síntesi o de l'alliberament d'aquests agents. Així, Giaid et al. van demostrar la reducció de l'expressió de l'enzim òxid nítric sintasa endotelial (eNOS) i l'increment en l'expressió de ET-1 en les artèries pulmonars de pacients amb HP (Giaid et al, 1993; Giaid and Saleh, 1995). A més, molts d'aquests mediadors, com és el cas de la ET-1 i l'angiotensina, també tenen un efecte sobre la proliferació de les SMC i l'alteració de la seva síntesi pot facilitar el desenvolupament de la hipertròfia vascular (Levin, 1995; Moncada and Higgs, 1993).

Com s'ha comentat anteriorment, en les malalties respiratòries és habitual trobar canvis estructurals que afecten a la capa íntima de les artèries pulmonars. Això ha portat a investigar la funció endotelial en les artèries de pacients amb MPOC. Al 1991, Dinh-Xuan et al. van demostrar que l'endoteli de les artèries pulmonars de pacients amb MPOC en estadis avançats era disfuncionant (Dinh-Xuan et al, 1991). Així mateix, estudis efectuats per Peinado et al. van posar de manifest que la disfunció endotelial pulmonar en la MPOC podia presentar-se fins i tot en les fases més incipients de la

malaltia, ja que es va observar una menor relaxació induïda per vasodilatadors dependents de l'endoteli en les artèries pulmonars de pacients amb MPOC moderada (Peinado et al, 1998). Per una altra banda, l'exposició activa i passiva al fum de tabac s'associa a alteracions de la vasodilatació dependent de l'endoteli en artèries coronàries i sistèmiques (Celermajer et al, 1996; Zeiher et al, 1995). Tot això junt amb el fet que el fum de tabac és la principal causa de la MPOC i que productes circulants derivats d'aquest tenen la capacitat de lesionar l'endoteli planteja la següent seqüència fisiopatològica: el fum de tabac pot provocar disfunció endotelial pulmonar, i com a conseqüència d'aquesta, promoure el procés de remodelat dels vasos pulmonars en les fases inicials de la MPOC. Per tant, en pacients amb HP els tractaments adreçats a corregir la disfunció endotelial, com els prostanoids, antagonistes de ET-1 i inhibidors de fosfodiesterasa-5, poden revertir la progressió de la malaltia. En el cas de la HP associada a la MPOC, el fet que no sigui la vasoconstricció hipòxica sinó els productes derivats del fum de tabac els causants de la lesió endotelial obre un nou escenari en el tractament d'aquesta malaltia. Repoblar la circulació pulmonar amb EC funcionals a partir de cèl·lules mare derivades de medul·la òssia és una idea molt atractiva que permetria estendre l'ús clínic d'aquestes cèl·lules i ajudaria a entendre la patobiologia de la reparació tissular, oferint nous tractaments per la regeneració pulmonar en la MPOC.



### **3. Cèl·lules progenitores endotelials derivades de medul·la òssia**

En els últims anys s'ha plantejat la hipòtesi que existeix un programa de manteniment en el pulmó adult (Voelkel and Taraseviciene-Stewart, 2005). Normalment, el pulmó s'enfronta a agressions externes, com partícules inhalades, gasos tòxics i microorganismes, i la seva defensa depèn de mecanismes autoimmunes i d'un sistema eficient que s'encarregui d'eliminar i substituir les cèl·lules apoptòtiques. Les cèl·lules mare poden jugar un paper molt important en l'homeòstasi del pulmó, ja que aquestes posseeixen capacitat per autoreplicar-se i diferenciar-se a les cèl·lules que componen la seva estructura. Existeixen evidències que indiquen que cèl·lules progenitores endotelials (EPC) derivades de medul·la òssia es mobilitzen i s'alliberen a la circulació reclutant-se en el pulmó com a resposta a la lesió tissular, contribuint eventualment al programa de manteniment d'aquest òrgan.

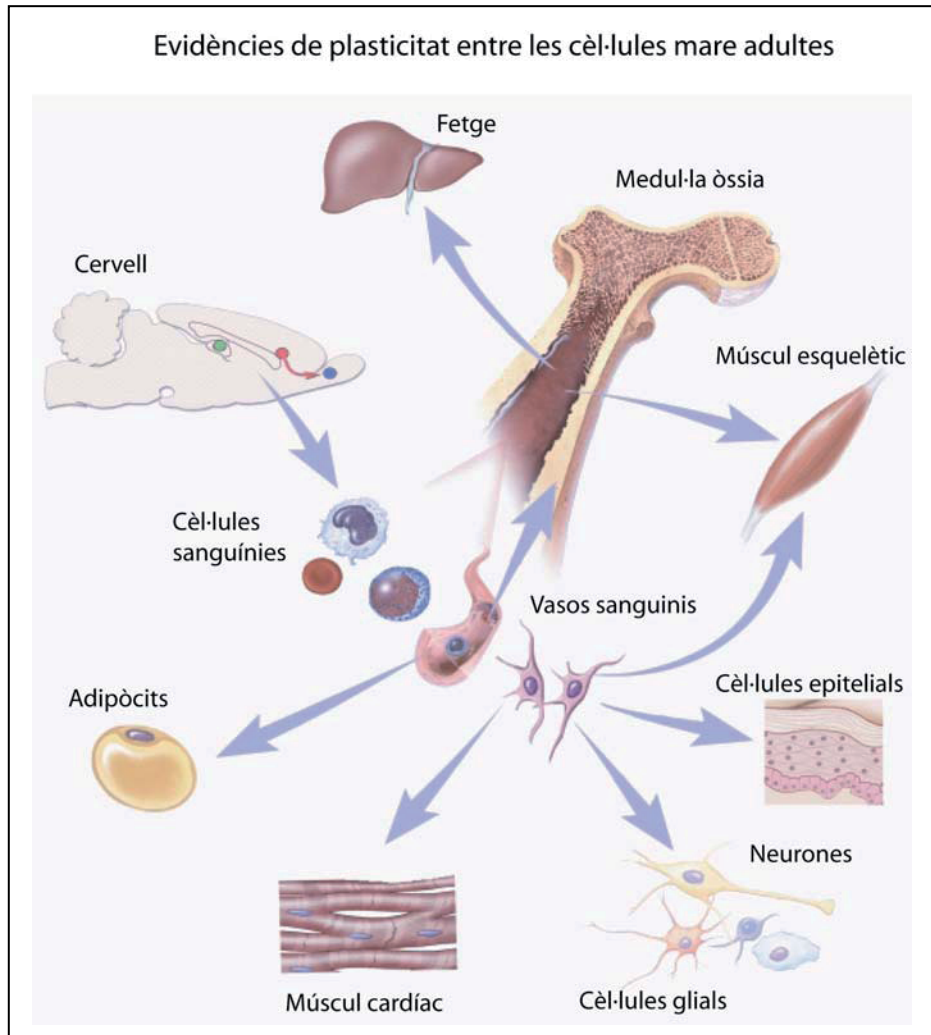
Tot i que no hi ha dubte del paper que poden jugar les EPC en la reparació tissular, gràcies al seu potencial de diferenciació cap a EC, aquestes també poden participar en la progressió o manteniment de lesions preexistents (Sata, 2003).

Al 1997, el grup del Dr. Asahara va aïllar per primera vegada EPC a partir de sang perifèrica humana, basant-se en l'expressió del marcador CD34 i d'altres marcadors endotelials. Aquest estudi va demostrar que les cèl·lules hematopoiètiques es diferenciaven a EC *in vitro* i *in vivo*, i va suggerir la presència de l'hemangioblast, un precursor comú de cèl·lules hematopoiètiques i endotelials, a la sang (Asahara et al, 1997). Aquest estudi també va demostrar la incorporació de les EPC als llocs actius d'angiogènesi en diferents models animals d'isquèmia.

### 3.1 Diferenciació de les cèl·lules mare derivades de la medul·la òssia

Al llarg dels últims anys molts estudis han evidenciat la plasticitat de les cèl·lules derivades de la medul·la òssia. La plasticitat es defineix com l'habilitat que té una cèl·lula mare adulta d'un teixit per generar tipus cel·lulars especialitzats d'un altre teixit. La medul·la òssia conté cèl·lules mare hematopoiètiques, EPC, cèl·lules mare mesenquimals i un tipus de cèl·lules mare adultes multipotents. Aquestes cèl·lules tenen capacitat d'autorenovació, característica fonamental de les cèl·lules mare, i estudis *in vivo* han demostrat que també poden diferenciar-se a hepatòcits, cardiomiòcits, miòcits de múscul esquelètic, neurones, cèl·lules del ronyó, del pàncrees, de la pell, del tracte gastrointestinal i del pulmó com a resposta a la lesió tissular (Alison et al, 2000; Brazelton et al, 2000; Ferrari et al, 1998; Orlic et al, 2001; Poulosom et al, 2001). En el pulmó, existeixen evidències que demostren la capacitat de les cèl·lules progenitores derivades de la medul·la òssia per diferenciar-se a diferents models cel·lulars, com els fibroblasts, cèl·lules epitelials i pneumòcits tipus I i II (Kotton et al, 2001; Krause et al, 2001; Rojas et al, 2005).

La incubació *in vitro* amb diferents factors de creixement, l'adhesió a diferents substrats i el contacte amb la matriu extracel·lular o diferents tipus cel·lulars també influeixen en la diferenciació de les cèl·lules progenitores. Per exemple, s'ha demostrat que un tipus de cèl·lules progenitores derivades de medul·la òssia es poden diferenciar cap a un llinatge endotelial afegint el factor de creixement de l'endoteli vascular (VEGF) al medi, mentre que un altre amb un medi de cultiu amb sèrum fetal de vedell indueix la diferenciació cap a osteoblasts, condrocits i adipòcits (Reyes et al, 2002) (Figura 2).



**Figura 2.** Evidències de plasticitat entre les cèl·lules mare adultes. Les cèl·lules mare adultes poden assumir característiques de cèl·lules de la mateixa capa germinal o bé de diferents capes germinals. Per exemple, alguns estudis han demostrat que les cèl·lules mare derivades de la medul·la òssia, que deriven del mesoderm, es poden diferenciar a altres teixits derivats també del mesoderm, com el múscul esquelètic, el múscul cardíac o el fetge, o alternativament es poden diferenciar a teixits que deriven de l'ectoderm, com el teixit neural. I recíprocament, les línies de cèl·lules mare neurals també es poden diferenciar donant lloc a cèl·lules hematopoiètiques.

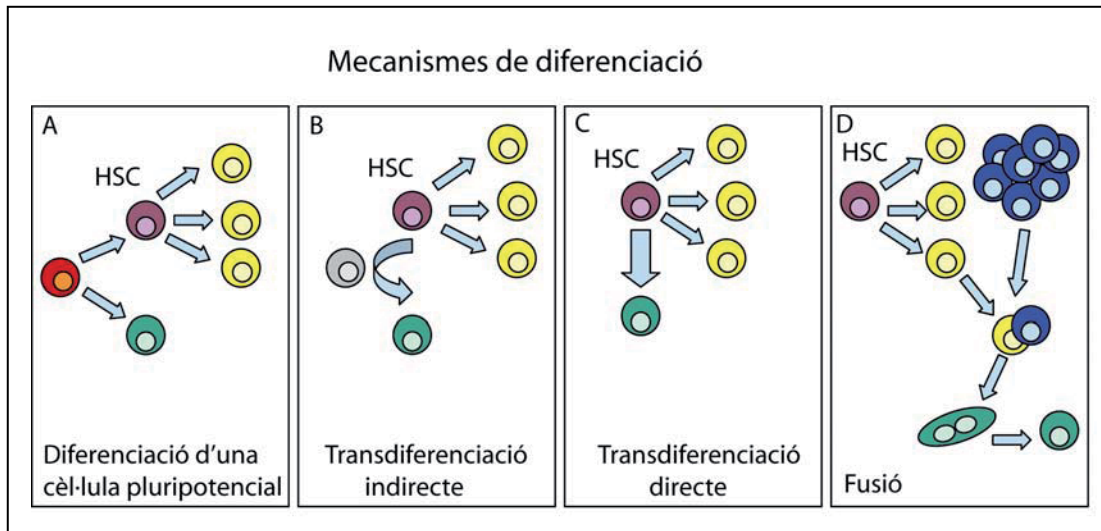
### 3.1.1 Possibles mecanismes de diferenciació

Actualment, encara no es coneix amb exactitud si les cèl·lules progenitores derivades de medul·la òssia passen a ser cèl·lules específiques de teixit mitjançant un procés de diferenciació intrínsec o de fusió amb una cèl·lula madura. La diferenciació cel·lular és un procés altament regulat que comporta importants canvis en el patró d'expressió gènica i implica que una cèl·lula no especialitzada (com és el cas de les cèl·lules mare)

adquireixi una nova morfologia, estructures especialitzades i realitzi certes funcions de cèl·lula especialitzada. Un dels mecanismes pels quals les cèl·lules de medul·la òssia es podrien diferenciar als diferents tipus cel·lulars podria ser que aquestes incloguin una població de cèl·lules mare altament pluripotents que no estan compromeses a diferenciar-se a cèl·lules sanguínies i tinguin habilitat per diferenciar-se a tots els tipus cel·lulars que esdevenen de les tres capes germinals (mesoderm, endoderm i ectoderm). Una altra possibilitat és que aquestes cèl·lules compromeses a un llinatge cel·lular específic provenguin de cèl·lules mare hematopoiètiques que es transdiferencien. La transdiferenciació es refereix a l'habilitat d'un tipus cel·lular compromès amb un llinatge determinat per canviar el patró d'expressió gènica pel d'un tipus cel·lular completament diferent. Aquest procés pot ser indirecte, mitjançant una desdiferenciació a un tipus cel·lular intermediari menys diferenciat, o bé directe.

Un mecanisme alternatiu de plasticitat és la fusió de cèl·lules progenitores amb cèl·lules no hematopoiètiques madures. El resultat és la formació de cèl·lules amb dos nuclis (heterocarions), o bé cèl·lules amb un nucli amb dotació cromosòmica poliploid resultat de la fusió nuclear. La idea de fusió cel·lular va aparèixer a partir d'estudis realitzats amb co-cultius de cèl·lules mare embrionàries i cèl·lules adultes somàtiques, tot i que en aquests estudis es va trobar que la fusió era un aconeteixement molt poc comú (Terada et al, 2002). En el cas de la fusió, la regeneració d'un teixit danyat a través de cèl·lules mare estaria limitada a la presència de cèl·lules madures amb capacitat funcional i estructural, i la regeneració d'un teixit mort no seria possible.

Així, conèixer els mecanismes precisos pels quals una cèl·lula progenitora adquireix les característiques d'una cèl·lula concreta en un teixit és important ja que condiciona o limita les futures estratègies terapèutiques (Figura 3).



**Figura 3.** Aquests models representen els mecanismes de diferenciació de les cèl·lules mare hematopoètiques derivades de la medul·la òssia (HSC) a altres fenotips no hematopoètics (verd). A) Aquest model pronostica que existeix un tipus cel·lular altament pluripotencial (vermell) que no està compromès a un llinatge hematopoètic i manté l'habilitat de diferenciar-se a diversos tipus cel·lulars. B) Mitjançant una transdiferenciació indirecte, les HSC pateixen un canvi en el patró d'expressió gènica adquirint el d'un tipus cel·lular alternatiu a través d'un tipus cel·lular intermediari no identificat (gris). C) Mitjançant una transdiferenciació directe, les HSC pateixen un canvi en el patró d'expressió gènica diferenciant-se directament a un tipus cel·lular alternatiu. D) En el cas que la fusió sigui el mecanisme pel qual les HSC adquireixen un fenotip no hematopoètic, una cèl·lula derivada de la medul·la òssia, com per exemple un macròfag (groc), es fusiona amb una cèl·lula no hematopoètica (blau) i el nucli de la cèl·lula derivada de la medul·la òssia adquireix el patró d'expressió gènica del tipus cel·lular no hematopoètic. Aquests models no són exclusius, i tots ells s'han descrit *in vivo*. Figura adaptada de Herzog et al, 2003.

### 3.1.2 Nínxol de les cèl·lules mare

S'anomena nínxol de les cèl·lules mare al microambient que interactua amb les cèl·lules mare i regula el destí cel·lular d'aquestes. Durant el desenvolupament, varis factors del nínxol actuen alterant l'expressió gènica de les cèl·lules mare induint la proliferació i la diferenciació d'aquestes. Dins del cos humà, aquest microambient manté les cèl·lules mare en un estat quiescent, però després d'un dany tissular aquest microambient activa senyals per promoure l'autorenovació i la diferenciació de les cèl·lules mare per formar nous teixits. Molts factors són importants alhora de regular les característiques d'aquestes cèl·lules dins del nínxol: les interaccions cèl·lula-cèl·lula entre les cèl·lules mare, així com les interaccions cèl·lula-cèl·lula entre les cèl·lules mare i les cèl·lules

diferenciades veïnes, les interaccions entre les cèl·lules mare i les molècules d'adhesió, components de la matriu extracel·lular, la tensió d'oxigen, els factors de creixement, les citosines i la naturalesa fisicoquímica de l'ambient, incloent el pH, la força iònica i els seus metabòlits també són importants (Scadden, 2006).

### 3.2 Identificació de les cèl·lules progenitores endotelials

Des de la identificació de les EPC a la circulació perifèrica, molts investigadors han utilitzat una gran varietat de mètodes amb l'objectiu d'identificar i aïllar aquesta població cel·lular (Asahara et al, 1999; Crosby et al, 2000; Gehling et al, 2000; Murayama et al, 2002; Peichev et al, 2000; Quirici et al, 2001; Reyes et al, 2002; Shi et al, 1998; Zeiher et al, 1995). Tot i així, actualment encara existeix una gran controvèrsia sobre l'origen i la identificació d'aquestes cèl·lules probablement degut al seu baix número i a la dificultat de mantenir-les en estat indiferenciat. Les EPC comprenen un grup de cèl·lules existents en varis estadis del desenvolupament, des de l'hemangioblast fins a les EC diferenciades. En la medul·la òssia és difícil distingir les EPC immadures de les cèl·lules mare hematopoiètiques ja que aquests dos tipus cel·lulars expressen marcadors de superfície similars, com el CD133, CD34 o VEGFR-2. A més, també existeixen subgrups de EPC circulants en un estadi de diferenciació més avançat que les residents a la medul·la òssia que expressen marcadors típics de EC, com CD31, VE-caderina i altres, tot i que amb una menor intensitat (Asahara et al, 1997). No existeix un marcador exclusiu per les EPC. Asahara et al. van utilitzar l'anticòs policlonal del domini intracel·lular del VEGFR-2 per demostrar que les EPC circulants CD34+, VEGFR-2+ formaven colònies capaces de captar LDL acetilat (Asahara et al, 1997). A continuació, les cèl·lules CD34+, VEGFR-2+, CD34- o VEGFR-2- es van injectar en ratolins, rates i conills que patien neovascularització degut a una isquèmia en les

extremitats posteriors i van comprovar que només les cèl·lules CD34+ i VEGFR-2+ s'incorporaven als vasos en certa forma demostrant que pertanyien al llinatge endotelial. Al 1997, Ying et al. va descriure un nou marcador de cèl·lules mare hematopoiètiques, l'AC133 (nom original de CD133), que també s'expressava en subgrups de EPC però no en EC madures. La funció d'aquesta proteïna no es coneix i la seva expressió es perd ràpidament tant en les cèl·lules progenitores hematopoiètiques com en les EPC en diferenciació (Yin et al, 1997). El número de cèl·lules CD133+ en sang perifèrica no mobilitzada és aproximadament d'un 0,002% del total de cèl·lules mononuclears, però després de la injecció del factor estimulador de colònies (G-CSF) aquest número pot augmentar entre 5 i 10 vegades (Peichev et al, 2000). Sembla ser que la pèrdua del marcador CD133 reflecteix el primer pas de la transformació de les EPC a les EC madures. Totes aquestes dades indiquen que el marcador CD133 és el millor marcador selectiu per identificar les EPC i que les cèl·lules circulants positives per CD34, VEGFR-2 i CD133 constitueixen fenotípicament i funcionalment una població diferent a les EC circulants que poden jugar un paper important en la vasculogènesi postnatal.

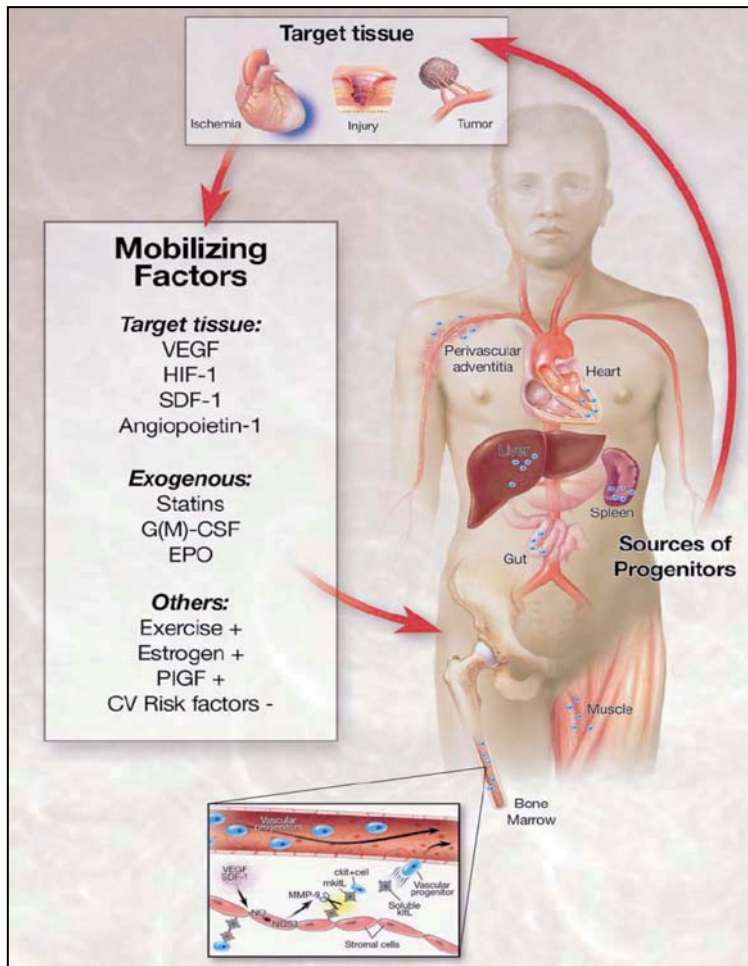
### 3.3 Mobilització de les cèl·lules progenitores endotelials des de la medul·la òssia a la circulació

Les cèl·lules mare que resideixen en nínxols dins la medul·la òssia es mantenen indiferenciades i en estat quiescent. La mobilització de les EPC des de la medul·la òssia al sistema circulatori és un procés complex regulat per diversos enzims, factors de creixement i receptors de superfície (Figura 4). Durant els últims anys, tots aquests mecanismes de mobilització han estat subjecte de nombrosos estudis. I tot i que s'han associat diversos factors amb un increment d'aquestes cèl·lules a la circulació, encara no es coneix amb claredat el paper que hi juguen i els efectes que produeixen a la medul·la

òssia. Després d'una lesió vascular es produeix un augment ràpid i significatiu dels nivells de EPC circulants fent palès el paper d'aquestes cèl·lules en la reparació vascular (Gill et al, 2001). Les vies implicades en aquest procés s'han estudiat sobretot en el context de la isquèmia tissular (Shintani et al, 2001; Takahashi et al, 1999). El factor de creixement angiogènic VEGF és un mediador clau en la mobilització de les EPC induïda per isquèmia en ratolins (Asahara et al, 1999) i en humans es troba sobreexpressat després d'un infart de miocardi junt amb la citosina SDF-1 (Pillariseti and Gupta, 2001; Shintani et al, 2001). A més, altres formes d'estrès fisiològic com l'exercici físic i el creixement tumoral també s'han associat a la mobilització de les EPC (Laufs et al, 2004). Pel contrari, s'ha investigat el número basal i la funció de les EPC circulants de pacients amb hipertensió arterial pulmonar i s'ha explorat la hipòtesis de que els pacients amb hipertensió siguin deficients de EPC circulants, el que contribuiria a la disfunció endotelial i la progressió de la malaltia (Diller et al, 2008; Junhui et al, 2008). En aquest sentit, els estudis realitzats per Tohsner et al. van demostrar que les EPC de pacients amb HP idiopàtica eren disfuncionants (Toshner et al, 2009). Aquests resultats concorden amb altres estudis que demostren una reducció dels nivells de EPC circulants en fumadors o en pacients amb MPOC severa (Kondo et al, 2004; Palange et al, 2006). Una possible explicació per aquestes observacions és que en pacients amb factors de lesió vascular persistent hi hagi una reducció de cèl·lules mare en els reservoris de la medul·la òssia, i com a conseqüència, una reducció del número de cèl·lules progenitores circulants, indicant una capacitat defectuosa per reparar teixits. D'altra banda, la reducció del número de cèl·lules progenitores circulants també pot ser conseqüència del segrest d'aquestes cèl·lules als òrgans lesionats. Altres factors de risc de malalties coronàries com la hipercolesterolèmia o la diabetis també afecten el número i l'activitat funcional d'aquestes cèl·lules tant en individus sans (Hill et al,



2003) com en pacients amb isquèmia cardíaca (Vasa et al, 2001). Tot i que aquests factors s'han relacionat amb una disminució de la mobilització de les EPC, encara no hi ha estudis conclouents.

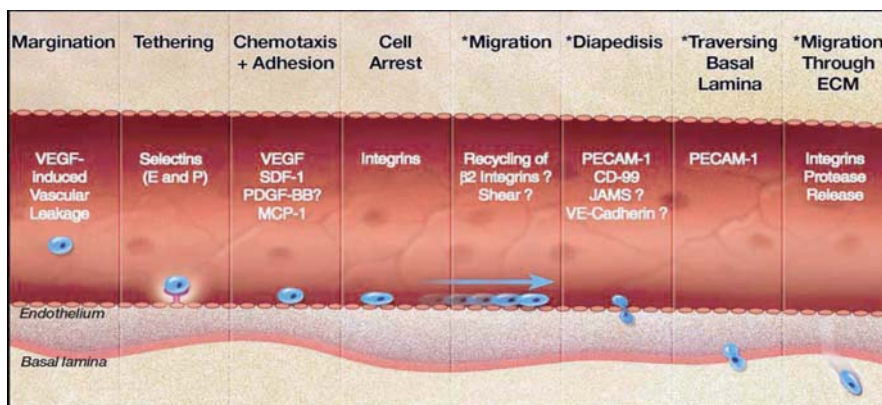


**Figura 4.** Mobilització de les EPC in vivo. La mobilització de les cèl·lules progenitores des de la medulla òssia i des d'altres teixits a la circulació s'associa a diversos factors, tot i que molts aspectes com el paper que aquests exerceixen i la relació entre uns i altres necessiten ser clarificats. Figura adaptada de Caplice and Doyle, 2005.

### 3.4 Reclutament i incorporació de les cèl·lules progenitores endotelials

El reclutament i la incorporació de les EPC als vasos requereix una seqüència coordinada de diferents etapes i mecanismes de senyalització que inclouen l'adhesió, la transmigració, la quimiotaxi i finalment la diferenciació (Figura 5). Algunes quimiosines CC- i CXC- i els seus receptors semblen tenir un paper clau durant el reclutament de les EPC. Per exemple, el factor quimioatrant de monòcits-1 (MCP-1/CCL2) que és present en àrees d'endoteli denudades. S'ha demostrat que les cèl·lules

progenitores de medul·la òssia CCR2+ s'adhereixen als llocs de dany arterial mitjançant un mecanisme depenent de CCL2, contribuint a la reendotelització i a la inhibició de la hiperplàsia en la capa íntima (Fujiyama et al, 2003). El factor-1 $\alpha$  derivat de les cèl·lules de l'estroma (SDF-1 $\alpha$ /CXCL12) també actua com una quimosina clau per la mobilització de les EPC des de la medul·la òssia. Estudis recents han demostrat que el bloqueig de CXCR4, el receptor de CXCL12, suposa una reducció de l'adhesió de les EPC després d'induir mecànicament una lesió arterial *in vivo* (Hristov et al, 2007). A més de la regulació del reclutament de les EPC per part de les quimiosines, també són necessàries les molècules d'adhesió, de la família de les selectines i les integrines, per l'arrest de les EPC a les EC o als components de la matriu extracel·lular *in vitro* i *in vivo*. En aquest context, s'ha trobat que les EPC són reclutades per les EC activades mitjançant un mecanisme depenent de les selectines E i P (Foubert et al, 2007; Vajkoczy et al, 2003). Per una altra banda, les integrines  $\beta$ 2 i  $\beta$ 1 també intervenen en l'adhesió de les EPC a les EC madures, i en la migració transendotelial d'aquestes *in vivo* (Urbich and Dimmeler, 2004). La intensitat de l'adhesió es veu incrementada per l'augment de l'afinitat i l'avidesa de les integrines i alhora es produeixen els factors que promouen canvis en la morfologia i moviments cel·lulars que afavoreixen la translocació de les cèl·lules a través de l'endoteli (diapèdesi). Finalment, els mecanismes que regulen la migració de les cèl·lules progenitores cap a la làmina basal i la matriu extracel·lular no es coneixen amb exactitud, però alguns treballs suggereixen que la molècula d'adhesió de les cèl·lules endotelials i plaquetes-1 (PECAM) s'expressa en les EPC i pot jugar un paper clau en aquest procés (Liao et al, 1995)



**Figura 5.** Vies implicades en el reclutament i la integració de les EPC als teixits diana. Figura adaptada de Caplice and Doyle, 2005.

### 3.5 Aplicació de cèl·lules progenitores endotelials com a teràpia per la hipertensió pulmonar

#### 3.5.1 Estudis en models animals

Els efectes beneficiosos de les EPC en la reparació de lesions vasculars es va demostrar per primera vegada durant les angioplasties d'artèries caròtides de conills, on es va observar que el trasplantament de EPC provocava una ràpida reendotelització de les artèries, una millora de la seva funcionalitat i una inhibició de la hiperplàsia de la neoíntima (Griese et al, 2003; He et al, 2004; Kong et al, 2004). Posteriorment, les EPC també s'han utilitzat com a tractament de la HP en diversos models animals. S'ha demostrat que l'administració intravenosa de EPC derivades de medul·la òssia atenua significativament la HP induïda per l'administració de monocrotalina en ratolins, però no en models exposats crònicament a hipòxia (Raoul et al, 2007). En aquest sentit, un altre estudi realitzat en ratolins amb HP induïda per hipòxia demostra que les propietats angiogèniques de les EPC en aquest model estan debilitades respecte als ratolins control, suggerint una pèrdua de funcionalitat d'aquestes cèl·lules. Així, tot i la mobilització i el reclutament de les EPC als vasos danyats, en el model de HP induït per hipòxia, les EPC no prevenen el desenvolupament d'aquesta malaltia ja que són

disfuncionants (Marsboom et al, 2008). Els estudis de Zhao et al. també mostren com les EPC derivades de medul·la òssia, transfectades amb eNOS, poden prevenir i revertir la HP en rates tractades amb monocrotalina (Zhao et al, 2005). El paper d'eNOS és important ja que promou la diferenciació a EC (Chu et al, 2008), i a més s'ha vist que varis agents que tenen un efecte sobre la mobilització de les EPC, i com a conseqüència sobre la reendotelització com per exemple les estatines, la eritropoietina o el G-CSF també estimulen l'activitat d'eNOS (Takamiya et al, 2006; Walter et al, 2002). I en gossos amb HP també induïda per l'administració de monocrotalina, el trasplantament de EPC dins del pulmó millora la resistència vascular pulmonar (Takahashi et al, 2004). A més, les cèl·lules mare mesenquimals també poden atenuar la HP induïda per monocrotalina i millorar la funció endotelial però mitjançant un efecte paracrí (Baber et al, 2007). Tal i com es posa de manifest en tots aquests estudis, el model de HP induït per monocrotalina és el més utilitzat a l'hora d'investigar les opcions terapèutiques dirigides a corregir la disfunció endotelial donada la capacitat de la monocrotalina per lesionar l'endoteli. El que també indica que la lesió endotelial pot ser un factor més important que la hipòxia en la patogènesi de la HP.

### 3.5.2 Estudis clínics

Al llarg de l'última dècada, s'han realitzat estudis en humans que han demostrat la viabilitat, seguretat i eficàcia del trasplantament cel·lular en varis assaigs preclínics i clínics de fases inicials mitjançant l'administració de EPC, o la seva mobilització, pel tractament de la reestenosi postangioplàstia i infart agut de miocardi (Ward et al, 2007). Seguint aquests passos també s'ha investigat el paper potencial de la teràpia amb EPC en el tractament dels pacients amb hipertensió arterial pulmonar idiopàtica (Ward et al, 2007). Wang et al. va publicar els resultats del primer estudi prospectiu, aleatori en 31

pacients amb hipertensió arterial pulmonar idiopàtica, en que es comparaven els efectes del trasplantament de EPC més teràpia convencional amb l'efecte de la teràpia convencional sola. La variable principal d'estudi va ser el canvi en la distància caminada als 6 minuts (Wang et al, 2007). En aquest estudi els pacients tractats amb la teràpia cel·lular van millorar la tolerància a l'exercici i la hemodinàmica pulmonar en comparació amb els pacients tractats només amb la teràpia convencional (Wang et al, 2007). El mateix grup, en un estudi posterior també va demostrar una millora en els mateixos paràmetres en nens amb hipertensió arterial pulmonar idiopàtica després del trasplantament amb EPC (Zhu et al, 2008). Actualment, s'estan portant a terme quatre estudis clínics de fase I per comprovar els efectes de la teràpia amb EPC en pacients amb HP, i es creu que en un parell d'anys els resultats estaran disponibles: (1) "Safety and Efficacy Study of Transplantation of EPCs to Treat Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension" (NCT00372346, ClinicalTrials.gov); (2) "Endothelial Progenitor Cells and Pulmonary Idiopathic Arterial Hypertension" (NCT00551408, ClinicalTrials.gov); (3) "Exercise and Respiratory Therapy in Patients With Rheumatoid Arthritis / Collagenosis and Pulmonary Hypertension" (NCT00491309, ClinicalTrials.gov); (4) "Pulmonary Hypertension: Assessment of Cell Therapy (PHACeT)" (NCT00469027, ClinicalTrials.gov).

### 3.6 Cèl·lules progenitores endotelials: contribuint al remodelat vascular

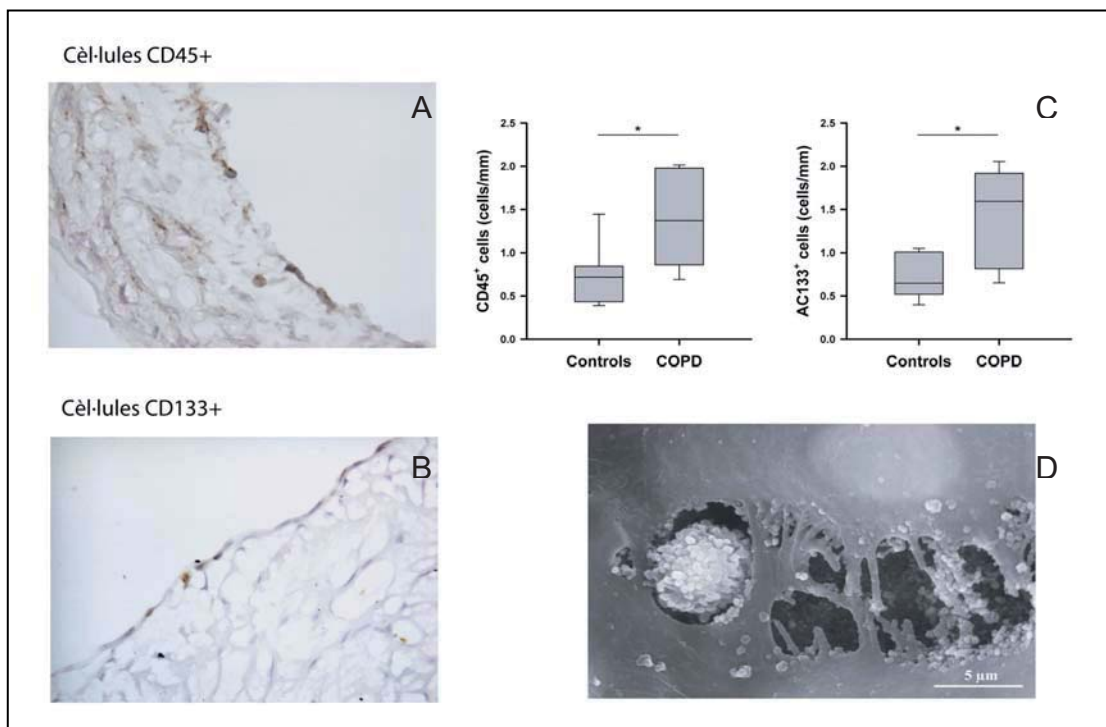
Els mecanismes implicats en el remodelat vascular pulmonar en la MPOC no es coneixen completament. Tradicionalment es creu que les SMC acumulades en la íntima hiperplàsica tenen el seu origen en les SMC localitzades en la capa mitja, i que un cop es produeix una lesió endotelial, es desdiferencien, migren cap a la íntima, proliferen i sintetitzen matriu extracel·lular (Ross, 1999). Tanmateix, molts pocs estudis han

documentat la migració de les SMC des de la capa mitja cap a la íntima a través de la làmina elàstica interna. I en el marc de la MPOC, aquest mecanisme no explica el desenvolupament de la muscularització de les arterioles que en condicions normals manquen de SMC en la seva paret. A més, alguns estudis han demostrat que la hiperplàsia de la íntima es pot prevenir mitjançant bloquejants de quimiosines o molècules d'adhesió, que juguen un paper clau en el reclutament de les cèl·lules sanguínies però que no exerceixen cap efecte sobre la migració i la proliferació de SMC diferenciades (Furukawa et al, 1999). I per últim, s'han observat diferències en el fenotip i en el patró d'expressió gènica entre les SMC de la neoíntima i de la capa mitja. Curiosament, les SMC de la neoíntima expressaven marcadors hematopoietics (Zohlnhofer et al, 2001). Conseqüentment, es creu que les cèl·lules que proliferen en la íntima de les artèries després d'una lesió vascular poden provenir d'una font externa més que de les cèl·lules localitzades a la capa mitja.

Estudis experimentals realitzats combinant el trasplantament de medul·la òssia i models de lesió vascular, han demostrat que cèl·lules derivades de medul·la òssia del donant contribueixen a la proliferació de SMC i a la hiperplàsia de la íntima. Aquest mecanisme s'ha demostrat en la vasculopatia associada a l'empelt, en el remodelat arterial causat per una lesió mecànica i en la formació de la placa ateromatosa (George et al, 2005; Saiura et al, 2001; Sata et al, 2002; Tanaka et al, 2008). En aquest sentit, estudis previs del nostre grup demostren la presència de cèl·lules progenitores vasculars (CD133+) derivades de medul·la òssia en les àrees denudades de la superfície endotelial i en la capa íntima d'artèries pulmonars de pacients amb MPOC. El número de cèl·lules progenitores s'associa amb la resposta a l'estímul hipòxic, però també amb l'engruiximent de la paret arterial, suggerint que aquestes cèl·lules poden estar

implicades en els mecanismes de reparació de l'endoteli, però també en el remodelat dels vasos pulmonars en la MPOC (Peinado et al, 2006) (Figura 6).

Actualment, la contribució potencial de las cèl·lules progenitores vasculars a la biopatologia de les alteracions vasculars pulmonars associades a la MPOC encara no es coneix amb exactitud.



**Figura 6.** A i B) Marcatge de seccions transversals d'artèries pulmonars humanes mitjançant immunohistoquímica. A) Les cèl·lules CD45 positives es poden identificar tant a la part luminal com a la íntima de l'artèria. B) Les cèl·lules CD133 positives es troben localitzades en la superfície endotelial. C) Quantificació de cèl·lules CD45 positives i CD133 positives adherides a l'endoteli expressat com a número de cèl·lules per mm d'endoteli en individus controls i en pacients amb MPOC, \* p < 0.05. D) Microscopia electrònica d'escombrat de la superfície endotelial d'artèries pulmonars de pacients amb MPOC. En aquesta fotografia s'observen les àrees denudades de l'endoteli i la presència de cèl·lules circulants properes a aquestes zones. Aquestes imatges són representatives de set casos estudiats. Figura adaptada de Peinado et al, 2006.

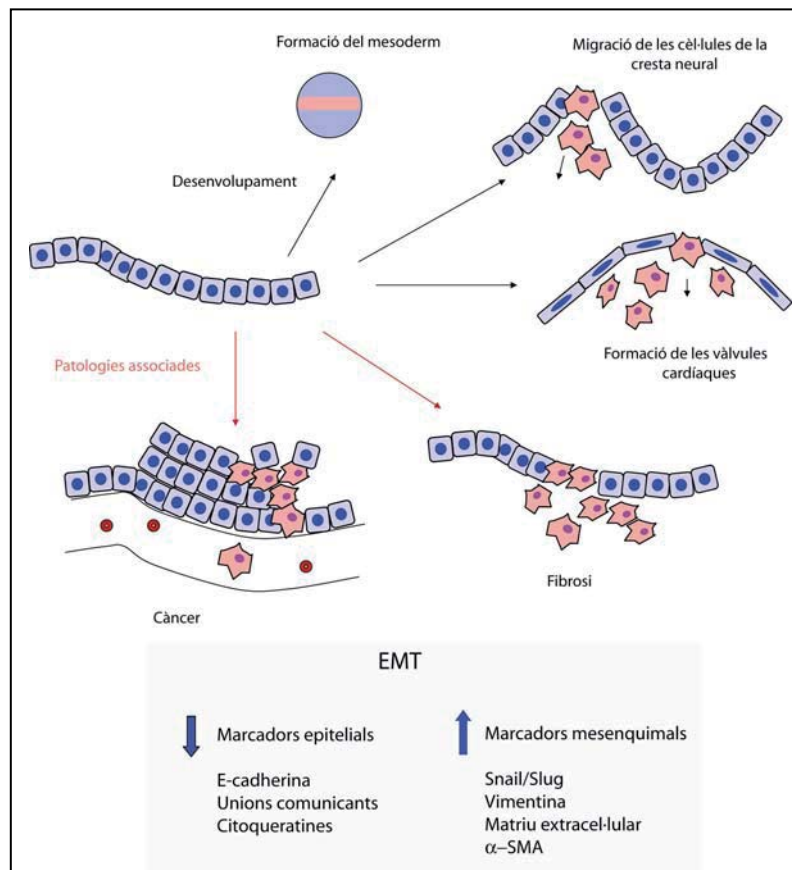


#### **4. Transició de la cèl·lula endotelial a la cèl·lula muscular llisa: Implicacions en el remodelat vascular**

Una altra de les teories que existeixen per explicar l'origen de les SMC acumulades a la íntima de les lesions vasculars és la possibilitat de que les EC de l'endoteli pateixin un procés de transició cap a SMC. Aquest procés s'anomena transició de la cèl·lula endotelial a mesenquimal (*Endothelial-to-Mesenchymal Transition*, EnMT) i juga un paper molt important durant el desenvolupament cardiovascular i en diverses patologies vasculars. Els mecanismes implicats en l'EnMT no es coneixen amb exactitud, tot i que són molt similars als que s'han identificat en el procés de transició de les cèl·lules epitelials a SMC, anomenat transició de la cèl·lula epitelial a mesenquimal (*Epithelial-to-Mesenchymal Transition*, EMT). El procés d'EMT s'ha estudiat extensament, ja que és un procés crític en la embriogènesi, proporcionant un marc molt útil per a l'estudi del procés d'EnMT. Ambdós processos donen lloc a un tipus cel·lular amb les mateixes característiques mesenquimals i existeixen evidències de que també comparteixen moltes vies de senyalització. Elizabeth Hay a l'any 1968 va definir per primera vegada el procés de transformació de cèl·lula epitelial a cèl·lula mesenquimal utilitzant un model de formació del solc primitiu en pollets (Hay, 2010). Més endavant, el terme "transformació" es va substituir per "transició" per reflectir que es tracta d'un procés reversible en el que la cèl·lula mesenquimal pot revertir a cèl·lula epitelial. Durant el desenvolupament embrionari, el procés d'EMT principalment té lloc durant la gastrulació (formació de les capes germinals) i la generació de les cèl·lules migratòries de la cresta neural (Duband and Thiery, 1982; Hay, 2005). Tot i això aquest programa biològic es pot reinstaurar en els adults sota unes condicions patològiques, en particular en fibrosi o en càncer, on té un major efecte en la progressió d'aquestes malalties (Figura 7). El procés d'EMT comença amb la dissolució de les unions comunicants i de

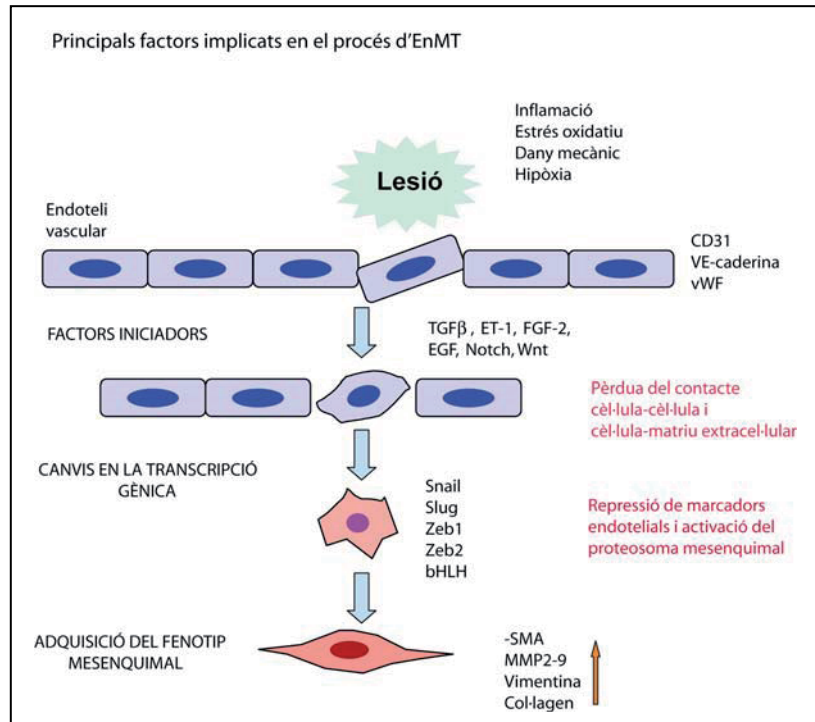


les unions adherents que connecten les cèl·lules epitelials provocant la pèrdua de la polaritat cel·lular. Posteriorment, té lloc una reorganització de l'actina del citoesquelet crucial per l'adquisició d'un fenotip migratori (Akhurst R, 2007). Simultàniament, l'augment de l'expressió i de l'activitat de proteases extracel·lulars (com les metal·loproteïnases), provoca la degradació de les proteïnes de la matriu extracel·lular, alterant la membrana basal i contribuint a l'adquisició de les propietats migratòries i invasores que caracteritzen aquestes cèl·lules (Imamichi and Menke, 2007). Aquest procés finalitza amb un canvi complet del perfil transcripcional de les cèl·lules, en el que es reprimeix l'expressió dels marcadors epitelials i s'activa l'expressió dels marcadors mesenquimals.



**Figura 7.** Transició de cèl·lula epitelial a cèl·lula mesenquimal (EMT) en el desenvolupament i en la malaltia. L'EMT està integrat dins del desenvolupament normal, des de la gastrulació fins a l'organogènesi. La reinstauració d'aquest programa biològic esdevé durant la fibrosi i el càncer i té un major efecte sobre la progressió de la malaltia. Figura adaptada de Akhurst R, 2007.

De forma similar, durant el procés d'EnMT el contacte cel·lular entre les EC es perd i aquestes pateixen una reestructuració del seu citoesquelet. Posteriorment les EC perden l'expressió dels marcadors endotelials (VE-caderina, Tie-1/2, VEGFR-1/2, PECAM/CD31 o FVIII) i simultàniament guanyen l'expressió de marcadors mesenquimals ( $\alpha$ -SMA, col·lagen o vimentina), junt amb l'adquisició d'un fenotip migratori i proliferatiu (Figura 8). Aquest procés es va observar per primera vegada en estudis de desenvolupament basats en la formació del cor (Markwald et al, 1975; Markwald et al, 1977). En aquest context, es va descriure com les EC que ocupen el tub primitiu del cor adquireixen un fenotip mesenquimal i envaeixen els teixits que l'envolten participant en la formació de les vàlvules cardíques i del septe interventricular (Armstrong and Bischoff, 2004). A més, Arciniegas et al. va demostrar que el procés d'EnMT és un procés clau en el desenvolupament de l'artèria aorta i pulmonar (Arciniegas et al, 1989; Arciniegas et al, 2005), i estudis morfològics en embrions humans suggereixen que les EC poden donar lloc a SMC durant la maduració de les artèries i venes pulmonars (Hall et al, 2000; Hall et al, 2002). Estudis recents també han demostrat que el procés d'EnMT, així com el d'EMT, pot encadenar diversos estats patològics, incloent el càncer i la fibrosi cardíaca (Zeisberg et al, 2007a; Zeisberg et al, 2007b). En aquest sentit, altres autors han observat que les EC microvasculars pateixen una transició a cèl·lules mesenquimals com a resposta a un estímul inflamatori crònic (Lipton et al, 1992; Romero et al, 1997). Per últim, és important destacar que aquest procés també s'ha observat durant l'engruiximent de la íntima en trasplantaments d'arterioesclerosi, restenosi i en el remodelat vascular induït per la hipòxia (Beranek, 1995; Beranek and Cavarocchi, 1990; Zhu et al, 2006).



**Figura 8.** Representació esquemàtica dels mecanismes implicats en el procés de transició de la cèl·lula endotelial a cèl·lula mesenquimal (EnMT). Els factors iniciadors són capaços d'activar les metaloproteïnases i els membres de la família de les serina proteases i induir la pèrdua del contacte cel·lular. Posteriorment, s'activen els factors de transcripció, que estan implicats en la supressió d'E-cadherina i d'altres proteïnes endotelials i seguidament hi ha una regulació a l'alça del programa gènec mesenquimal. Figura adaptada de Arciniegas et al, 2007.

#### 4.1. Regulació transcripcional

Durant el procés d'EMT, la pèrdua dels marcadors epitelials i l'adquisició de les característiques mesenquimals s'aconsegueix mitjançant un programa de transcripció molt ben organitzat en el que tres famílies de factors de transcripció estan implicades: Snail, ZEB i bHLH.

##### 4.1.1 Família Snail

Snail pertany a una família de factors de transcripció de dits de zinc que desenvolupen rols essencials en el desenvolupament embrionari. En els vertebrats, s'han identificat tres proteïnes que pertanyen a aquesta família: Snail (que en un principi es va

identificar com a Snail), Snai2 (també conegut com Slug) i més recentment s'ha caracteritzat Snail3. De fet, l'activació tant d'Snail com d'Slug s'ha associat a tots els processos d'EMT que s'han descrit durant el desenvolupament, càncer o fibrosi (Barrallo-Gimeno and Nieto, 2005). Tot i que la proteïna Slug està expressada de forma més general en processos aliens al procés d'EMT. Aquests factors funcionen com a repressors transcripcionals. La diana més ben caracteritzada és el gen que codifica per E-cadherina, una proteïna transmembrana que constitueix l'eix de les unions adherents (Batlle et al, 2000; Cano et al, 2000). Les unions adherents són essencials en els complexos d'unió de les cèl·lules epitelials i la seva presència sembla determinant per a la diferenciació i funcionalitat dels epitelis. La pèrdua d'E-cadherina constitueix un pas clau perquè el procés d'EMT es pugui dur a terme, però Snail, ja sigui directe o indirectament, també regula altres aspectes d'aquest procés, com l'expressió de marcadors mesenquimals (fibronectina i vimentina), la disminució de l'expressió de marcadors epitelials, la inhibició de la proliferació cel·lular, l'expressió de metal·loproteïnases i protecció contra la mort cel·lular (mitjançant la supressió de caspases, etc.) (De et al, 2005; Hemavathy et al, 2000; Nieto et al, 1994). L'activitat transcripcional d'Snail depèn de la seva localització subcel·lular. Així, la fosforilació d'Snail provoca la sortida d'aquesta fora del nucli. Al citosol, Snail és incapaç de reprimir amb eficiència els seus gens diana, i per tant el seu efecte transcripcional és abolit.

#### 4.1.2 Família ZEB

La família ZEB consta de dos factors de transcripció, ZEB1 i ZEB2. Aquestes proteïnes s'expressen durant el desenvolupament en varis teixits, incloent el sistema nerviós central, el múscul esquelètic del cor i en les cèl·lules hematopoiètiques. Varis estudis han demostrat la importància d'aquests factors en la regulació de l'expressió de l'E-

cadherina i en la inducció del procés d'EMT (Comijn et al, 2001; Eger et al, 2005) i també s'han relacionat amb la malignitat de diferents tumors ja que la seva activació promou la migració i la invasió cel·lular (Spaderna et al, 2008; Vandewalle et al, 2005).

#### 4.1.3 Família Hèlix-loop-hèlix

Hèlix-loop-hèlix (bHLH) és una gran família de factors de transcripció que controlen un ampli espectre de processos patològics i relacionats amb el desenvolupament. Aquests factors es divideixen en set categories en funció de la seva distribució en els teixits, la capacitat de dimerització i la especificitat d'unió al DNA. En el context de l'EMT, les proteïnes que s'han vist implicades són les proteïnes E12 i E47 de la classe I, les Twist de la classe II i les Id de la classe V (Ansieau et al, 2008; Kondo et al, 2004; Kowanetz et al, 2004).

## 4.2 Factors iniciadors d'EMT

### 4.2.1 Factor transformant de creixement $\beta$ -1

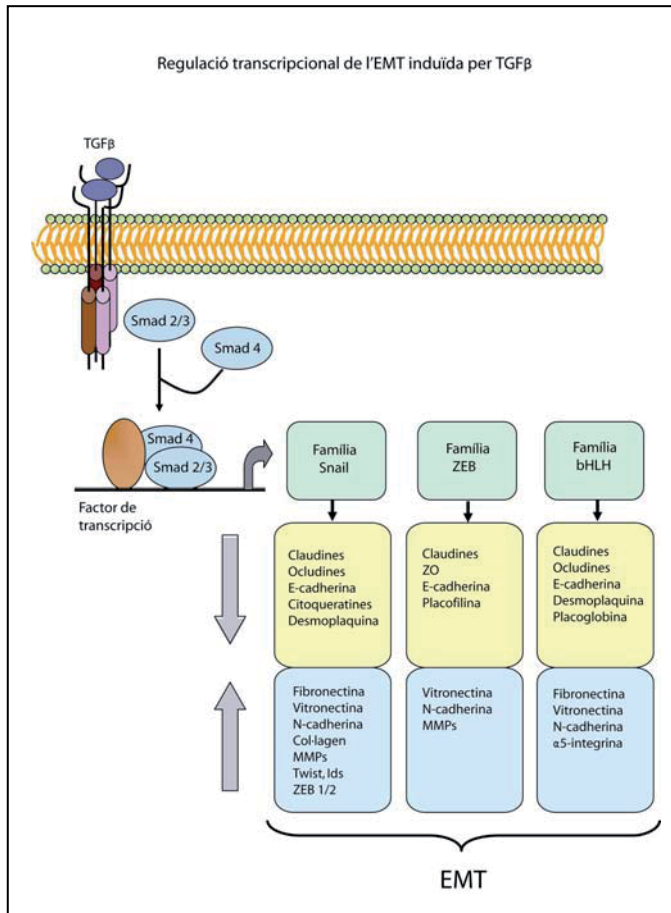
Factors de creixement i diferenciació, com el factor transformant de creixement- $\beta$  (TGF $\beta$ ), el factor de creixement de fibroblasts (FGF-2), el factor de creixement epitelial (EGF), el factor de creixement d'hepatòcits (HGF), etc., poden induir el procés d'EMT (Moustakas and Heldin, 2007). Entre tots aquests, l'estudi del TGF $\beta$  ha rebut una atenció especial, ja que s'ha demostrat que és el principal factor iniciador d'EMT durant l'embriogènesi (Lee et al, 2006), i en la progressió del càncer i la fibrosi (incloent la fibrosi pulmonar idiopàtica) (Cui et al, 1996; Willis et al, 2005). En estudis posteriors també s'ha comprovat que *in vitro* les EC poden adquirir un fenotip similar al de SMC per un procés de transdiferenciació promogut pel TGF $\beta$  (Arciniegas et al, 1992; Frid et al, 2002).

La caracterització fenotípica i molecular de ratolins *knock-out* per la via del TGF $\beta$  també ha demostrat que aquesta via juga un paper crític durant l'angiogènesi i que les mutacions d'alguns dels seus gens estan directament relacionades amb importants desordres cardiovasculars, com la síndrome de Marfan, la telangiectàsia hemorràgica hereditària o la hipertensió pulmonar primària (ten and Arthur, 2007).

TGF $\beta$ -1 és un factor de creixement multifactorial que indueix la diferenciació i la síntesi de proteïnes de la matriu extracel·lular en alguns tipus cel·lulars, inhibeix la proliferació cel·lular i promou la quimiotaxi de les cèl·lules inflamatòries (Adams et al, 1991; Piek et al, 1999). En les artèries pulmonars, TGF $\beta$  s'expressa en les SMC (Coker et al, 1996), i alguns estudis relacionen l'expressió d'aquest factor amb la regulació de l'adhesió i diferenciació de les EPC (Zhu et al, 2005).

Els membres de la superfamília del TGF $\beta$  senyalitzen a través de la unió a un complex heterodimèric de receptors amb activitat serina-treonina cinasa anomenats de tipus I i de tipus II (Feng and Derynck, 2005). Tant els receptors del tipus I com els del tipus II són proteïnes transmembrana amb un domini extracel·lular d'unió, un domini transmembrana  $\alpha$ -hèlix i un domini citoplasmàtic que conté el domini cinasa i una seqüència proteica que conté dianes de fosforilació. Fins al moment s'han descrit 7 receptors del tipus I (ALK1-ALK7) i 5 receptors del tipus II. En la majoria de les cèl·lules, com a resposta a la interacció del lligand, el receptor cinasa II fosforila ALK5 (també conegut com TGF $\beta$ RI), i aquest actua fosforilant les proteïnes Smad 2 i Smad 3. Posteriorment, les proteïnes fosforilades s'associen amb una altra proteïna, Smad 4, i formen un trímer. Aquest complex es transloca al nucli, on en cooperació amb altres factors de transcripció específics regula la transcripció dels gens diana (Derynck et al, 1998).

Durant el procés d'EMT s'ha descrit la inducció de l'expressió de factors de transcripció de les famílies Snail i ZEB com a resposta a TGF $\beta$  mitjançant un mecanisme dependent de les proteïnes Smad (Hoot et al, 2008; Morita et al, 2007; Nishimura et al, 2006) (Figura 9). Tal i com s'ha comentat anteriorment, aquests factors de transcripció actuen reprimint l'expressió gènica dels marcadors epitelials i activant l'expressió dels marcadors mesenquimals. El TGF $\beta$  pot induir diferents processos relacionats amb l'EMT, com l'organització del citoesquelet, el creixement cel·lular, la supervivència, la migració o la invasió mitjançant l'activació de vies alternatives com les de les Erk/MAPK, Rho GTPases i P13K/Akt (Ohkubo and Ozawa, 2004; Valcourt et al, 2005). Altres famílies de lligands, que no pertanyen a la família del TGF $\beta$ , activen vies de senyalització, com la via de Wnt i de Notch, que cooperen amb la via del TGF $\beta$  en la producció de la resposta del procés d'EMT (Nelson and Nusse, 2004; Timmerman et al, 2004). En el cas de la via de senyalització de Wnt, l'anomenada "via Wnt canònica" coopera amb la via del TGF $\beta$  mitjançant la regulació de  $\beta$ -catenina en el control de l'EMT en alguns teixits (Liebner et al, 2004; Nelson and Nusse, 2004). La via de Notch té lloc d'una manera molt més localitzada i s'activa quan els receptors i els lligands, que es troben integrats a la membrana, interactuen mitjançant el contacte cel·lular entre les cèl·lules veïnes. En els processos d'EMT implicats en el desenvolupament i en la progressió de tumors s'ha demostrat un entrecruament de les vies de senyalització de Notch i TGF $\beta$  (Zavadil et al, 2004). D'aquesta forma, alguns estudis basats en la formació del coixinet endocàrdic han demostrat que l'activació del receptor Notch1 indueix l'expressió d'Snail i d'Slug, els quals reprimeixen l'expressió de VE-caderina promovent la migració i la invasió de les cèl·lules de l'endocardi (Timmerman et al, 2004).



**Figura 9.** Representació esquemàtica de la regulació transcripcional de l'EMT induïda per TGFβ. Com a resposta al TGFβ, Smad2 i 3 són activades, formant un complex amb Smad4, que regula la transcripció dels gens diana mitjançant la interacció amb altres factors de transcripció que s'uneixen al DNA. En la inducció de l'EMT, les proteïnes Smad activades activen la regulació transcripcional mitjançant tres famílies de factors de transcripció, reprimint l'expressió gènica dels marcadors epitelials i activant l'expressió gènica dels marcadors mesenquimals. Figura adaptada de Xu et al, 2009.

#### 4.2.2 Endotelina-1

Les endotelines comprenen tres pèptids de 21 aminoàcids, ET-1, ET-2 i ET-3 i exerceixen la seva acció a través de la unió a dos tipus de receptors de superfície, el receptor B d'endotelina (ETB) i el receptor A d'endotelina (ETA) (Masaki, 2004).

Tal i com s'ha comentat anteriorment, l'ET-1 és un pèptid amb propietats vasoactives i mitòtiques sobre les SMC. Però també s'ha demostrat la seva implicació en la inducció del procés d'EMT en cèl·lules epitelials alveolars mitjançant el receptor A de l'endotelina (ETA), via estimulació del TGFβ-1 endogen (Jain et al, 2007) i en cèl·lules tumorals d'ovari (Rosano et al, 2005).

A diferència del TGFβ-1, l'ET-1 es sintetitza a l'endoteli exercint els seus efectes de forma paracrina i autocrina sobre les cèl·lules adjacents. Els principals efectes mitogènics i constrictors de l'ET-1 estan mediat per l'activació del receptor ETA,



predominant en les SMC de les artèries pulmonars. A més, aquest receptor indueix l'adhesió, migració i activació de cèl·lules inflamatòries a la paret dels vasos sanguinis (Helset et al, 1994).

L'expressió d'ET-1 està regulada per diferents factors de creixement, dels quals el TGF $\beta$ -1 és un dels més importants. El mecanisme pel qual el TGF $\beta$ -1 indueix l'expressió d'ET-1 sembla estar relacionat amb la via de les proteïnes Smad, explicada anteriorment (Rodriguez-Pascual et al, 2004).

En relació amb el procés d'EMT, el grup de Rosano et al. va descriure que en cèl·lules de carcinoma d'ovari l'activació del receptor ETA induït per l'ET-1 contribueix a l'adquisició d'un fenotip invasiu través de la disminució de l'expressió d'E-cadherina, l'acumulació de  $\beta$ -catenina al nucli i l'augment de l'expressió de N-cadherina (Rosano et al, 2006). En aquest estudi es demostra que l'activació del receptor ETA promou l'expressió de la cinasa lligada a integrines (ILK) a través de PI3K. L'expressió de ILK inhibeix l'activitat de GSK-3 $\beta$ , evitant la fosforilació i posterior degradació de la  $\beta$ -catenina del citoplasma i incrementant els nivells d'aquesta al nucli on actua com a activador transcripcional. A més, també indueix l'expressió de la proteïna Snail, contribuint al programa transcripcional característic del procés d'EMT.

*Hipòtesi*

Les EPC derivades de medul·la òssia tenen capacitat per diferenciar-se a EC, i per tant constitueixen una possible opció terapèutica en el cas de la MPOC o de la HP ja que tenen capacitat per reparar l'endoteli vascular. Però existeixen evidències que indiquen que aquestes cèl·lules també poden diferenciar-se a altres tipus cel·lulars si se'ls proporciona el medi adequat, suggerint que també poden contribuir a perpetuar lesions vasculars, com és el cas del remodelat vascular. Els mecanismes de diferenciació d'aquestes cèl·lules a SMC no es coneixen amb exactitud, però hi ha estudis que suggereixen que la via del TGF $\beta$  podria jugar un paper clau iniciant un procés similar al d'EnMT. L'estudi d'aquests mecanismes ens proporcionaria noves dianes terapèutiques que es podrien combinar amb teràpies amb cèl·lules mare a l'hora de tractar malalties com la HP i altres anormalitats vasculars.

*Objectius*

D'acord amb els antecedents assenyalats, els objectius plantejats en els dos estudis que conformen la Tesi Doctoral van ser:

Primer estudi:

***Plasticitat de les cèl·lules CD133+: Paper en el remodelat vascular pulmonar***

*Objectiu general:*

Avaluar la plasticitat de les cèl·lules progenitores endotelials derivades de medul·la òssia CD133+ (EPC) per diferenciar-se a SMC i EC i investigar la contribució d'aquestes cèl·lules tant en la reparació de l'endoteli com en el remodelat vascular associat a la MPOC.

*Objectius específics:*

- a) Avaluar la plasticitat de les EPC per diferenciar-se a SMC i EC en cultius *in vitro*.
- b) Avaluar el potencial de les EPC per migrar cap a la capa íntima de les artèries pulmonars i diferenciar-se a SMC, incubant aquestes cèl·lules dins del lumen d'explants d'artèries pulmonars humanes.
- c) Explorar els mecanismes de fusió o transdiferenciació pels quals les EPC poden adquirir el fenotip de les cèl·lules que componen les artèries pulmonars humanes.

Segon estudi:

***EPC en contacte amb SMC segueixen un procés similar al d'EnMT mitjançant  
TGF $\beta$ RI***

*Objectiu general:*

Investigar *in vitro* els mecanismes moleculars, relacionats amb la via del TGF $\beta$ , implicats en la diferenciació i migració de les EPC.

*Objectius específics:*

- a) Avaluar l'expressió gènica dels marcadors mesenquimals i endotelials en les EPC en procés de diferenciació a SMC.
- b) Comprovar si els factors de transcripció relacionats amb el procés d'EnMT estan implicats en la diferenciació de les EPC a SMC.
- c) Estudiar els efectes de la inhibició del receptor tipus I del TGF $\beta$  (TGF $\beta$ RI) i del receptor tipus A de l'endotelina-1 (ETA) sobre la diferenciació de les EPC a SMC o EC i la migració, adhesió i funcionalitat de les EPC.

*Resultats*

***PUBLICACIONS***

A continuació es presenten els articles originals publicats que fonamenten la Tesi Doctoral:

Primer estudi:

Díez M, Barberà JA, Ferrer E, Fernández-Lloris R, Pizarro S, Roca J, Peinado VI. **Plasticity of CD133+ cells: role in pulmonary vascular remodeling.** Cardiovasc Res. 2007 Dec 1;76(3):517-27

Segon estudi:

Díez M, Musri MM, Ferrer E, Barberà JA, Peinado VI. **Endothelial progenitor cells undergo an endothelial-to-mesenchymal transition-like process mediated by TGF $\beta$ RI.** Cardiovasc Res. 2010 Aug 11. doi:10.1093/cvr/cvq236





Primer estudi:

**“Plasticity of CD133+ cells: Role in pulmonary vascular remodeling”**

Marta Díez, Joan A. Barberà, Elisabet Ferrer, Raquel Fernández-Lloris,  
Sandra Pizarro, Josep Roca, Victor I. Peinado

Article publicat a **Cardiovascular Research 76 (2007): 517-527**



# Plasticity of CD133<sup>+</sup> cells: Role in pulmonary vascular remodeling

Marta Díez, Joan A. Barberà, Elisabet Ferrer, Raquel Fernández-Lloris,  
Sandra Pizarro, Josep Roca, Victor I. Peinado\*

Department of Pulmonary Medicine, Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS),  
Ciber de Enfermedades Respiratorias, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 2 May 2007; received in revised form 1 August 2007; accepted 15 August 2007

Available online 22 August 2007

Time for primary review 34 days

## Abstract

**Objective:** Studies in pulmonary arteries (PA) of patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) suggest that bone marrow-derived endothelial progenitor cells (CD133<sup>+</sup>) may infiltrate the intima and differentiate into smooth muscle cells (SMC). This study aimed to evaluate the plasticity of CD133<sup>+</sup> cells to differentiate into SMC and endothelial cells (EC) in both cell culture and human isolated PA.

**Methods:** Plasticity of granulocyte-colony stimulator factor (G-CSF)-mobilized peripheral blood CD133<sup>+</sup> cells was assessed in co-cultures with primary lines of human PA endothelial cells (PAEC) or SMC (PASMC) and in isolated human PA. We also evaluated if the phenotype of differentiated progenitor cells was acquired by fusion or differentiation.

**Results:** The *in vitro* studies demonstrated CD133<sup>+</sup> cells may acquire the morphology and phenotype of the cells they were co-cultured with. CD133<sup>+</sup> cells co-incubated with human isolated PA were able to migrate into the intima and differentiate into SMC. Progenitor cell differentiation was produced without fusion with mature cells.

**Conclusions:** We provide evidence of plasticity of CD133<sup>+</sup> cells to differentiate into both endothelial cells and SMC, reinforcing the idea of their potential role in the remodeling process of PA in COPD. This process was conducted by transdifferentiation and not by cell fusion.

© 2007 European Society of Cardiology. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** Stem cells; Pulmonary circulation; Hypertension; Cell differentiation; Endothelial function

## 1. Introduction

Patients with COPD show striking changes in pulmonary muscular arteries and precapillary vessels that explain the presence of pulmonary hypertension [1,2]. The hallmark of pulmonary vascular derangement in this group of patients is the thickening of the intimal layer due to smooth muscle-like cell proliferation. The etiology of vascular changes at the initial stage of the disease remains still uncertain. The most plausible hypotheses about the origin of intimal cells include: a) transdifferentiation of endothelial cells into smooth muscle cells [3,4]; b) differentiation of adventitial

fibroblasts into myofibroblasts and migration into the intimal layer throughout the media [5,6]; and, c) recruitment of circulating bone-marrow stem cells throughout endothelium, migration towards the intima and differentiation into smooth muscle cells [7]. The latter is specially suggestive because it does not exclude any of the aforementioned hypotheses since the differentiation process of stem cells may be sensitive to different microenvironments. Moreover, it provides a simple explanation about the degree of cell maturity, proliferative capacity and regional heterogeneity within cells observed in both the media and intimal layers along the vascular tree [8–10].

The identification of stem cells playing a role in vascular repair remains unresolved. There is consensus on the existence of a circulating endothelial precursor with properties similar to those of embryonic angioblasts [11]. This precursor, with a bone-marrow origin, can be identified by a characteristic surface phenotype positive for CD34,

\* Corresponding author. Servei de Pneumologia, Hospital Clínic. Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 2275540; fax: +34 93 2275455.

E-mail address: vpeinado@clinic.ub.es (V.I. Peinado).

CD133, and VEGF receptor-2 (VEGFR-2) [12] and can differentiate to endothelial cell *in vitro* [13]. Recent studies have suggested that CD133<sup>+</sup> cells may possess differentiation potential, both *in vitro* and *in vivo*, not limited to endothelial lineage [14], although it is not clear whether this apparent plasticity could be attributed in all tissues to transdifferentiation [14] or cell fusion processes [15]. Although there is not doubt that these cells may play a role in tissue repair, given the potential of CD133<sup>+</sup> cells in terms of plasticity, they might also participate in the progression or maintenance of pre-existing lesions [7,16]. In the pulmonary circulation, this hypothesis is supported by a recent study in COPD showing an increased number of CD133<sup>+</sup> cells infiltrating the hyperplastic intima of pulmonary arteries (PA), very close to denuded areas of endothelium [17]. In that study, the number of progenitor cells attached to the endothelium correlated with the thickness of the arterial wall, suggesting a potential association with the severity of the remodeling process. A potential link between systemic inflammation and circulating progenitors has also been suggested in COPD [18].

We hypothesized that CD133<sup>+</sup> cells possess ability to differentiate into smooth muscle cells (SMC) in the intima of pulmonary arteries, hence potentially contributing to initiate and/or perpetuate vessel remodeling. Accordingly, the aim of this study was to investigate the plasticity of human hematopoietic CD133<sup>+</sup> cells to differentiate *in vitro* into both pulmonary artery smooth muscle cells (PASMC) and pulmonary artery endothelial cells (PAEC). In a second set of experiments, we evaluated the potential of CD133<sup>+</sup> cells to migrate into the intima and differentiate into SMC incubating CD133<sup>+</sup> cells into the lumen of human explanted PA. Finally, we explored the mechanisms, fusion or transdifferentiation, by which CD133<sup>+</sup> cells may acquire the phenotype of tissue cells in human PA.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Cell primary cultures and characterization

The human hematopoietic progenitor cell line CD133<sup>+</sup> was obtained from Cambrex Bio Science (Walkersville, MD). Before using, CD133<sup>+</sup> cells were expanded for 10 days in flasks at a density of  $1 \times 10^5$  cells/mL in stem span medium supplemented with Flt-3ligand (100 ng/ml), StemCell factor (100 ng/ml) and Thrombopoietin (100 ng/ml) (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

The PAEC line was purchased from American Type Culture Collection (HPAE-26, ATCC, Manassas, VA). Cells were cultured in endothelial cell growth medium (ECGM) composed of F-12K nutrient mixture (GIBCO BRL, Grand Island, NY) supplemented with 10% FBS, penicillin/streptomycin (100 U/ml), heparin (0.1 mg/ml) and endothelial cell growth factor (0.03 mg/ml).

The PASMC line was obtained from Cambrex Bio Science. Cells were cultured in smooth muscle cell growth medium

(SMCGM) composed of SMC basal medium (Clonetics, Cambrex) supplemented with 5% FBS, insulin, human fibroblast growth factor (hFGF-B), gentamicin/amphotericin-B and human epidermal growth factor (hEGF) (SmGM-2 SingleQuots, Clonetics, Cambrex).

After expansion, the hematopoietic progenitor cell phenotype was assessed by flow cytometry for the expression of CD133 and by immunofluorescence for the expression of CD45, CD133, CD34, CD31, VEGF2, vWF and vimentin markers and by RT-PCR.

The phenotype of PAEC was characterized by the LDL-uptake, affinity to *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA), and by the positive or negative expression of vimentin, vWF, CD34, CD133, CD45 and  $\alpha$ -actin. The expression of genes related with the endothelial lineage, CD34, vWF, vimentin, and eNOS were also determined by RT-PCR.

The phenotype of PASMC was characterized morphologically and by the immunoreactivity to antibodies against smooth muscle  $\alpha$ -actin, and desmin. The expression of genes related with SMC, SMC  $\alpha$ -actin and the potassium channels Kv1.5 and BKCa were also determined by RT-PCR.

Further details regarding material and methods can be found in the online supplementary material.

### 2.2. Labeling of CD133<sup>+</sup> cells

For all co-culture experiments with PAEC and PASMC and with explanted PA, human CD133<sup>+</sup> cells were previously labeled with 10  $\mu$ g/ml 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine-labeled acetylated LDL (Dil-acLDL; Molecular Probes, Invitrogen, Eugene, OR) for 3 h at 37 °C, followed by 3 washes with PBS. The nontransferable dye Dil-acLDL was used for live monitoring of the human CD133<sup>+</sup> cells during co-cultivation.

### 2.3. Co-culture experiments

For co-culture experiments, PAEC or PASMC were cultured in 24-well fibronectin plates (BD Biosciences, San Jose, CA) in ECGM and SMCGM respectively. After 48 h of culture, Dil-acLDL CD133<sup>+</sup> cells were added at a density of  $4 \times 10^4$  cells/well allowing them to differentiate. After 6 and 12 days, co-cultures were fixed in 4% paraformaldehyde and stained for UEA or SMC  $\alpha$ -actin. At least 5 independent experiments were performed at each experimental condition. Control experiments for the effect of media on differentiation of Dil-acLDL CD133<sup>+</sup> cells included co-cultures with PAEC in SMCGM and co-cultures with PASMC in ECGM.

In a second set of experiments, co-cultures were performed using a device (Nunc, Nalge Nunc International, Roskilde, Denmark) that maintained both cell lines separated by a membrane (pore size 0.2  $\mu$ m) that allows the transit of molecules but not cells. Mature cells, PAEC or PASMC, were cultured in 24-well fibronectin plates for 6 and 12 days as previously described. Labeled progenitor cells were put into device chambers and then inserted inside wells containing mature cells.

#### 2.4. Characterization of differentiated CD133<sup>+</sup> cells in co-cultures

Co-cultures of PAEC with Dil-acLDL-labeled CD133<sup>+</sup> cells were incubated with FITC-labeled UEA (Sigma-Aldrich) overnight at 4 °C in the dark and examined under fluorescence microscope. Cells positive for both FITC-UEA and Dil-acLDL were judged to be endothelial cells which have differentiated from CD133<sup>+</sup> cell. These co-cultures were also incubated with primary antibodies against CD31, vWF and CD34.

To evaluate the differentiation of CD133<sup>+</sup> cells into smooth muscle cells, the co-culture of PASMC with Dil-acLDL-labeled CD133<sup>+</sup> cells was assessed for the expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin and desmin. Also these co-cultures were assessed for negativity for CD31 and UEA.

Differentiation of Dil-acLDL labeled cells was quantified by flow cytometry and under fluorescence microscope. For flow cytometric analysis, the percentage of double positive cells, and then UEA<sup>+</sup>/Dil-acLDL-labelled cells, in both types of co-cultures was determined with a FACSCalibur flow

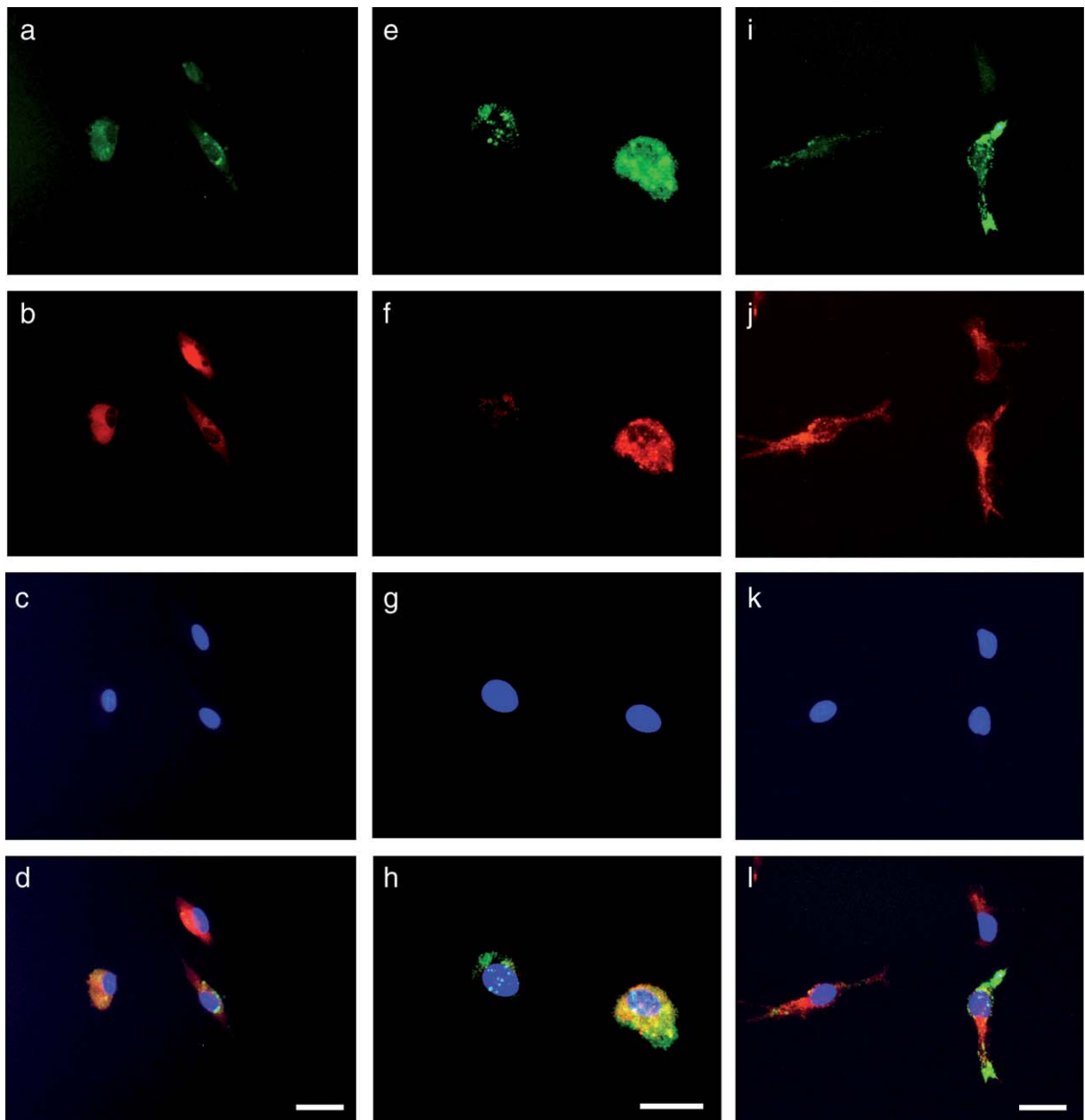


Fig. 1. Differentiation of CD133<sup>+</sup> cells after 12 days of culture in fibronectin plates. Cells were assessed for the affinity to UEA (green) and the ability of LDL uptake (red). Progenitor cells were cultured with ECGM (a-d), with ECGM supplemented with VEGF (e-h) or with Endocult<sup>®</sup> medium (i-l). Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Merged images (d,h,l). Scale bar, 20  $\mu$ m.

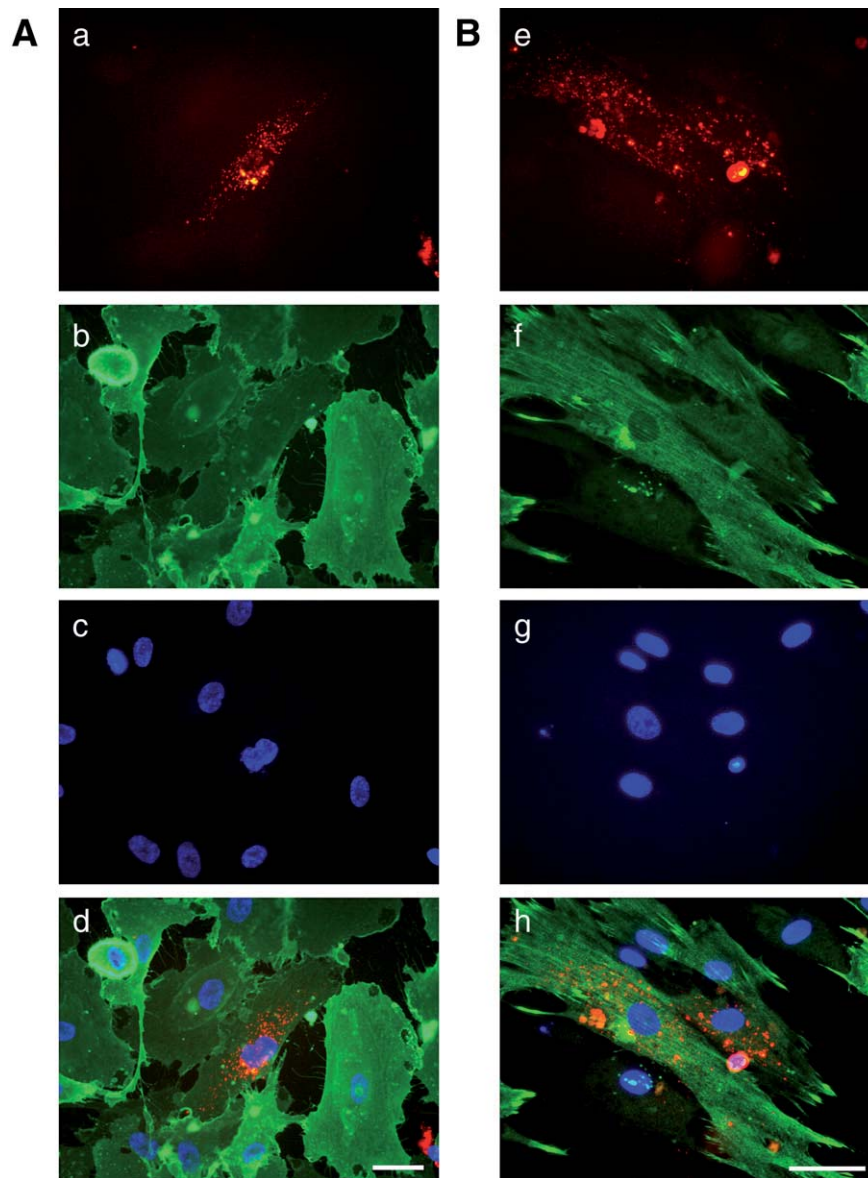


Fig. 2. Co-culture of progenitor cells with mature cells. A) Dil-acLDL-labeled  $CD133^+$  cells (red) after 12 days of co-culture with PAEC (a). Co-cultures were stained with UEA (green), which is specific for mature endothelial cells (b). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI (c). Merged images (d). Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ . B) Dil-acLDL-labeled  $CD133^+$  cells (red) after 12 days of co-culture with PASMC (e). Co-cultures were immunostained with a monoclonal antibody against SMC  $\alpha$ -actin (green), which is specific for SMC (f). In blue, nuclei were counterstained with DAPI (g). Merged images (h). Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ .

cytometer. For two-color flow cytometry,  $8 \times 10^4$  cells were incubated with UEA-FITC at 4 °C for 1 h. Then cells were washed in PBS containing 1% heat-inactivated FCS and 0.1% sodium azide. Cells were analyzed with CellQuest software (BD Biosciences, Immunocytometry Systems). Each analysis included at least 5000–10,000 events. A light-scatter gate was set up to eliminate cell debris from the analysis. For fluorescence microscope analysis, double positive cells were counted over a total of 200 cells, and then SMC  $\alpha$ -actin<sup>+</sup> filaments/Dil-acLDL-labeled cells for PASMC- $CD133^+$  cell co-cultures or UEA<sup>+</sup>/Dil-acLDL-labeled cells for PAEC- $CD133^+$  cell co-cultures.

### 2.5. Cultures of explanted PA with $CD133^+$ cells

Intralobar pulmonary arteries (1 to 1.5 mm diameter) were dissected from human lungs ( $n=5$ ), obtained at lung resection for bronchogenic carcinoma. From each lung specimen, two 3 cm-long segments of PA were isolated under microscope in a laminar flow hood and cultured in ECGM for 3 h at 37 °C in 5%  $\text{CO}_2$ . Then, Dil-acLDL labeled  $CD133^+$  cells were injected using a 2 ml syringe with a 19G needle into the arterial lumen. The ends of arteries remained opened in order to improve gas exchange. The artery with  $CD133^+$  cells inside was left in ECGM at 37 °C in 5%  $\text{CO}_2$  for 2 and 4 days. Five independent experiments were



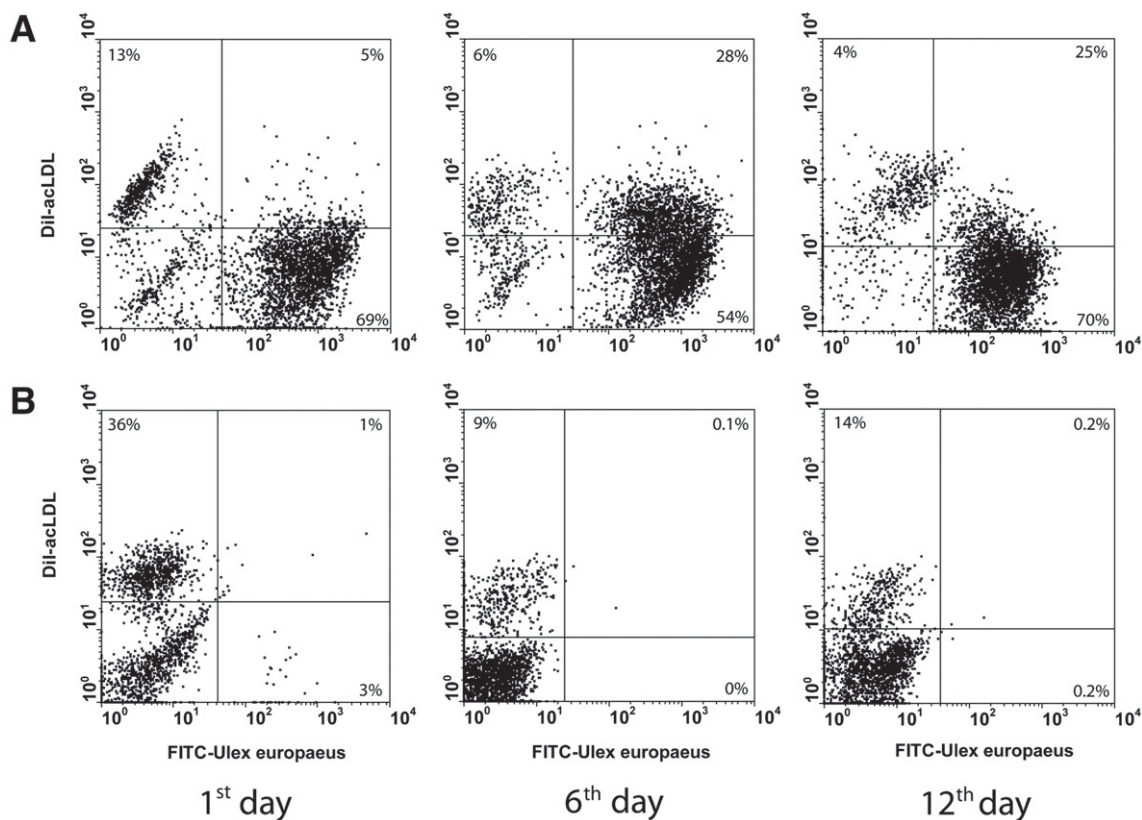


Fig. 3. Representative flow cytometric analysis from co-cultures of Dil-acLDL labeled CD133<sup>+</sup> cells with PAEC (A) and PASM (B) after 1, 6 and 12 days. A) After 6 days, more than 28% of Dil-acLDL labeled cells of total cells in co-culture were double positive for UEA and Dil-acLDL. B) Any Dil-acLDL positive cells showed affinity to UEA at day 6 or at day 12.

performed. The endothelium of PA was dissected as previously described [17]. Some segments of arteries were fixed in 4% paraformaldehyde, cryoembedded in O.C.T and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for immunofluorescence analysis; the remaining ones were fixed with 2% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde for transmission electron microscopy (TEM).

Differentiation of CD133<sup>+</sup> cells over the endothelial surface was characterized morphologically and by immunofluorescence using antibodies against vimentin, CD31, and CD34. Differentiation of CD133<sup>+</sup> cells in the intima was assessed on cryostat sections of artery rings immunostained with an antibody against human  $\alpha$ -SMC actin and by TEM. Under TEM, progenitors cells were identified by the content of LDL into the cytosol, since LDL particles can be seen as homogenous and dense vesicles.

Studies in human lung specimens had been approved by the Institutional Review Board and written informed consent was obtained from the patients before surgery.

## 2.6. Fluorescence *in situ* hybridization

Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) for chromosome X and 15 were used to detect fused nuclei in harvested endothelia from pulmonary arteries ( $n=5$ ). We

used commercially available probes labeled with FITC to detect the number of chromosomes X or 15 (Q-biogen Inc, Vista, CA) in interphase nuclei. Paraformaldehyde-fixed endothelia were mounted on poly-L-lysine treated slides. Nuclei with two or more dots were counted in 5 randomly areas and expressed as percentage of total nuclei.

## 2.7. RT-PCR

Total RNA was extracted from culture cells using a commercially available kit (Trizol Reagent; Life Technologies, GIBCO BRL; Carlsbad, CA).

## 2.8. Immunohistochemistry

For intercellular proteins, cells were permeabilized with 0.5% Triton X-100 for 30 min except when Dil-AcLDL was used. After blocking with non immune serum for 1 h, we used the following primary mouse monoclonal antibodies: CD45 (1:750 dilution; Novocastra Laboratories Ltd., Burlingame, CA), CD133 (1:10 Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany), Vimentin (1:1000 dilution; DAKO Cytomation, Carpinteria, CA), CD34 (1:150 dilution; Novocastra Laboratories Ltd), CD31 (1:200 dilution; DAKO Cytomation), VEGFR2 (1:200 dilution; Santa Cruz



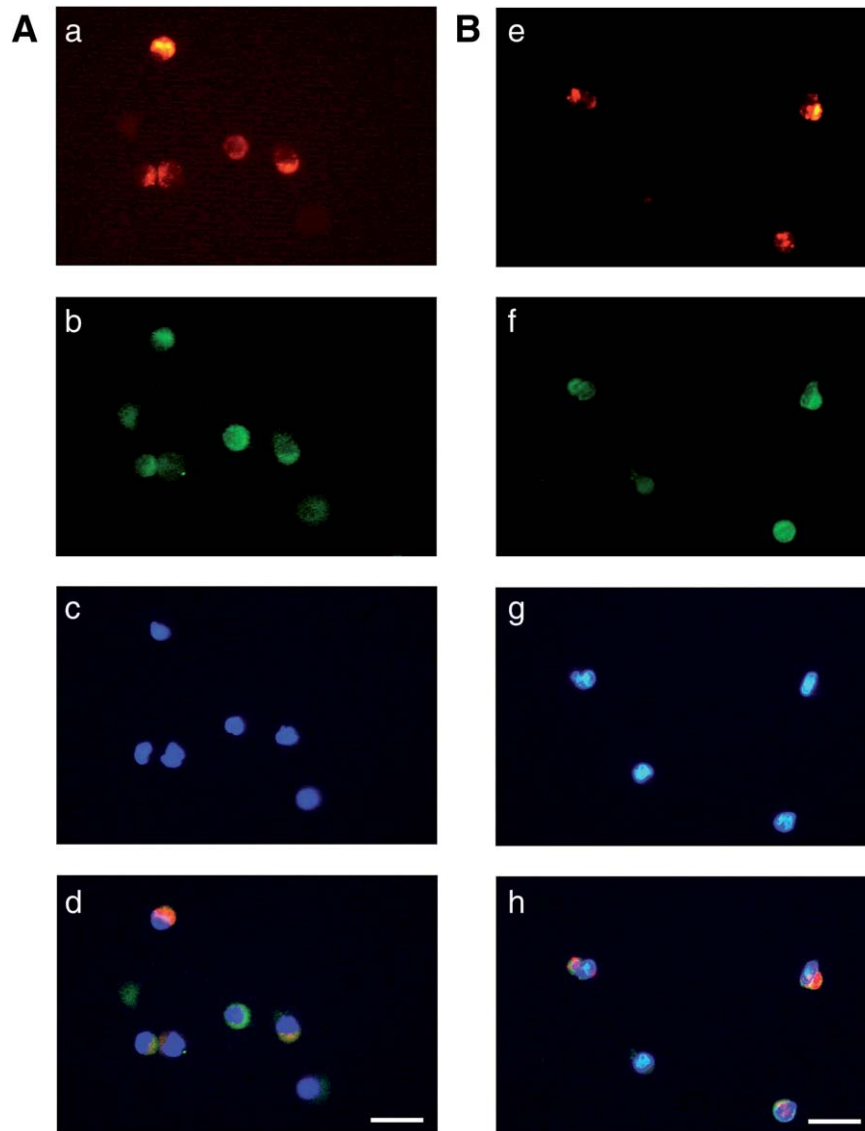


Fig. 4. Co-cultures of Dil-acLDL-labeled progenitor cells with PAEC (A) and PASMC (B) using a device maintaining both cell lines separated by a membrane. b) After 12 days progenitors were stained with FITC-UEA for cells cultured with PAEC or f) stained with SMC  $\alpha$ -actin for cells cultured with PASMC. c,g) Nuclei were stained with DAPI. d,h) Merged images. Scale bar, 20  $\mu$ m.

Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA), vWF (1:150 dilution; Dako Cytomation), Desmin (1:200 dilution; DAKO Cytomation),  $\alpha$ -smooth muscle actin (1:750 dilution; DAKO Cytomation). All incubations were performed overnight at 4 °C in the dark. Then, cells were washed 3 times with PBS and incubated for 1 h at RT with the secondary antibody against mouse conjugated with indocarbocyanine (Cy3) (1:200 dilution; Jackson Immuno Research, West Grove, PA) or conjugated with FITC fluorescein (1:200 dilution; Jackson Immuno Research). After three washes, nuclei were stained for 5 min with DAPI, mounted with a fluorescence mounting media (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA) and visualized by a fluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

### 3. Results

#### 3.1. *In vitro* differentiation of CD133<sup>+</sup> cells

After 12 days of culture, CD133<sup>+</sup> cells cultured alone in ECGM (Fig. 1) showed low affinity for the specific endothelial cell marker UEA, although they did not acquire morphology of PAEC. Supplementation with vascular endothelial growth factor (VEGF) or with a cocktail of cytokines improved the signal intensity for UEA, although the size and shape of the cells remained different from mature PAEC (Fig. 1). No differentiation of CD133<sup>+</sup> cells into SMC was observed when they were cultured alone with SMCGM.

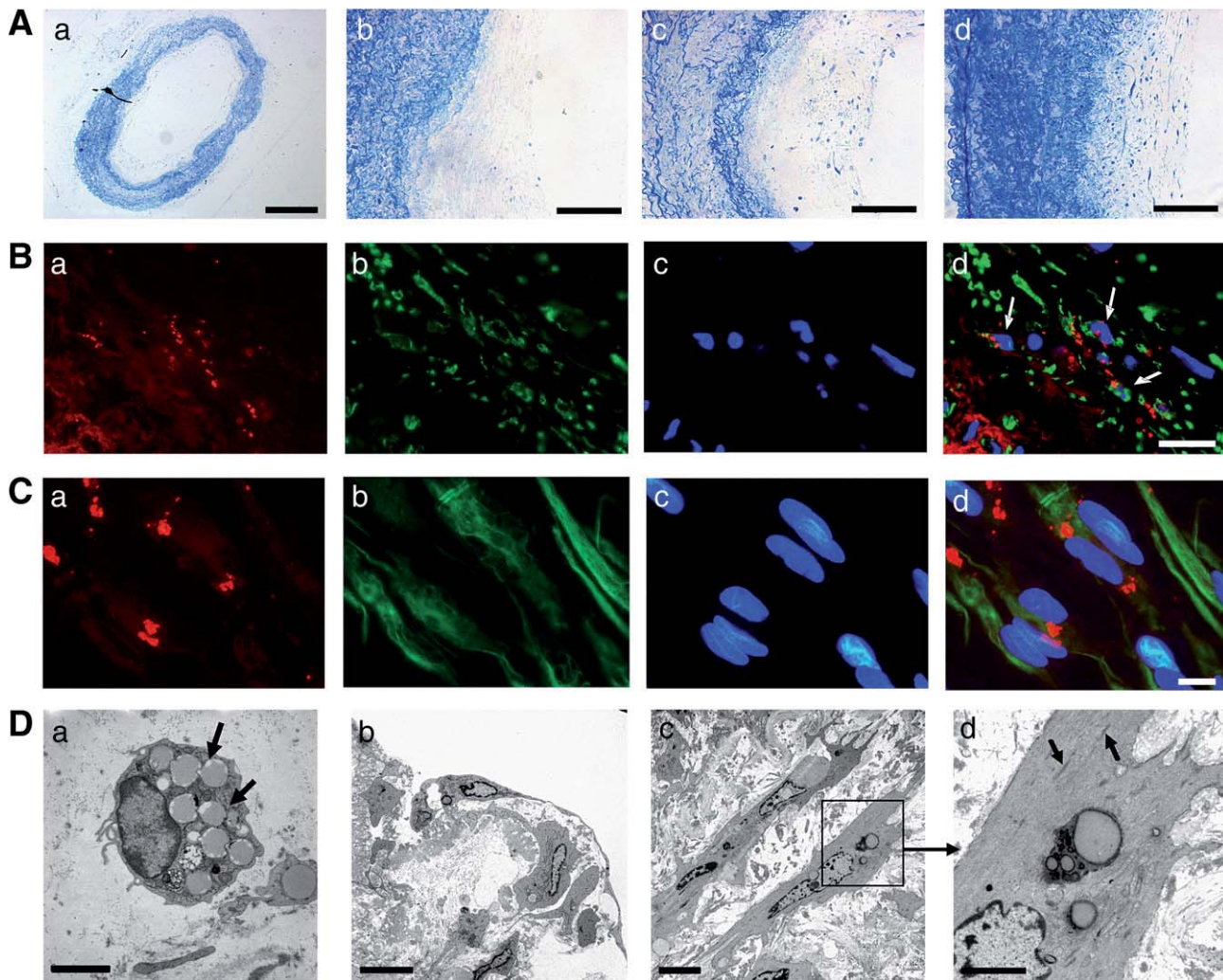


Fig. 5. A) Transverse sections of a human PA co-incubated with CD133<sup>+</sup> cells. a) Transverse section at low magnification of a representative pulmonary artery. Scale bar, 400  $\mu$ m. b) Control section without progenitor cells. c) An artery section after two days of incubation with progenitors. Many cells, with rounded shape, are infiltrating the intima. d) Transverse section of a PA segment after 4 days of incubation with progenitors. Many cells have migrated through the intima towards the media. The progenitor cell shape changes from round to large and flat. Methylene blue stain. Scale bar in b, c and d, 100  $\mu$ m. B) Immunofluorescence of a transverse section of a human PA after 4 days of co-incubation with Dil-acLDL-labeled CD133<sup>+</sup> cells. a) The red fluorescent tracer identifies the progenitor cells infiltrating the intima b) In green is shown the fluorocrom FITC revealing the immunoreaction against SMC  $\alpha$ -actin. c) The nuclei are stained with DAPI d) merged image showing double positive cells (arrows) indicating differentiation of progenitor cells into smooth muscle cells. Scale bar, 20  $\mu$ m. C) Immunofluorescence of an endothelial surface of a human PA after 2 days of co-incubation with Dil-acLDL-labeled CD133<sup>+</sup> cells. a) The red fluorescent tracer identifies the progenitor cells b) In green is shown the fluorocrom FITC revealing the immunoreaction against vimentin. c) The nuclei are stained with DAPI d) merged image showing double positive cells indicating differentiation of progenitor cells into endothelial cell. Scale bar, 10  $\mu$ m. D) Transmission electron microscopy of a transverse section of a human PA co-incubated with LDL-labeled progenitor cells. LDL can be identified as dense and homogenous vesicles in the cytoplasm. a) A progenitor cell not yet differentiated showing a great number of LDL vesicles inside cytoplasm (arrows). Scale bar, 2  $\mu$ m. b) A progenitor, identified by a large cytoplasmic vesicle, is integrating in the endothelium. Scale bar, 5  $\mu$ m. c) Some progenitors can be identified infiltrating the intima. Scale bar, 5  $\mu$ m. d) A greater magnification of a progenitor infiltrating the intima touching the elastic internal lamina. In this micrograph showing a longitudinal section of a progenitor cell, the dense bodies (arrows), characteristic of smooth muscle cells, are well preserved. Scale bar, 2  $\mu$ m.

### 3.2. Co-culture of CD133<sup>+</sup> cells with PAEC and PASMCM

After 6 days of co-culture with PAEC, many Dil-acLDL labeled cells had integrated with them. These labeled cells displayed significant increases of their cell length and surface area, similar to adjacent mature cells (Fig. 2A). More than 28% of total cells in co-culture were double positive for UEA and Dil-acLDL (about 85% of Dil-acLDL labeled

cells) as revealed by FACs (Fig. 3). Rounded mononuclear cells that remained undifferentiated were negative for UEA (data not show). Dil-acLDL labeled cells also differentiated in endothelial cells in this co-culture when they were incubated with SMCGM instead of ECGM.

As in co-cultures with PAEC, after 6 days of co-culture with PASMCM, integrated Dil-acLDL labeled cells adopted a similar size and shape of adjacent mature cells. Under

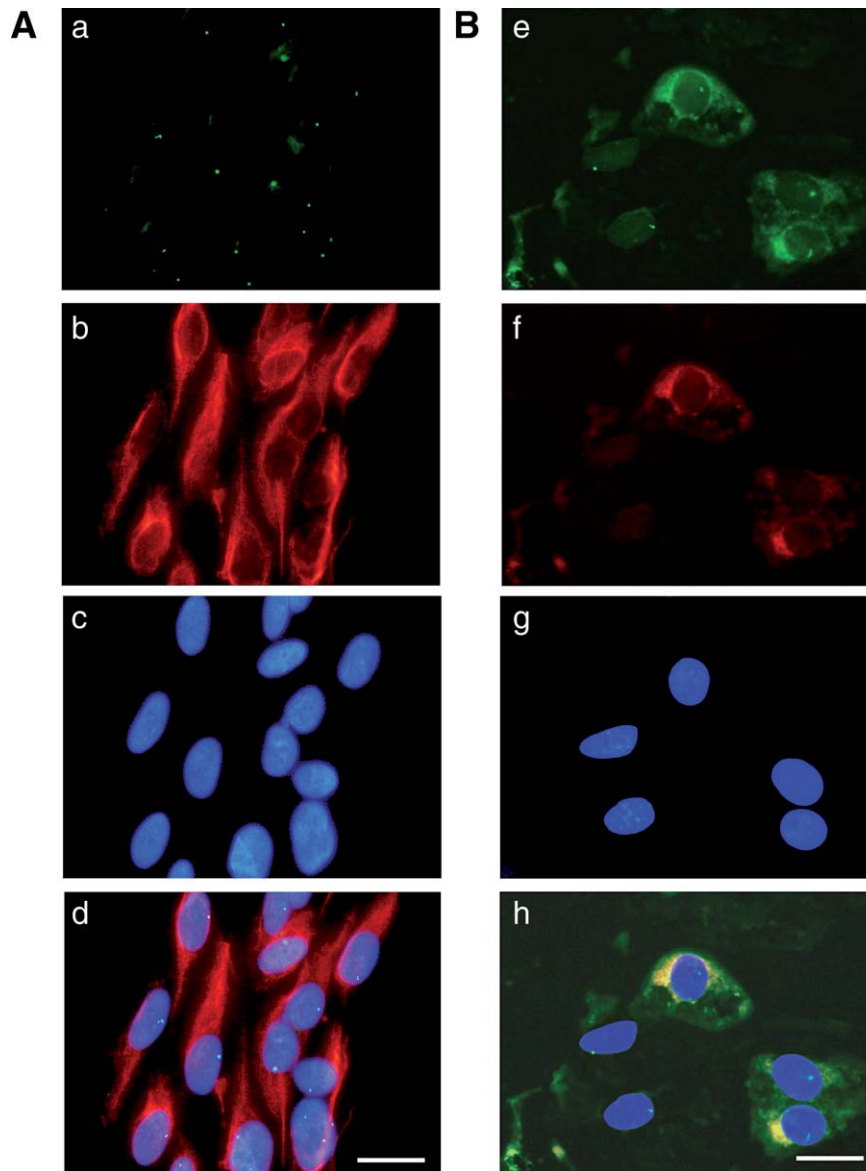


Fig. 6. Immunofluorescence of human male PA endothelium. *In situ* hybridization was performed using a probe to identify chromosome X. A) Normal endothelium of a PA. a) In green (FITC) is shown the chromosome X of nuclei in interphase. b) The cytoskeleton of endothelial cells was revealed using an antibody against vimentin and revealed with a secondary antibody linked to the fluorochrome Cy3. c) Nuclei were stained with DAPI. The fusion of two nuclei can be observed in the image. d) Merged images. Some nuclei show more than one copy of chromosome X indicating that they are polyploid. Scale bar, 15  $\mu\text{m}$ . B) Progenitor cells differentiating on the endothelium of a PA. e) Green dots on nuclei identify the chromosome X. The cytoskeleton of cells was revealed using an antibody against vimentin and revealed with a secondary antibody linked to the fluorochrome FITC. f) The red fluorescent tracer identifies the progenitor cells g) Nuclei are stained with DAPI. h) Merged images. None of the nuclei show more than one copy of chromosome X indicating that there is not fusion between cells during differentiation. Scale bar, 15  $\mu\text{m}$ .

fluorescence microscope, Dil-acLDL labeled cells expressed SMC proteins such as specific SMC  $\alpha$ -actin (Fig. 2B) and desmin but not CD31 or affinity to UEA. The percentage of Dil-acLDL labeled cells showing  $\alpha$ -actin organized filaments ranged between 8% and 9% of total SMC. Any Dil-acLDL-positive cells in this co-culture showed affinity to UEA neither at day 6 nor at day 12 (Fig. 3) (see online supplementary material). Dil-acLDL labeled cells also differentiated in smooth muscle cells in this co-culture when they were incubated with ECGM instead of SMCGM.

### 3.3. Co-cultures of human $CD133^+$ cells with mature cells separated by a trans-well membrane

In the double chamber devices,  $CD133^+$  cells acquired the phenotype of mature cells cultured in the other side of the membrane, and all cells showed affinity for UEA when co-cultured with endothelial cells and  $\alpha$ -actin when co-cultured with smooth muscle cells. The inverse stain was negative for both cultures. The morphology after 12 days was similar to that observed after 12 days when progenitors were cultured alone (Fig. 4).



### 3.4. Differentiation of CD133<sup>+</sup> cells in explanted pulmonary arteries

Fig. 5A shows different sections of a PA incubated with Dil-acLDL labeled CD133<sup>+</sup> cells. Two days after injecting CD133<sup>+</sup> cells into the arterial lumen, a number of mononuclear cells were localized in the intima. The majority of them preserved the original morphology and remained close to the endothelial surface. After 4 days of co-incubation, cells acquired a more elongated morphology and the majority of them were localized in the intima towards the media.

Immunofluorescence studies performed on transverse sections revealed that some Dil-acLDL labeled cells confined into the intima were immunoreactive for smooth muscle  $\alpha$ -actin indicating differentiation into SMC (Fig. 5B). By contrast, Dil-acLDL-labeled cells adhered to the endothelium acquired an endothelial-like morphology and expressed the endothelial cell markers CD31 and vimentin (Fig. 5C).

Sections of pulmonary arteries co-incubated with acLDL-labeled CD133<sup>+</sup> cells were examined by electronic microscopy (Fig. 5D). CD133<sup>+</sup> cells were identified by the presence of large LDL vesicles in the cytosol. Some labeled cells, attached to the luminal surface, showed endothelial cell morphology; whereas cells located in the intima showed smooth muscle cell-like morphology. Some cells infiltrating the intima showed apparent dense bodies characteristic of smooth muscle cell filaments [19]. Interestingly, acLDL-labeled cells infiltrating the intima were preferentially localized close to denuded areas of endothelium.

### 3.5. Cell fusion evaluation

ImmunoFISH analysis revealed the presence of some scattered polyploid nuclei in pulmonary endothelia (Fig. 6A) (see online supplementary material). The presence of tetraploid nuclei was not uniform over the extension analyzed. The number of fused nuclei ranged between 5 and 10% indicating that fusion was not a rare event. We also performed immunoFISH looking for polyploid nuclei on endothelial layers after incubation with Dil-acLDL labeled CD133<sup>+</sup> cells, as described in the preceding section. In this case, we did not find fused nuclei within labeled CD133<sup>+</sup> cells indicating that the mature phenotype was acquired by transdifferentiation (Fig. 6B). Moreover, in electronic microscope studies we did not observe membrane fusions between progenitor and mature cells, further supporting the findings of *in situ* hybridization.

## 4. Discussion

In a previous study [17] we observed an increased number of CD133<sup>+</sup> cells in PA of COPD patients. Positive cells were not only confined to the endothelial surface but also identified in the vessel wall, thus suggesting that these cells could play a role in pulmonary vessel remodeling. In this report, performed *in vitro* and in explanted human PA,

we provide evidence of the plasticity of CD133<sup>+</sup> cells to differentiate into both endothelial and smooth muscle cells.

The differentiation process of bone-marrow derived vascular progenitor cells was mimicked with the simplest scenario found in the arterial wall by co-culturing adult human PASMC or PAEC with CD133<sup>+</sup> cells. In these experiments, the fate of CD133<sup>+</sup> cells was conditioned by the type of mature cell they were co-cultured with, evidencing the plasticity of CD133<sup>+</sup>. Evidence of the multipotentiality of CD133<sup>+</sup> cells has been previously provided by Torrente and co-workers [14] who demonstrated their differentiation into skeletal muscle cells when co-cultured in the presence of a feeder layer of myogenic cells.

Presumably, mature cells in co-culture may act as a source of cytokines and growth factors that modulate the differentiation process. This was deduced from co-cultures of progenitor and mature cells, separated by a trans-well membrane (pore size 0.2  $\mu$ m). In this setting, CD133<sup>+</sup> cells acquired markers of mature cell when they were incubated separately from PAEC or PASMC. Yet, these factors were insufficient to induce morphological changes, hence showing the crucial role of cell-to-cell contact for morphology acquisition. At present, we have not identified the molecules, namely growth factors and cytokines, which may participate in the mechanisms of differentiation *in vitro* or *in vivo*. Previous studies have shown that common vascular progenitor cells may give rise to endothelial cells *in vitro* upon exposure to supplemental VEGF [13,20,21], and to SMCs when treated with platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) [22]. In these experiments, the formation of early outgrowth endothelial colonies is produced after 8–9 days of incubation whereas in our studies, full cell differentiation was already apparent at day 6 of co-culture. In this respect, we also observed that isolated CD133<sup>+</sup> cells incubated with a supplement of VEGF differentiated into endothelial-like cells after 12 days. We observed a better signal intensity for endothelial cell markers when cells were incubated with a cocktail of cytokines, suggesting that complementary co-stimulation with other growth factors, a condition closer to the physiological environment, may accelerate the effect of VEGF on endothelial differentiation.

After checking *in vitro* the capability of CD133<sup>+</sup> cells to differentiate into both endothelial and smooth muscle cell types, we aimed to explore the dynamics of spontaneous cell differentiation in co-cultures of human CD133<sup>+</sup> injected into the lumen of explanted human PA. In this setting, mature cells of the endothelium or the intima might provide the micro-environment that could be crucial in determining the fate of CD133<sup>+</sup> cells. Initially we selected a PA from a patient with severe COPD. That PA showed a prominent intima and denuded endothelium. When progenitor cells were co-incubated with the PA, we expected to find many progenitor cells repopulating the endothelium. However, a number of CD133<sup>+</sup> cells migrated through the intima towards the media (Fig. 5A). During the 4 days of co-incubation, a gradual change in morphology from round to

large and flat shape was observed in labeled cells, indicating that progenitor cells undergo trans-differentiation into smooth muscle-like cells. This was further supported by the identification of SMC  $\alpha$ -actin expression. Furthermore, electron microscope analysis revealed a few progenitor cells, identified by the presence of LDL vesicles in the cytoplasm, fully integrated within cells of the media. All together, these results show that CD133<sup>+</sup> cells are capable to migrate from the lumen into the intima and differentiate into SMC, at least in remodeled PA from COPD. We also incubated progenitor cells with PA with a more preserved endothelium. Interestingly, in these cases only few cells migrated into the intima. CD133<sup>+</sup> cells integrated within the endothelium acquired endothelial cell morphology (Fig. 5D). In the other hand, cells that migrated into the intima were close to endothelial fenestrations indicating that CD133<sup>+</sup> cells might have reached the intima through these areas and that endothelium may operate in two ways, releasing local mediators for cell differentiation and as a physical barrier to cell migration towards the intima. In these respect, our experiments confirm that endothelial cell damage or endothelial denudation is crucial for the progression of pulmonary vascular remodeling in COPD [17,23]. This observation is in line with evidences showing that contribution of recruited hematopoietic stem cells to vascular remodeling is strongly enhanced by tissue injury [24–26].

It has been demonstrated that adult bone marrow cells in culture can be driven to differentiate into many different cell types, including hepatocytes, cardiomyocytes, skeletal muscle and neurons. However, there has been considerable controversy regarding their contribution to non-hematopoietic tissues *in vivo*. In fact, adult bone marrow cells might not be able to transdifferentiate autonomously, but instead this might depend on cell fusion to achieve the differentiated state [27,28]. We also wondered whether circulating CD133<sup>+</sup> cells can regenerate tissues *in vivo* by fusion with differentiated cells or if they might differentiate into mature cells without cell contact with other mature cells. For this reason, we first screened pulmonary endothelium for polyploid nuclei in order to check whether fused cells might arise spontaneously in normal tissue. *In situ* hybridization revealed the presence of scattered polyploid nuclei (Fig. 6A) in PA endothelium, indicating that fusion is not a rare event in endothelial cells. However, cell fusion appears to be restricted to mature cells since in co-cultures or when progenitors were co-incubated with explanted PA we did not observe the intermediate formation of multi-nucleated cells (Figs. 5C and 6B). Moreover, in PA, some progenitor cells differentiated alone, without apparent contact with other cells. Despite we have not found multinucleated cells during differentiation of progenitors, we cannot rule out the possibility that *in vivo* the two processes may occur together. In either case, the mature cell seems to provide a direction or orientation that is necessary to restore the injured tissue.

In summary, our data demonstrate that CD133<sup>+</sup> cells are capable of committing themselves to more than one lineage

given the right environmental cues. This means that CD133<sup>+</sup> cells lying in the luminal surface of pulmonary arteries can differentiate into endothelial cells or they can migrate into the intima and differentiate into smooth muscle cells. In pulmonary arteries, growth factors embedded in the extracellular matrix and/or the contact with resident cells might exert a strong signal to cell differentiation into smooth muscle cell or endothelial cell. Such differentiation seems to be conducted without evidence of cell fusion. Exploration of the growth factors and adhesion molecules that underlie the linkage between CD133<sup>+</sup> differentiation and intimal thickening in injured arteries is important to better understand the mechanisms of vascular repair and, perhaps, may lead to novel approaches for the prevention of vascular remodeling.

### Acknowledgments

We thank Blanca Reyes and Isabel Crespo for their expert technical assistance. The authors also thank the Servei Científic Tècnic from the Universitat de Barcelona, specially to Nuria Cortadellas and Almudena García, for their assistance in TEM studies. This work has been supported by grants FIS 03/0549 and 06/0360, SEPAR-2005, MTV 04-310 and EU IP-018725 (Pulmotension). The group is integrated into the cibeRes (ISCIII CB06/06).

### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.cardiores.2007.08.007](https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2007.08.007).

### References

- [1] Wilkinson M, Langhorne CA, Heath D, Barer GR, Howard P. A pathophysiological study of 10 cases of hypoxic cor pulmonale. *Q J Med* 1988;66:65–85.
- [2] Wright JL, Petty T, Thurlbeck WM. Analysis of the structure of the muscular pulmonary arteries in patients with pulmonary hypertension and COPD: national Institutes of Health nocturnal oxygen therapy trial. *Lung* 1992;170:109–24.
- [3] Arciniegas E, Ponce L, Hartt Y, Graterol A, Carlini RG. Intimal thickening involves transdifferentiation of embryonic endothelial cells. *Anat Rec* 2000;258:47–57.
- [4] Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circ Res* 2002;90:1189–96.
- [5] Sartore S, Chiavegato A, Faggini E, Franch R, Puato M, Ausoni S, et al. Contribution of adventitial fibroblasts to neointima formation and vascular remodeling: from innocent bystander to active participant. *Circ Res* 2001;89:1111–21.
- [6] Shi Y, O'Brien JE, Fard A, Mannion JD, Wang D, Zalewski A. Adventitial myofibroblasts contribute to neointimal formation in injured porcine coronary arteries. *Circulation* 1996;94:1655–64.
- [7] Sata M. Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling, and lesion formation. *Trends Cardiovasc Med* 2003;13:249–53.
- [8] Archer SL, Huang JM, Reeve HL, Hampl V, Tolarova S, Michelakis E, et al. Differential distribution of electrophysiologically distinct myocytes in conduit and resistance arteries determines their response to nitric oxide and hypoxia. *Circ Res* 1996;78:431–42.
- [9] Frid MG, Aldashev AA, Dempsey EC, Stenmark KR. Smooth muscle cells isolated from discrete compartments of the mature vascular media

- exhibit unique phenotypes and distinct growth capabilities. *Circ Res* 1997;81:940–52.
- [10] Frid MG, Aldashev AA, Nemenoff RA, Higashito R, Westcott JY, Stenmark KR. Subendothelial cells from normal bovine arteries exhibit autonomous growth and constitutively activated intracellular signaling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2884–93.
- [11] Caprioli A, Jaffredo T, Gautier R, Dubourg C, Dieterlen-Lievre F. Blood-borne seeding by hematopoietic and endothelial precursors from the allantois. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:1641–6.
- [12] Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, et al. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 2000;95:952–8.
- [13] Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, et al. *In vitro* differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000;95:3106–12.
- [14] Torrente Y, Belicchi M, Sampaolesi M, Pisati F, Meregalli M, D'Antona G, et al. Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. *J Clin Invest* 2004;114:182–95.
- [15] Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, et al. Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 2002;416:542–5.
- [16] Hayashida K, Fujita J, Miyake Y, Kawada H, Ando K, Ogawa S, et al. Bone marrow-derived cells contribute to pulmonary vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Chest* 2005;127:1793–8.
- [17] Peinado VI, Ramírez J, Roca J, Rodríguez-Roisin R, Barberà JA. Identification of vascular progenitor cells in pulmonary arteries of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;34:257–63.
- [18] Palange P, Testa U, Huertas A, Calabro L, Antonucci R, Petrucci E, et al. Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells are decreased in COPD. *Eur Respir J* 2006;27:529–41.
- [19] Cross PC, Mercer KL. Muscle. In: Freeman WH, editor. *Cell and tissue ultrastructure. A functional perspective*. New York: W.H. Freeman and Company; 1993. p. 95–121.
- [20] Kanayasu-Toyoda T, Yamaguchi T, Oshizawa T, Hayakawa T. CD31 (PECAM-1)-bright cells derived from AC133-positive cells in human peripheral blood as endothelial-precursor cells. *J Cell Physiol* 2003;195:119–29.
- [21] Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 2000;105:71–7.
- [22] Shoji M, Sata M, Fukuda D, Tanaka K, Sato T, Iso Y, et al. Temporal and spatial characterization of cellular constituents during neointimal hyperplasia after vascular injury: potential contribution of bone-marrow-derived progenitors to arterial remodeling. *Cardiovasc Pathol* 2004;13:306–12.
- [23] Peinado VI, Barberà JA, Ramírez J, Gómez FP, Roca J, Jover L, et al. Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild COPD. *Am J Physiol, Lung Cell Mol Physiol* 1998;18:L908–13.
- [24] Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, et al. Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2 (+)AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* 2001;88:167–74.
- [25] Lee SH, Wolf PL, Escudero R, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Early expression of angiogenesis factors in acute myocardial ischemia and infarction. *N Engl J Med* 2000;342:626–33.
- [26] Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, et al. Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 2002;8:403–9.
- [27] Balsam LB, Wagers AJ, Christensen JL, Kofidis T, Weissman IL, Robbins RC. Haematopoietic stem cells adopt mature haematopoietic fates in ischaemic myocardium. *Nature* 2004;428:668–73.
- [28] Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, Weissman IL. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells. *Science* 2002;297:2256–9.



## Supplementary Material

### **PLASTICTY OF CD133<sup>+</sup> CELLS: ROLE IN PULMONARY VASCULAR REMODELING.**

**Marta Díez, Joan A. Barberà, Elisabet Ferrer, Raquel Fernández-Lloris, Sandra Pizarro, Josep Roca, Víctor I. Peinado**

*Department of Pulmonary Medicine, Hospital Clínic; Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS); Ciber de Enfermedades Respiratorias; Universitat de Barcelona; Barcelona, Spain.*

#### **Expanded Materials and Methods**

##### **Cell primary cultures**

The human hematopoietic progenitor cell line CD133<sup>+</sup> obtained from Cambrex Bio Science (Walkersville, MD) was used for the experiments. Before using, CD133<sup>+</sup> cells were expanded for 10 days in flasks of 25 cm<sup>2</sup> (TPP) at a density of 1x10<sup>5</sup> cells/mL in stem span medium supplemented with Flt-3ligand (100 ng/ml), StemCell factor (100 ng/ml) and Thrombopoietin (100 ng/ml) (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada) at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. The medium was changed every 5 days of culture. Only cells in the supernatant were used for the experiments. The viability at the end of culture ranged between 92 and 98%.

The PAEC line was purchased from American Type Culture Collection (HPAE-26, ATCC, Manassas, VA). Cells were plated in 0.1% gelatin-coated flask of 25 cm<sup>2</sup> at a density of a 1x10<sup>5</sup> cells/ml and cultured in endothelial cell growth medium (ECGM) composed of F-12K nutrient mixture (GIBCO BRL, Grand Island, NY) supplemented with 10% FBS, penicillin/streptomycin (100 U/ml), heparin (0,1 mg/ml) and endothelial cell growth factor (0,03 mg/ml), under standard conditions and the medium was changed every 3 days. The



cells were grown until confluence and they were expanded by passing a 1:3 split. For all experiments, PAEC were used at passage 2-4.

The PASMC line was obtained from Cambrex Bio Science. Cells were plated in flasks of 25 cm<sup>2</sup> at a density of a 1x10<sup>5</sup> cells/ml and cultured in smooth muscle cell growth medium (SMCGM) composed of SMC basal medium (Clonetics, Cambrex) supplemented with 5% FBS, insulin, human fibroblast growth factor (hFGF-B), gentamicine/amphotericin-B and human epidermal growth factor (hEGF) (SmGM-2 SingleQuots, Clonetics, Cambrex). The cultured media was changed every 72 h. The cells were grown until confluence and they were expanded by passing a 1:3 split. For all experiments, PASMC were used at passage 2-3.

### **Characterization of primary lines**

After expansion, the hematopoietic progenitor cell phenotype was assessed by immunofluorescence by the expression of CD45, CD133, CD34, CD31, VEGF2, vWF and vimentin markers. The transcriptional expression of genes related with the hematopoietic lineage, CD45, CD34, CD133, VEGFR2, c-kit, and vimentin were also evaluated by reverse-transcriptase (RT)-PCR and characterized for specific cell markers (Fig. 1). The expression of CD133 and CD45 in expanded hematopoietic progenitor cells were also assessed by flow cytometry (Fig. 2)

The phenotype of PAEC was characterized by the LDL-uptake, affinity to *Ulex europaeus* agglutinin I (UEA), and by the positive or negative expression of vimentin, vWF, CD34, CD133, CD45 and  $\alpha$ -actin. The RNA expression of genes related with the endothelial lineage, CD34, vWF, vimentin, and eNOS were also determined by RT-PCR. For immunofluorescence, cells cultured in fibronectin plates at a density of 1.5x10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup> were fixed in paraformaldehyde 4% for 4h and then permeabilized for 30 min with 0.5% Triton X-100 in PBS. Cells were then incubated overnight at 4°C with primary antibodies.

The phenotype of PASMC was characterized morphologically and by the immunoreactivity to antibodies against  $\alpha$ -smooth muscle actin, and desmin. We paid specially attention to the formation of organized structures of  $\alpha$ -actin filaments to confirm the SMC lineage. The expression of genes related with SMC,  $\alpha$ -SMC actin and the potassium channels Kv1.5 and BKCa were also determined by RT-PCR.

### **Co-culture experiments**

For co-culture experiments, PAEC cells were cultured in 24-well fibronectin plates (BD Biosciences, San Jose, CA) at a density of a  $4 \times 10^4$  cells/well in ECGM. After 48 h of culture, Dil-acLDL CD133<sup>+</sup> cells were added into the wells at a ratio of 1:1 allowing them to differentiate for 6 and 12 days. The medium was renewed every 72 h. At least 5 independent experiments were performed at each experimental condition. Cells positive for both FITC-UEA and DiI-acLDL were judged to be endothelial cells which have differentiated from CD133<sup>+</sup> cell. These co-cultures were also incubated with primary antibodies against CD31, and vWF (Fig. 3).

PASMC were cultured in 24-well fibronectin plates (BD Biosciences) at a density of  $3 \times 10^3$  cells/well in SMCGM for 48 hours. Then Dil-acLDL CD133<sup>+</sup> cells were added into the wells at a ratio of 10:1. Co-cultures were maintained for 6 and 12 days in the dark at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. The medium was renewed every 72 h. As controls, Dil-acLDL-labeled cells were also cultured alone in parallel experiments with appropriate media. After 6 and 12 days, co-cultures were fixed in 4% paraformaldehyde and stained for UEA or  $\alpha$ -SMC actin. These co-cultures were additionally assessed for UEA and CD31 by immunofluorescence (Fig. 4).

As control, CD133<sup>+</sup> cells were cultured alone in parallel to co-culture experiments, with the minimal medium ECGM or SMCGM. In some wells, ECGM was supplemented with VEGF (50ng/ml). In addition, CD133<sup>+</sup> cells were differentiated alone with a medium containing a

cocktail of cytokines specially formulated for differentiation of hematopoietic stem cells into EC (Endocult™, Stem Cell Technologies). Such medium was used according to the manufacturer guidelines.

### **Immunofluorescence *in situ* hybridization**

Probes hybridizing chromosome X or chromosome 15 were used (Fig. 5). The probe and the tissue were co-denaturalized in hybridization solution containing 0.1 mg of probe, 50% formamide, 10% dextran sulphate and 2xSSC at 96°C during 6 min. Then, hybridization was performed overnight at 37°C and washed with 1xSSC three times. Over probe-hybridized tissues, a monoclonal antibody against vimentin was used to stain cytoskeleton of endothelial cells. Nuclei were identified staining tissue samples with DAPI.

### **RT-PCR**

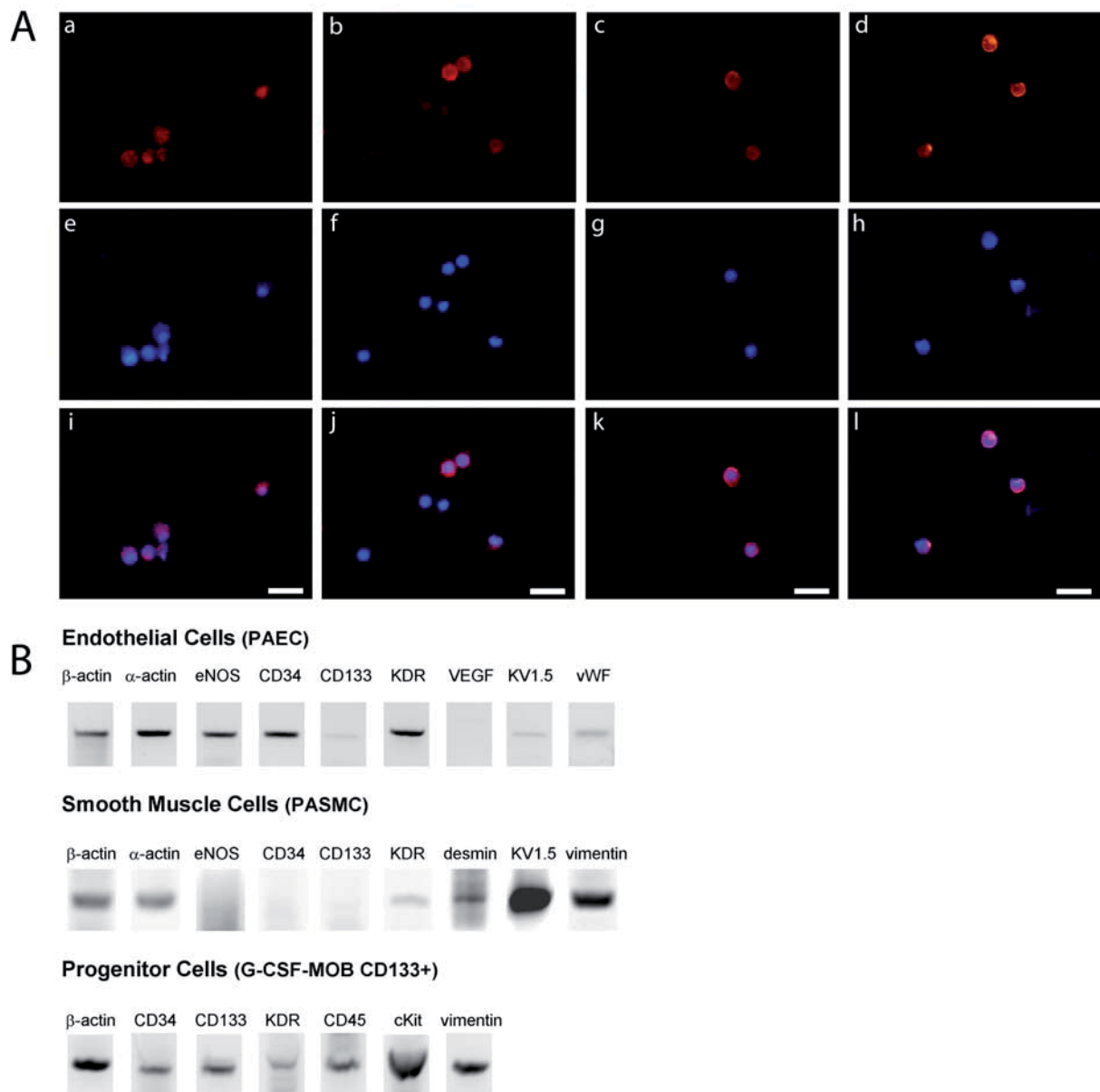
Total RNA was extracted from culture cells using a commercially available kit (Trizol Reagent; Life Technologies, GIBCO BRL; Carlsbad, CA). For reverse transcription (RT), 2.0 µg of total RNA was incubated with random primers using a complementary DNA (cDNA) synthesis kit (Promega, Madison, WI, USA). Briefly, first strand cDNA synthesis was performed at 42°C for 45 minutes in the DNA thermal cycler (PTC-200, MJ Research Inc., Watertown, MA, USA). PCR was done using a DNA amplification reagent kit (Promega). Primers were designed based on human cloned sequences from GeneBank (Online Table 1) using a specific software (Primer Designer, Scientific & Educational Software, Durham, NC). 4 µL of the RT reaction were added to 45µL of a PCR master mix (Promega) containing 5 µL of PCR reaction buffer, 0.075 µmol MgCl<sub>2</sub>, and 50 pmol of primer. The tubes were placed in the DNA thermal cycler (MJ Research, BioRad, Hercules, CA) and a first incubation was

performed at 95°C for 3 minutes. For the different genes this incubation was followed by 39 cycles of the next sequential steps: 30 seconds at 94°C, 60 seconds at the corresponding annealing temperature (Online table 1), and 1 minute at 72°C; finally we ended with an incubation at 75°C for 5 minutes. A negative control of the PCR reaction was included in each set of experiments. The PCR products were size fractionated by 2% agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and photographed using an image documentation system (ChemiDoc, Bio-Rad).

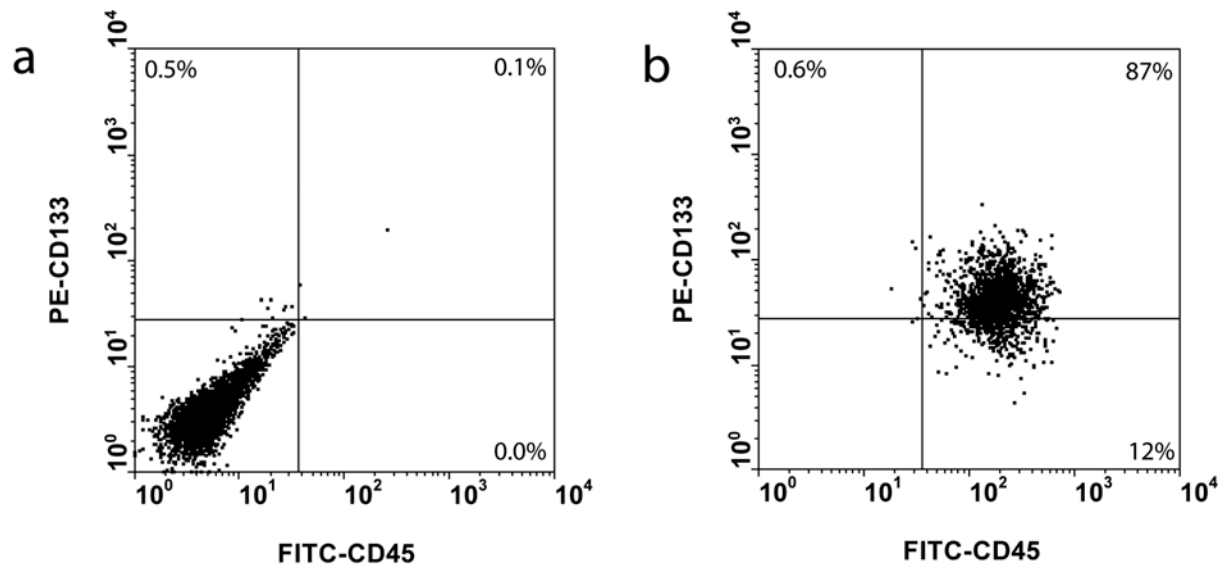
**Table 1**

mRNA sequences of primers

Primer	GenBank Accession	Product size (bps)	Primer sequence	T <sub>m</sub> °C
BKCa	AF118141	555	5'-CGCCTCTTCATGGTCTTCTT-3' 5'-GCAGATTGCGTCATCACCTT-3'	65
$\alpha$ -actin	J05192	341	5'-CAT GTA TGT GGC TAT CCA GG-3' 5'-CAT CAG GCA ACT CGT AAC TC-3'	60
Vimentin	BC030573	400	5'-CCA TCA ACA CCG AGT TCA AG-3' 5'-GAG ACG CAT TGT CAA CAT CC -3'	60
Kv1.5	M60451	341	5'-GTGCCATGACCGTCAGAGGA-3' 5'-GATGTTGATGTGGACGCGCT-3'	55
CD45	Y00062	202	5'-AAG CAA CTG GAA GAG AGG TG -3' 5'-CCT TCT AGC ATG GCA TC -3'	55
Desmin	AF521879	568	5'-GTA TGA GAC CAT CGC GGC TA-3' 5'-CAC TTC ATG CTG CTG CTG TG-3'	60
eNOS	AF400594	332	5'-CAA GAG GTG GAA GCC GAG GT-3' 5'-GGT GAT CTC CAC GTT GGC TG-3'	60
c-kit	BC071593	719	5'-CAG TGG AAG GTT GTT GAG GA-3' 5'-GCT GCC AAG TCT CTG TGA AT-3'	60
vWF	NM000552	329	5'-CAGAAGCAGCACAGCGATCC-3' 5'-AGAGAGCGGCAGGTCAGGTT -3'	60
cd133	M81104	315	5'-AGC CTT CAT CCA CAG ATG CT-3' 5'-CCA CCA GAG GCA TCA GAA TA-3'	55
cd34	M81104	272	5'-CCT GAT TGC ACT GGT CAC CT-3' 5'-CCA CCA CGT GTT GTC TTG CT-3'	65
VEGFR-2	AF063658	520	5'-GAG GGA CTT GGA CTG GCT TTG-3' 5'-AGA CGG ACT CAG AAC CAC ATC-3'	64
$\beta$ -actin	BC013380	285	5'-TCATGAAGTGTGACGTGGACATCCGC-3' 5'-CCTAGAAGCATTGCGGTGGACGATG-3'	65



**Fig. 1.** Phenotypic characterization of CD133<sup>+</sup> cells after 10 days of expansion in culture. A) Cells were stained with CD133 (a), CD34 (b), CD45 (c) and VEGFR2 (d) (red fluorescence). In blue, nuclei were counterstained with DAPI (e-h). Merged images (i-l). Scale bar, 30μm. B) Characterization of mRNA expression of some genes related with the phenotype of primary lines used in this study. a) Expanded CD133<sup>+</sup> cells. b) Culture of human pulmonary artery endothelial cells in confluence. c) Culture of human pulmonary artery smooth muscle cells in confluence.



**Fig. 2.** Phenotypic characterization of CD133+ cells after 10 days of culture expansion. Cells were expanded with a cocktail of cytokines that stimulate cell proliferation with minimal differentiation. a) Dot plot for control unlabeled cells. b) Dot plot for expression of CD133 and CD45. The majority of cells remained positive for markers CD133 and CD45.

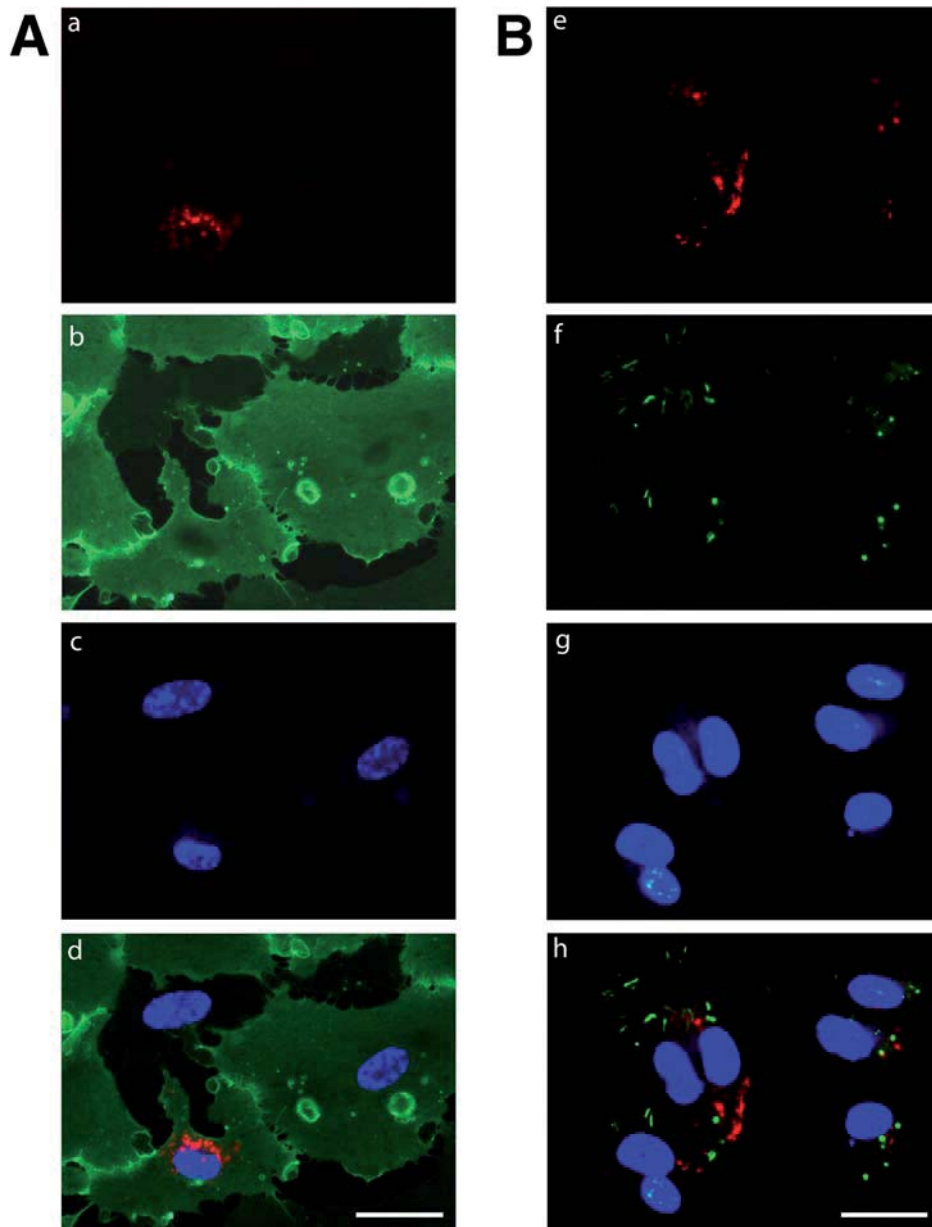
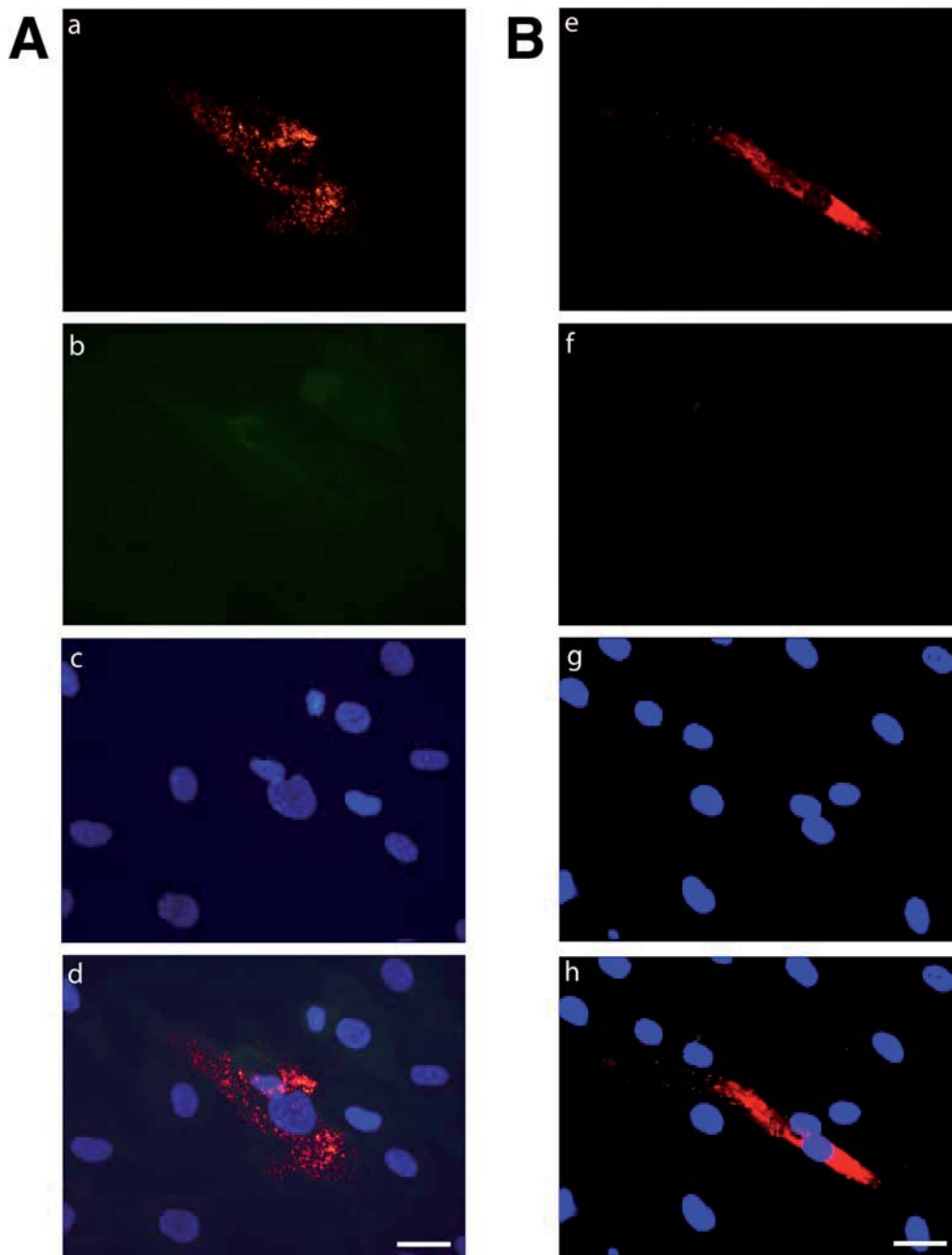
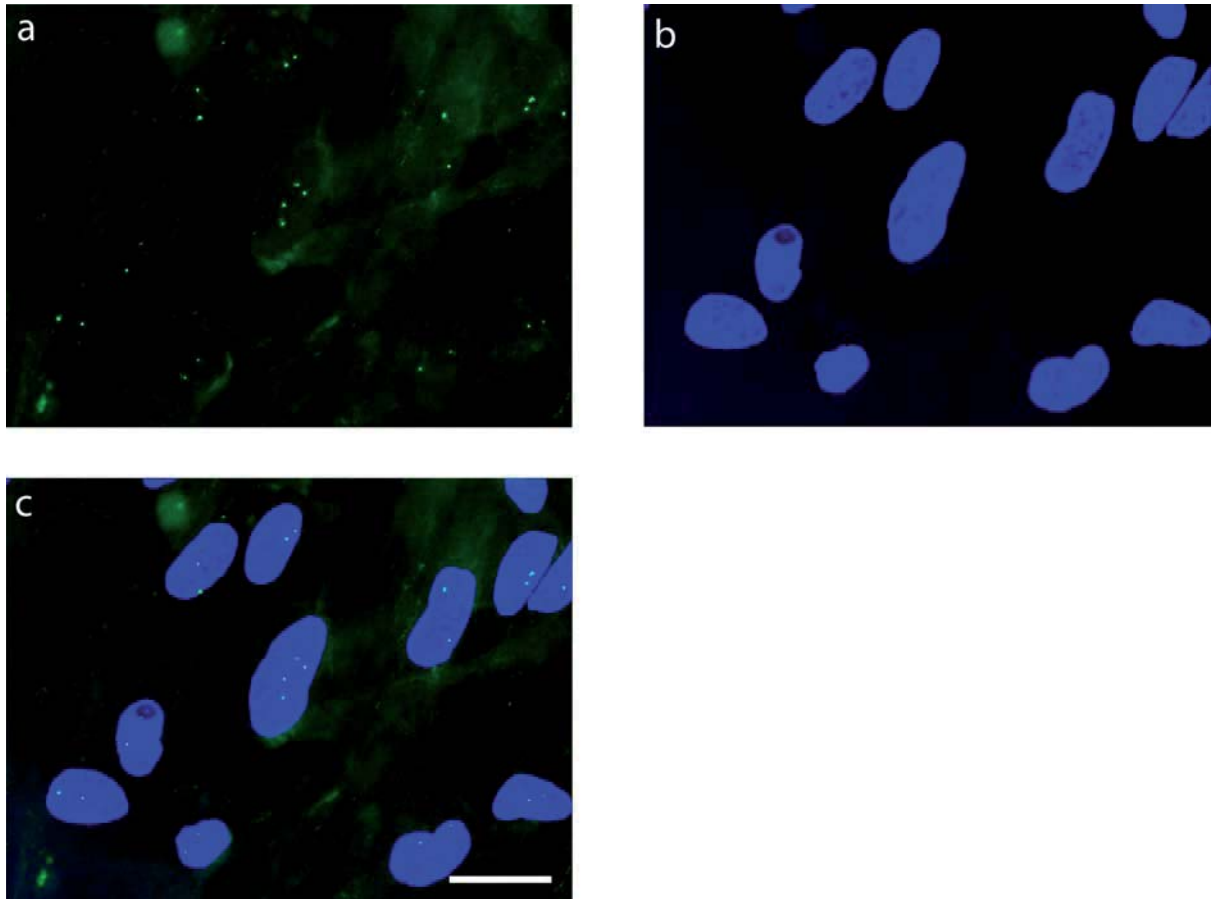


Fig. 3. Co-culture of DiI-AcLDL-labeled progenitor cells with PAEC after 6 days stained with CD31 (A) and vWF (B). (a,e) The progenitor cells can be identified in red by the fluorescent tracer. (b) Cells were strongly positive for the endothelial cell marker CD31. (f) Green dots in the figure are the Weibel Palade bodies revealed using an antibody against von Willebrand Factor. (c,g) Nuclei are marked with DAPI (blue). (d,h) Merged images. Scale bar, 30  $\mu\text{m}$ .





**Fig. 4.** Co-culture of DiI-acLDL-labeled progenitor cells with PASMC after 6 days stained with FITC-UEA (A) and CD31 (B). (a,e) The progenitor cell, identified in red by the fluorescent tracer adopted similar size and shape of contiguous PASMC cells. Both progenitor cells and PASMC did not show affinity to UEA (b) or CD31 (f). (c,g) Nuclei are marked with DAPI (blue). (d,h) Merged images. Scale bar, 30  $\mu\text{m}$ .



**Fig 5.** Fluorescence in situ hybridization (FISH) for chromosome 15 in an endothelial layer.

a) In green (FITC) is shown the chromosome 15 of nuclei in interphase. b) Nuclei were stained with DAPI. In the image center can be observed a nucleus with 4 chromosomes. c) Merged image. Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ .

## Primer treball

### Plasticitat de les cèl·lules CD133+: Paper en el remodelat vascular pulmonar

La contribució de les EPC a la biopatologia de les anormalitats vasculars associades a la MPOC encara no es coneix amb exactitud. Varis estudis han demostrat la capacitat d'aquestes cèl·lules per reparar l'endoteli vascular, però estudis previs del nostre grup han demostrat una relació entre el número de EPC i l'engruiximent de la capa íntima d'artèries pulmonars en pacients amb MPOC, suggerint una participació en aquest procés. Per tant, amb aquest primer estudi volem estudiar la capacitat de les EPC per diferenciar-se tant a EC com a SMC i avaluar la diferenciació d'aquestes en explants d'artèries pulmonars.

Els resultats d'aquest estudi es resumeixen a continuació:

1. Les EPC co-cultivades *in vitro* amb EC o SMC madures adquireixen el fenotip i la morfologia típica del tipus cel·lular amb el que s'han cultivat.

Per tal de determinar la capacitat de les EPC per diferenciar-se a EC o SMC es van realitzar co-cultius *in vitro* de la línia primària de cèl·lules progenitores circulants CD133+ (EPC) amb les línies primàries de EC o SMC d'artèria pulmonar humana durant 6 i 12 dies. Posteriorment, es va caracteritzar el fenotip dels co-cultius a partir d'anàlisis morfològics, d'immunofluorescència i de citometria de flux. Prèviament, les EPC es van marcar amb el fluorocrom acLDL-Dil amb el propòsit d'identificar-les durant els experiments. Els resultats mostren que als 6 dies de co-cultiu, les EPC adquireixen la morfologia i els marcadors específics de EC (UEA+,  $\alpha$ -SMA-) o SMC (UEA-,  $\alpha$ -SMA+) segons el tipus cel·lular amb el que s'han cultivat. Com a control, les EPC es van cultivar aïllades amb els medis amb els que es van realitzar els co-cultius, amb un medi mínim que contenia VEGF o bé amb un medi amb un còctel de citosines

que facilita l'expansió i la diferenciació a EC de les EPC (Endocult, Stem Cell Technologies). Després de 12 dies de cultiu, només les cèl·lules cultivades amb VEGF i Endocult adquireixen el marcador UEA, específic de EC, però en cap de les condicions adquireixen una morfologia típica de EC madura.

El mateix resultat s'observa en co-cultius de EPC amb EC o SMC separats mitjançant una membrana (*trans-well*), que permet el pas de molècules però no de cèl·lules. En aquest cas les EPC adquireixen UEA quan són co-cultivades amb EC i  $\alpha$ -SMA quan són co-cultivades amb SMC, però la morfologia després de 12 dies de cultiu és similar a la que s'observa quan les EPC són cultivades soles.

## 2. Diferenciació de les EPC en explants d'artèries pulmonars humanes.

Un cop demostrada la capacitat de les EPC per diferenciar-se a EC i SMC *in vitro*, aquestes es van injectar dins del lumen d'artèries pulmonars humanes aïllades obtingudes per resecció pulmonar. Aquestes artèries es caracteritzaven per la presència de remodelat vascular. Les EPC es van marcar prèviament amb acLDL-Dil i es van co-incubar dins de les artèries pulmonars durant 2 i 4 dies. Seguidament, les artèries es van fixar i es van avaluar mitjançant immunohistoquímica, immunofluorescència i microscopia electrònica. Les seccions transversals de les artèries incubades durant 2 dies amb EPC mostren que la majoria de les cèl·lules conserven la seva morfologia i es mantenen properes a la superfície endotelial, tot i que algunes ja es localitzen a la capa íntima de les artèries. En canvi, als 4 dies d'incubació, la majoria de les EPC es localitzen a la capa íntima, properes a la capa mitja de les artèries i la seva morfologia passa a ser més allargada. Les proves realitzades mitjançant immunofluorescència revelen que les EPC (es distingeixen gràcies al marcatge amb acLDL-Dil) adherides a l'endoteli expressen els marcadors CD31 i vimentina, i que les EPC confinades a la

capa íntima expressen el marcador  $\alpha$ -SMA, específic de SMC. Per una altra banda, els estudis d'aquestes artèries mitjançant microscopia electrònica confirmen la presència de EPC adherides a l'endoteli amb una morfologia típica de EC, i infiltrant la capa íntima mostrant cossos densos que representen els filaments de  $\alpha$ -actina característic de les SMC. Curiosament, les EPC infiltrades a la íntima es localitzen en zones properes a les àrees d'endoteli denudat.

3. No s'observen nuclis poliploids en les EPC co-incubades amb explants d'artèria pulmonar.

Els anàlisis mitjançant immunofish de les artèries co-cultivades amb les EPC demostren la presència d'alguns nuclis poliploids a la superfície endotelial (entre 5 i 10%). Però, no s'observen nuclis fusionats en les cèl·lules marcades amb acLDL-Dil (que identifiquen les EPC). A més, mitjançant microscopia electrònica tampoc s'observen fusions en les membranes cel·lulars entre les EPC i les cèl·lules madures.



Segon estudi:

**“Endothelial progenitor cells undergo an endothelial-to-mesenchymal transition-like process mediated by TGF $\beta$ RI”**

Marta Díez, Melina M. Musri, Elisabet Ferrer, Joan A. Barberà , Víctor I. Peinado

Article publicat a **Cardiovascular Research (2010) doi:10.1093/cvr/cvq236**





# Endothelial progenitor cells undergo an endothelial-to-mesenchymal transition-like process mediated by TGF $\beta$ RI

Marta Díez<sup>†</sup>, Melina M. Musri<sup>†</sup>, Elisabet Ferrer, Joan A. Barberà, and Víctor I. Peinado\*

Department of Pulmonary Medicine, Hospital Clínic, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Ciber de Enfermedades Respiratorias, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

Received 8 March 2010; revised 5 July 2010; accepted 8 July 2010

Time for primary review: 29 days

## Aims

Endothelial progenitor cells (EPC) have been shown to repair pulmonary endothelium, although they can also migrate into the arterial intima and differentiate into smooth muscle-like (mesenchymal) cells contributing to intimal hyperplasia. The molecular mechanisms by which this process proceeds have not been fully elucidated. Here, we study whether genes involved in the endothelial-to-mesenchymal transition (EnMT) may contribute to the mesenchymal phenotype acquisition of EPC and we evaluate whether transforming growth factor  $\beta$  1 (TGF $\beta$ 1) is involved in this process.

## Methods and results

Our results show that co-culture of EPC with smooth muscle cells (SMC) increases the expression of the mesenchymal cell markers  $\alpha$ -smooth muscle actin, sm22- $\alpha$ , and myocardin, and decreases the expression of the endothelial cell marker CD31. In the same conditions, we also observed a concomitant increase in the gene expression of the EnMT-related transcription factors: slug, snail, zeb1, and endothelin-1. This indicates that mesenchymal phenotype acquisition occurred through an EnMT-like process. Inhibition of TGF $\beta$  receptor I (TGF $\beta$ RI) downregulated snail gene expression, blocked the EnMT, and facilitated the differentiation of EPC to the endothelial cell lineage. Furthermore, TGF $\beta$ RI inhibition decreased migration of EPC stimulated by SMC without affecting their functionality and adhesion capacity.

## Conclusion

These results indicate that EPC may differentiate into SMC-like cells through an EnMT-like process and that TGF $\beta$ I plays an important role in the fate of EPC.

## Keywords

Vascular remodelling • Endothelium repair • Smooth muscle cell differentiation • Stem cell • Migration

## 1. Introduction

The discovery that bone marrow-derived endothelial progenitor cells (EPC) can be mobilized into the circulatory system after endothelial injury and contribute to damaged vessel repair has provided new clues for understanding the pathobiology of vascular disorders such as pulmonary hypertension. It has also provided the rationale for the use of cell therapy in such settings.<sup>1–3</sup> Although cell-based therapy has an encouraging future, there are some concerns regarding the safety of the procedure since EPC may produce detrimental effects at injury sites. Experimental studies combining bone marrow transplantation with models of vascular injury have shown that

bone marrow-derived cells may contribute to intimal enlargement after mechanical injury and to atherosclerotic plaque formation.<sup>4,5</sup> Some evidence that EPC (CD133+ cells) contribute to vascular remodelling has come from the pulmonary arteries of patients with chronic obstructive pulmonary disease, thus questioning the exclusive role of endothelial repair in this condition.<sup>6</sup> Bone marrow-derived EPC have the ability to migrate into the intima of explanted pulmonary arteries and acquire a smooth muscle cells (SMC)-like phenotype.<sup>7</sup> The molecular mechanisms involved in this process have not been fully elucidated.

Within certain environments, endothelial cells (EC) can trans-differentiate into SMC by a process of endothelial-to-mesenchymal

<sup>†</sup> Both authors contributed equally to this work.

\* Corresponding author: Servei de Pneumologia, Hospital Clínic, Villarroel, 170, 08036 Barcelona, Spain. Tel: +34 93 227 5540; fax: +34 93 227 5455, Email: vpeinado@clinic.ub.es  
Published on behalf of the European Society of Cardiology. All rights reserved. © The Author 2010. For permissions please email: journals.permissions@oxfordjournals.org.

transition (EnMT).<sup>8</sup> EnMT, which shares a number of molecular signalling pathways with epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), can be induced *in vitro* by transforming growth factor beta 1 (TGFβ1)<sup>9,10</sup> and is involved in pathological processes such as cancer and fibrosis.<sup>11</sup> TGFβ1 may induce EnMT in mature EC by stimulating the gene expression of transcription factors, such as snail, slug, and ZEB (zeb1 and zeb2).<sup>12</sup> The net outcome in EC is repression of endothelial cell markers, such as VE-cadherin, and enhanced expression of mesenchymal cell markers, such as α-smooth muscle actin (α-SMA) and myocardin. These changes promote the acquisition of myofibroblast-like characteristics and an enhanced migratory phenotype.<sup>13</sup> Embryonic stem cell-derived EC undergo EnMT during normal cardiovascular development. In this process, snail appears to mediate TGFβ-induced downregulation of endothelial markers,<sup>14</sup> which suggests that this growth factor may play a crucial role in cell fate. Recent studies have shown that endothelin-1 (ET-1) promotes EMT in alveolar cells through ET-1 type A (ETA) receptor via stimulation of endogenous TGFβ1.<sup>15</sup> In addition, ET-1 promotes the migration and activation of inflammatory cells in the vessel wall.<sup>16</sup> Interestingly, EMT is not restricted to adult cells, since this process has also been observed in different progenitor cell types.<sup>17</sup>

We hypothesized that EPC in contact with SMC will acquire a mesenchymal phenotype through an EnMT-like process mediated by TGFβ1, and that could modulate the migration capacity of EPC. Accordingly, the present study evaluates the gene expression of mesenchymal and EC markers in EPC that differentiate into SMC, and assess whether transcriptional factors related to EnMT are involved in this process. We also analysed the effects of TGFβ receptor I (TGFβRI) and ETA inhibition on EPC differentiation as well as on EPC functionality, apoptosis, and proliferation capacity.

## 2. Methods

### 2.1 Primary cell cultures

The EPC used were human haematopoietic progenitor cells CD133+ obtained from Cambrex Bio Science (Walkersville, MD, USA). Before use, the EPC were expanded in stem span medium and characterized for stem cell markers as described elsewhere.<sup>7</sup>

Pulmonary artery EC, HPAE-26, were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and cultured in endothelial cell growth medium (ECGM).

Pulmonary artery SMC were obtained from Cambrex Bio Science and cultured in SMC growth medium (SMCGM). All cell lines were used at passages two to four and maintained in a humidified atmosphere at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> (see Supplementary material online, Expanded Methods).

### 2.2 Labelling of EPC

For gene expression studies performed in co-cultures, the EPC were previously labelled with 2 nM PKH26 Red Fluorescent Cell linker kit (Sigma, Saint Louis, MO, USA). The efficiency of PKH26 labelling was within 85 and 95% and the transferability lower than 1.5% (see Supplementary material online, Figure S1). In the analysis of EPC differentiation by FACS, EPC were labelled with 2.5 nM Qtracker 655 Cell Labeling kit (qDot; Invitrogen, Molecular Probes, Eugene, OR, USA) according to manufacturer's recommendation. In this case, the efficiency of qDot labelling was within 30 and 60% and the transferability lower than 24%.

### 2.3 Study design

We differentiated EPC into SMC or EC based on co-culture assays as previously described.<sup>7</sup> Then, we analysed the gene expression of

mesenchymal markers and EnMT-related transcription factors during differentiation of EPC into SMC at 1, 3, and 5 days and compared with those obtained during differentiation of EPC into EC or when they were cultured alone with conditioned medium (CM), TGFβ1, or vascular endothelial growth factor (VEGF).

In a second set of experiments, we assessed the effects of silencing the EMT-related transcription factors, snail, and slug, on the differentiation of EPC. Also we evaluated a TGFβRI inhibitor and an ETA blocking agent on the acquisition of phenotypical markers, as well as the migration and adhesion capacity of EPC and the effects on apoptosis and proliferation.

#### 2.3.1 Co-culture experiments

For co-culture experiments, pulmonary artery endothelial cells or pulmonary artery smooth muscle cells were cultured in 24-well fibronectin plates (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) in ECGM and SMCGM, respectively. After 48 h of culture, labelled EPC were added at a density ratio of 1:1 for EC or 3:1 for SMC, allowing them to differentiate. Co-cultures were performed for 1, 3, 5, or 6 days.

In parallel to co-culture experiments, labelled EPC were cultured alone in ECGM or SMCGM as control conditions.

#### 2.3.2 Conditioned medium

Experiments with CM were performed using Transwell chambers with filter membranes of 0.4 μm pore size (Corning, Life Science, NY, USA). Chambers containing 1 × 10<sup>5</sup> EPC in serum-free medium were inserted in the plate cultures with previously plated SMC and incubated for 48 h. EPC incubated in SMCGM serum-free medium alone was used as a control. The mean concentration of TGFβ1 in CM was 1.75 ng/mL assessed by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) (see Supplementary material online, Expanded Methods).

#### 2.3.3 Treatment with TGFβ1 and VEGF

EPC cultured in stem span serum-free medium were treated with TGFβ1 (10 ng/mL; Acris, Herford, Germany) or VEGF (50 ng/mL; Biosource, Camarillo, CA, USA) for 48 h before RNA extraction. In these conditions, cell cultures for longer periods of time become unstable. As control, EPC were cultured using stem span serum-free medium with vehicle.

#### 2.3.4 TGFβRI and ETA inhibition

Both co-cultures and the CM were treated with SB-431542 (Sigma), a potent inhibitor of TGFβRI,<sup>18</sup> or BQ-123 (Sigma), an ETA antagonist.<sup>19</sup> In these assays, the inhibitors were used up to a concentration of 10 μM in accordance with previous studies.<sup>15,20</sup>

## 2.4 Cell sorting

To evaluate the gene expression of EPC in co-cultures, we performed cell sorting experiments. SMC (5 × 10<sup>4</sup> cells/well) or EC (1 × 10<sup>5</sup> cells/well) were seeded in 12-well culture plates in SMCGM or ECGM, respectively. After 24 h, EPC (1.5 × 10<sup>5</sup> cells/well) previously labelled with PKH26 were added to the wells. After 1, 3, and 5 days of co-culture, the adherent cells were starved, washed twice, and suspended in PBS containing 2% FBS. Cell sorting was performed in duplicates using a BD FACS Vantage SE Cell-Sorting System (BD Bioscience, San Jose, CA, USA) to collect the PKH26 fluorescent dye cells. The collected cells were suspended in Trizol to isolate RNA. The purity of cell sorting ranged between 95 and 98%. EPC previously labelled with PKH26 and cultured alone in SMCGM or ECGM were used as a control.

## 2.5 Flow cytometry

The differentiation of EPC into EC was quantified by flow cytometry (FACSCanto II, BD Bioscience). Co-cultures of EC and SMC with qDot labelled EPC were incubated with FITC-*Ulex europaeus* (UEA) at 4°C for 1 h. Cells that were positive for both markers were judged to be EC which had differentiated from EPC.

## 2.6 Immunofluorescence staining

The differentiation of EPC into SMC was assessed by immunofluorescence using an antibody against  $\alpha$ -SMA (DAKO Cytomation, Carpinteria, CA, USA). Differentiation into EC was assessed by the expression of CD31 (DAKO), VE-cadherin (Abcam, Cambridge, UK), and VEGFR2 (Santa Cruz Biotechnologies Inc., Santa Cruz, CA, USA). All primary antibodies were revealed with a secondary antibody conjugated with FITC fluorescein (Jackson Immuno Research, West Grove, PA, USA). Nuclei were stained with DAPI.

## 2.7 Knockdown with siRNA/transient transfection

EPC were electroporated as described in manufacturer's instructions using a Human CD34 Cell Nucleofector Kit (Amaxa Biosystem, Cologne, Germany). Briefly,  $1.5 \times 10^5$  cells were suspended in 90  $\mu$ L of Amaxa CD34 cell solution with 2  $\mu$ g of the corresponding double-stranded siRNA (Silencer Select Pre-designed siSnail, siSlug and negative control, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for silencing experiments or with 1  $\mu$ g of the appropriate plasmid (XL6-empty, XL6-snail, and XL6-slug, OriGene Technology, MD, USA) for transient transfection experiments. The cell suspension was electroporated using Human CD34+ Nucleofector Kit (Amaxa) with the U08 program in the Amaxa Nucleofector II. The efficiency of siRNA transfection was greater than 65%.

## 2.8 RNA isolation and real-time PCR

Total RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. Random-primed cDNA synthesis was performed at 37°C with 1  $\mu$ g of RNA using the high capacity cDNA archive kit (Applied Biosystems). Gene expression was measured by quantitative real-time PCR in a Chromo 4 Real Time PCR detector (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using the SensiMix dt Kit (Quantace, San Mateo, CA, USA) based on the DNA double-strand-specific SYBR green I dye for detection. The primer sequences used are listed in Supplementary material online, Table S1. The results were normalized to GAPDH expression levels and relative gene expression was analysed by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method.<sup>21</sup>

## 2.9 Migration assays

Cell migratory assays were performed using Transwell chambers with filter membranes of 5  $\mu$ m pore size (Corning, Life Science). Transwell chambers were inserted into the plate wells containing EC or SMC and EPC were seeded into the upper chamber ( $8 \times 10^4$  cells per well in serum-free medium) in either the absence or the presence of 10  $\mu$ M SB-431542 or 10  $\mu$ M BQ-123 for 24 h at 37°C. At the end of the assay, the migrated EPC in the lower compartment were collected and counted using the Neubauer chamber. Results are reported as the number of migrated cells.

## 2.10 Adhesion assays

Adhesion assays were performed in 24-well fibronectin plates (BD Biosciences). EC ( $2 \times 10^4$  cells per well) were grown for 2 days in ECGM. EPC previously labelled with qDot ( $2 \times 10^4$  cells per well) were added in the presence of a vehicle, 10  $\mu$ M SB-431542, or 10  $\mu$ M BQ-123. After 48 h, the number of qDot labelled cells was counted in 10 fields using a fluorescence microscope. Results are reported as the number of labelled cells per field.

## 2.11 Matrigel assay

Three-dimensional cultures were established by coplating PKH26-labelled EPC ( $3 \times 10^4$  cells/well) with  $3 \times 10^4$  EC-GFP+ on Matrigel (BD Bioscience) in both the absence and the presence of 10  $\mu$ M SB-431542. Time-lapse fluorescence confocal microscopy experiments were carried out using a Leica TCS SL laser scanning confocal spectral microscope

(Leica Microsystems) (see Supplementary material online, Expanded Methods).

## 2.12 Evaluation of cell proliferation and apoptosis by flow cytometry

To determine cell cycle progression, EPC and SMC cultured in control condition or treated with SB-431542 or BQ-123 were collected prior to reach confluency. They were fixed overnight in ice-cold 70% ethanol-H<sub>2</sub>O and incubated in 0.05% Triton  $\times 100$ , 10  $\mu$ g/mL of RNase A, and 5  $\mu$ g/mL of propidium iodide for 30 min in the dark before readings were taken with a FACSCanto flow cytometer. Data are shown as the mean percentage of cells in the sub-G1 (apoptosis) and G2/M (proliferation) phases of three to four independent experiments.

## 2.13 Statistical analysis

All values are reported as mean  $\pm$  SD. Determinations were performed in duplicate and at least three independent experiments were performed for each set of conditions. Two-group comparisons were analysed using the two-tailed Student's paired *t*-test for dependent samples, or unpaired *t*-test for independent samples. Multiple comparisons were analysed by one-way analysis of variance followed by Student–Newman–Keuls *post hoc* test. For all procedures, *P*-values of  $<0.05$  were considered statistically significant.

## 3. Results

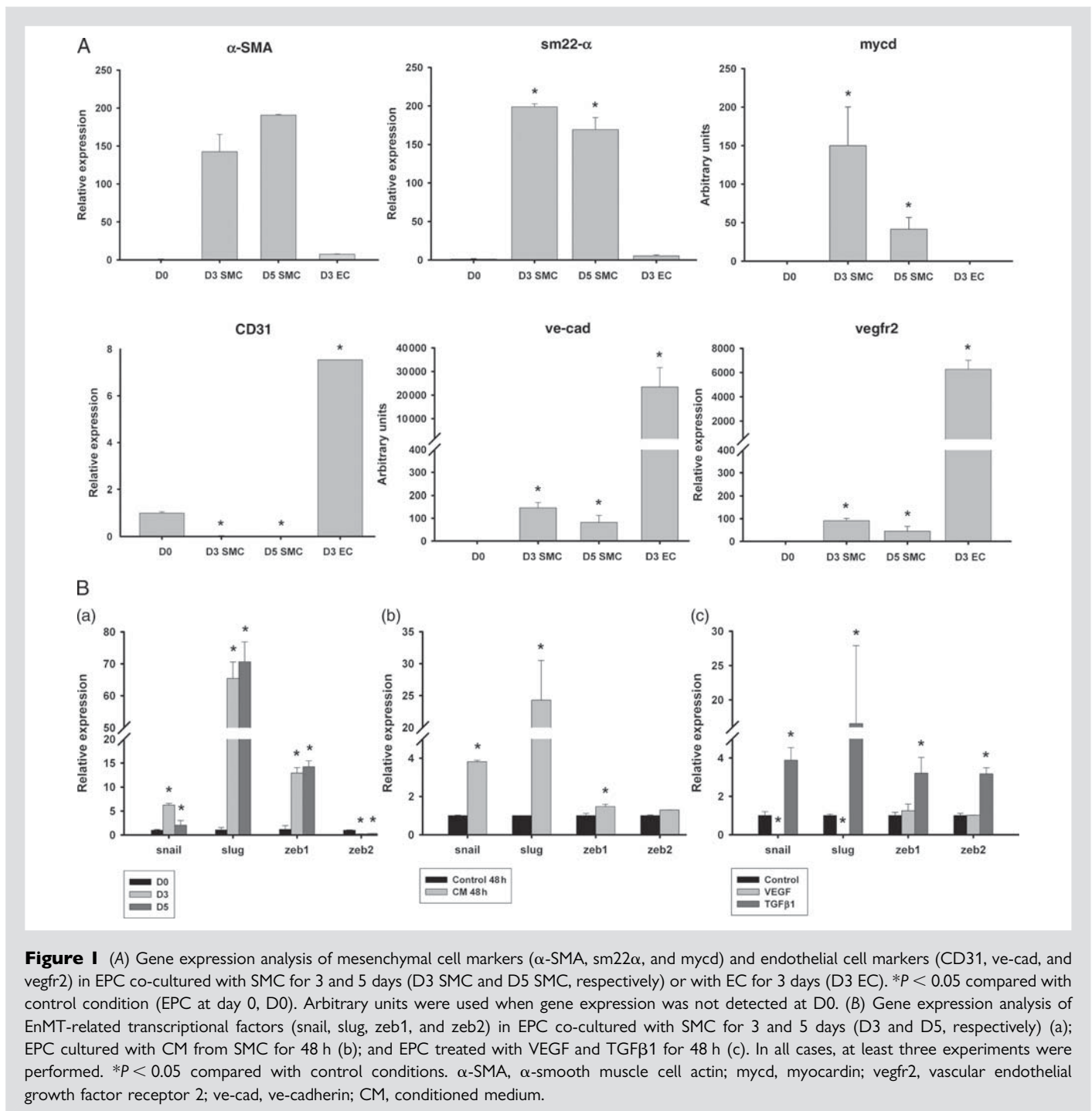
### 3.1 SMC induce gene expression of mesenchymal cell markers in EPC

After 6 days of co-culture with SMC or EC, the majority of EPC showed morphology and expressed characteristic markers of the adjacent mature cells. In contrast, EPC cultured alone with SMCGM or ECGM did not acquire the phenotypical markers of differentiated mature cells (data not shown). In order to study the gene expression of mesenchymal and EC markers during differentiation of EPC, RNA was isolated from cells after sequential separation by cell sorting at 1, 3, and 5 days. Quantitative RT–PCR of the sorted EPC showed a marked increase in the mesenchymal markers  $\alpha$ -SMA and sm22 $\alpha$ , as well as myocardin gene expression, after 3 and 5 days of co-culture with SMC, compared with undifferentiated cells (Figure 1A). This upregulation was also observed to a lower degree after day 1 of co-culture (Supplementary material online, Figure S3). In contrast, in the same conditions, EPC exhibited a significant downregulation of the EC marker CD31 from day 1. We also observed an increase in the expression of VE-cadherin and VEGFR2 in EPC co-cultured with SMC, but this increase was much lower than that seen in co-culture with mature EC (Figure 1A and Supplementary material online, Figure S3). We used the gene expression profile of EPC co-cultured with EC at D1 and D3 as a control of differentiation of EPC in a lineage or other. The increase in mesenchymal cell markers and the decrease in CD31 indicate that EPC are able to differentiate into SMC following a similar pattern to that described for an EnMT process.

We also evaluated the expression of mesenchymal cell markers in EPC cultured with CM. In this setting, EPC did not acquire mesenchymal cell markers or the shape of mature SMC (data not shown).

### 3.2 SMC induce the gene expression of EnMT transcription factors in EPC

We analysed the gene expression of the main EnMT-related transcription factors: snail, slug, zeb1, and zeb2. EPC co-cultured with SMC



**Figure 1** (A) Gene expression analysis of mesenchymal cell markers ( $\alpha$ -SMA, sm22 $\alpha$ , and mycd) and endothelial cell markers (CD31, ve-cad, and vegfr2) in EPC co-cultured with SMC for 3 and 5 days (D3 SMC and D5 SMC, respectively) or with EC for 3 days (D3 EC).  $*P < 0.05$  compared with control condition (EPC at day 0, D0). Arbitrary units were used when gene expression was not detected at D0. (B) Gene expression analysis of EnMT-related transcriptional factors (snail, slug, zeb1, and zeb2) in EPC co-cultured with SMC for 3 and 5 days (D3 and D5, respectively) (a); EPC cultured with CM from SMC for 48 h (b); and EPC treated with VEGF and TGF $\beta$ 1 for 48 h (c). In all cases, at least three experiments were performed.  $*P < 0.05$  compared with control conditions.  $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -smooth muscle cell actin; mycd, myocardin; vegfr2, vascular endothelial growth factor receptor 2; ve-cad, ve-cadherin; CM, conditioned medium.

upregulated the gene expression of snail, slug, and zeb1, but not zeb2, at days 3 and 5 (Figure 1B). Similarly, EPC cultured in CM for 48 h also showed an increase in the gene expression of snail, slug, and zeb1 (Figure 1B). Interestingly, the upregulation of EnMT-related factors parallels that observed after treatment with TGF $\beta$ 1 for 48 h, whereas treatment with VEGF significantly decreased snail and slug gene expression (Figure 1B).

### 3.3 SMC induces ET-1 expression in EPC

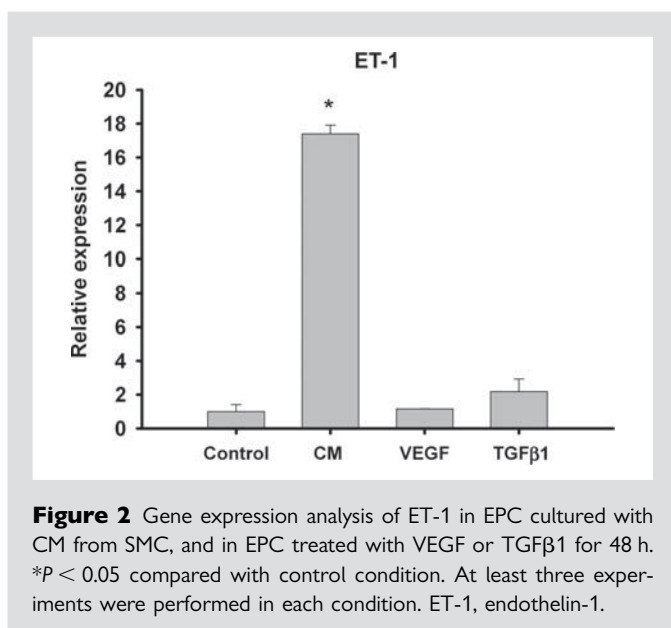
Since ET-1 is considered one of the EMT initiating factors,<sup>15</sup> we assessed the expression of this gene in EPC cultured with CM or TGF $\beta$ 1. As shown in Figure 2, an increase of ET-1 gene expression

was observed in CM-treated EPC, compared with control condition. Treatment of EPC with TGF $\beta$ 1 also resulted in a slight increase of ET-1 gene expression after 48 h, but this increase was not significant.

### 3.4 Slug and snail are needed for EPC differentiation

After 6 days of co-culture with SMC, we examined the protein expression of  $\alpha$ -SMA filaments by immunofluorescence in EPC transfected with small interference RNA against snail or slug. In these knocked cells, the formation of  $\alpha$ -SMA filaments was diminished, indicating an inhibition of mesenchymal phenotype acquisition (Figure 3A). The percentage of EPC differentiated into EC was quantified using





**Figure 2** Gene expression analysis of ET-1 in EPC cultured with CM from SMC, and in EPC treated with VEGF or TGFβ1 for 48 h. \* $P < 0.05$  compared with control condition. At least three experiments were performed in each condition. ET-1, endothelin-1.

flow cytometry to measure the increase in the specific EC marker, UEA. As shown in *Figure 3B*, transfected cells were not able to differentiate into EC when co-cultured with SMC (*Figure 3B*). Overexpression of snail or slug alone in EPC was not sufficient to achieve SMC differentiation (data not shown).

### 3.5 Inhibition of TGFβRI induces downregulation of snail gene expression in EPC

Snail and slug gene expressions were evaluated in EPC co-cultured with SMC after 3 and 5 days in the presence of the inhibitor of TGFβRI, SB-431542. After 3 days of co-culture, snail was downregulated significantly in the presence of SB-431542, and it returned to normal levels after 5 days. In contrast, in the same conditions, slug was upregulated after treatment with the inhibitor, both at days 3 and 5 of co-culture (*Figure 4A*). This upregulation in slug gene expression was not observed when EPC were incubated with CM in the presence of SB-431542, whereas snail did show downregulation after 48 h, compared with cells under basal conditions (*Figure 4B*).

### 3.6 Inhibition of TGFβRI decreases EPC differentiation into SMC and facilitates differentiation into EC

After 6 days, we evaluated the expression of α-SMA by immunofluorescence in EPC co-cultured with SMC in the absence and presence of SB-431542. As shown in *Figure 5A*, in co-cultures treated with SB-431542, the expression of α-SMA was lower. In contrast, treatment with BQ-123 did not modify the expression of α-SMA, when compared with the control condition.

The percentage of EPC differentiated into EC measured by affinity to UEA was increased in co-cultures treated with SB-431542, whereas co-cultures treated with BQ-123 were unaffected (*Figure 5B*).

To confirm the effects of TGFβRI inhibition on EPC differentiation, we assessed the expression of mesenchymal and EC markers in EPC co-cultured with SMC in the presence or absence of SB-431542. Quantitative RT-PCR analysis revealed a significant reduction of

the mesenchymal markers α-SMA, sm22α, and myocardin after 3 and 5 days of co-culture in the presence of the inhibitor. In the same conditions, the endothelial cell markers CD31, VEGFR2, and VE-cadherin were found to be upregulated (*Figure 5C*). In agreement with these results, we observed by immunofluorescence in co-cultures of EPC with SMC treated with SB-431542 some scattered labelled EPC positive for CD31, VE-cadherin, and VEGFR2 (Supplementary material online, *Figure S4*).

### 3.7 Inhibition of TGFβRI and ETA decrease EPC migration

Since EnMT is related to an enhanced migratory phenotype, we explored the migratory capacity of EPC stimulated by SMC. Our results showed that the migration capacity of EPC was greater in the presence of SMC than in the presence of EC ( $3150 \pm 780$  vs.  $1170 \pm 442$  migrated cells;  $P < 0.05$ ) (*Figure 6A*). Treatment with SB431542 or BQ123 significantly decreased EPC migration in the presence of SMC, compared with control condition ( $708 \pm 118$  and  $790 \pm 317$  vs.  $2021 \pm 318$  migrated cells, respectively;  $P < 0.05$ ) (*Figure 6B*). In contrast, the action of neither inhibitor affected the adhesion capacity of these cells (*Figure 6C*).

### 3.8 Inhibition of TGFβRI and ETA do not affect apoptosis and cell proliferation

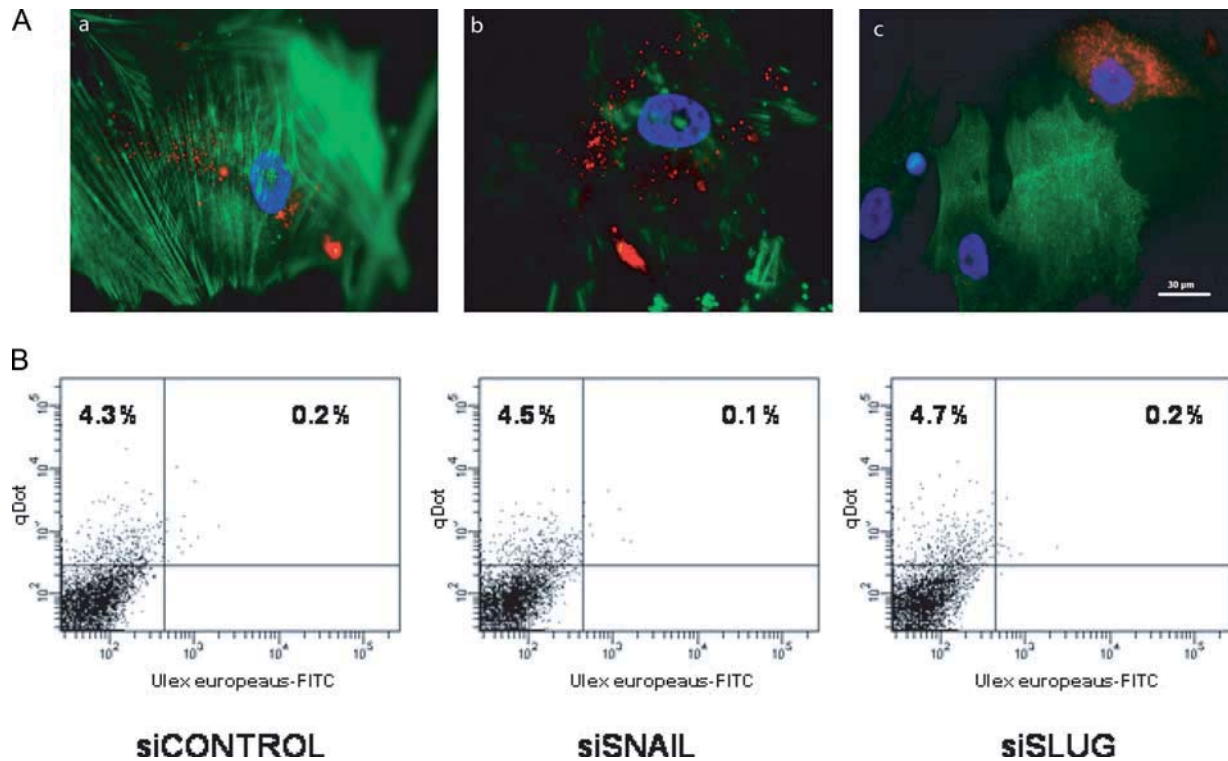
In EPC and SMC cultures, we did not observe any changes in the percentage of apoptotic cells or in the proliferation rate after treatment with SB-431542 or BQ-123, when compared with control condition (Supplementary material online, *Table S2*).

### 3.9 Inhibition of TGFβRI does not affect EPC functionality

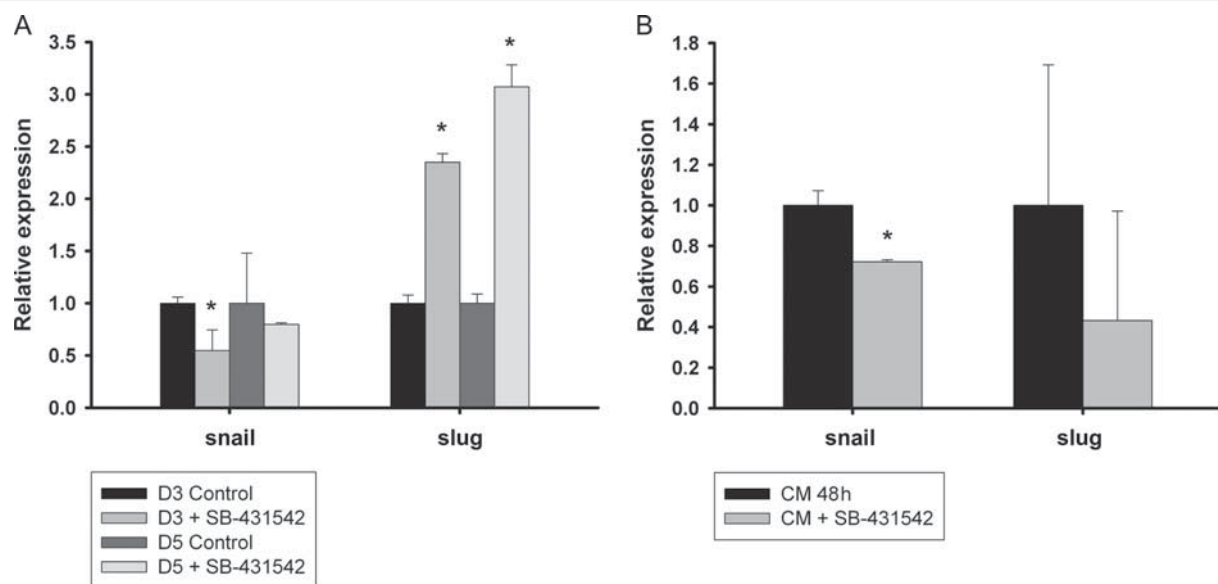
We examined the effects of TGFβRI inhibition on tube formation in Matrigel. Treatment with SB-431542 did not inhibit network formation by EPC. As a measure of EPC functionality, we evaluated the contact areas of EPC with EC by measuring the percentage of overlapping fluorescence in the first 6 h of co-culture. Then, a linear regression of percentage fluorescence intensity at each time point was calculated and the slope compared. There were no differences in the ability of EPC to integrate into tubule networks in co-cultures treated with SB-431542 compared with control conditions (mean slope  $0.04 \pm 0.04$  vs.  $0.03 \pm 0.02$ , respectively), showing that inhibition of TGFβRI does not affect the functionality of EPC (see Supplementary material online, *Figure S5*).

## 4. Discussion

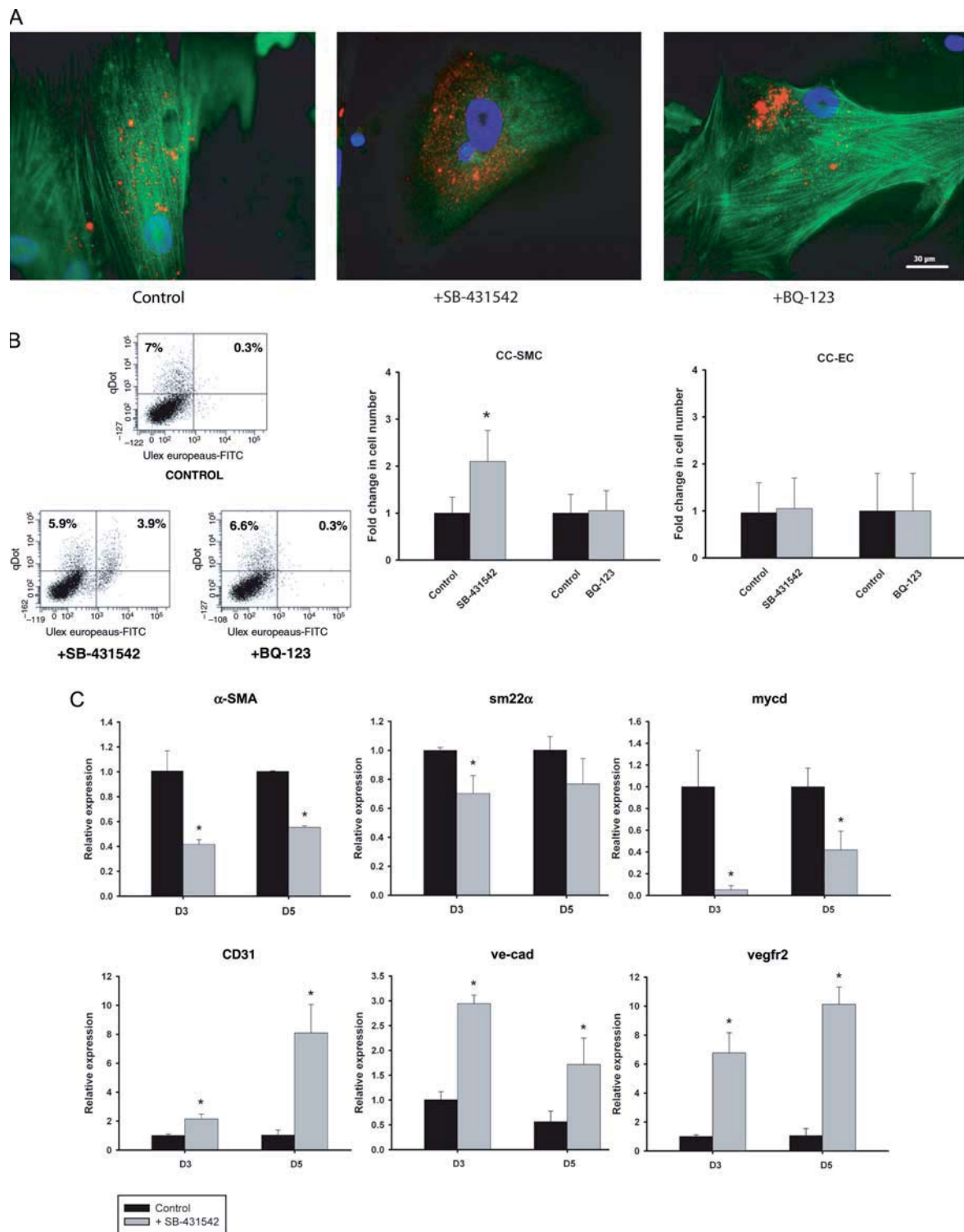
The present study is based on our previous findings that circulating EPC can differentiate into cells that express α-SMA when co-cultured with mature SMC or when placed into the lumen of explanted pulmonary arteries. This suggests that they may promote pulmonary vascular remodelling and contribute to the development of pulmonary hypertension.<sup>7</sup> The present study shows that EPC in co-culture with SMC express mesenchymal markers along with the decrease in the expression of EC markers, which indicates that differentiation is fully committed to SMC. Furthermore, EPC co-cultured with both SMC and CM from SMC increase the gene expression of key transcriptional factors involved in EnMT. Depletion of snail and slug blocked the differentiation of EPC into SMC. TGFβRI inhibition



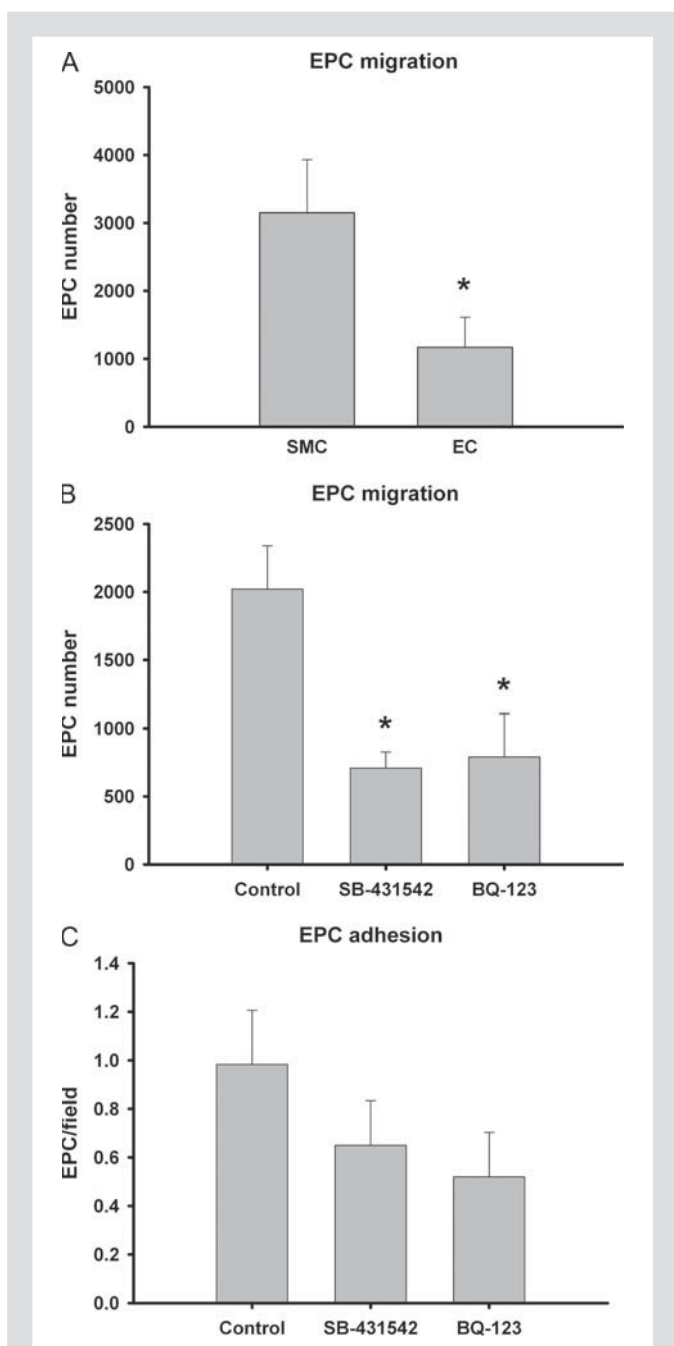
**Figure 3** (A) Merged images of  $\alpha$ -SMA immunofluorescence in EPC co-cultured with SMC after 6 days. EPC were transfected with negative control RNAi (a), small interference against snail (b), or small interference against slug (c). Previously, EPC were labelled with PKH26 (red). Co-cultures were stained with a monoclonal antibody against  $\alpha$ -SMA (green). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Original magnification:  $\times 630$ . (B) Representative flow cytometric analysis for FITC-UEA from co-cultures of qDot labelled EPC with SMC after 6 days. Previously, EPC were transfected with negative control RNAi (siCONTROL) or with small interference against snail (siSNAIL) or slug (siSLUG). At least three experiments were performed. UEA, Ulex europeus; qDot, Qtracker 655 nanocrystal.



**Figure 4** Effects of TGF $\beta$ R1 inhibition on snail and slug expression in EPC. (A) Co-cultures were treated with SB-431542 and EPC separated by cell sorting at 3 and 5 days (D3 and D5, respectively). (B) EPC were cultured with CM from SMC for 48 h. In all cases, at least three experiments were performed. \* $P < 0.05$  compared with corresponding control conditions. CM, conditioned medium.



**Figure 5** Effects of TGFβRI and ETA inhibition on EPC differentiation. (A) Merged images of α-SMA immunofluorescence in PKH26-labelled EPC (red) co-cultured with SMC for 6 days. Co-cultures were treated with SB-431542 or BQ-123 and immunostained with a monoclonal antibody against α-SMA (green). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Original magnification: ×630. (B) Flow cytometric analysis for FITC-UEA, which is specific for mature endothelial cells, in qDot labelled EPC co-cultured with SMC (CC-SMC) and EC (CC-EC) for 6 days in control and after treatment with SB-431542 or BQ-123. On the left is a representative experiment of EPC co-cultured with SMC. Values are mean ± SEM. \**P* < 0.05 compared with control condition. (C) Gene expression analysis of endothelial (CD31, ve-cad, and vegfr2) and mesenchymal (α-SMA, sm22α, and mycd) cell markers in EPC co-cultured with SMC, treated with SB-431542, and separated by cell sorting after 3 and 5 days (D3 and D5, respectively). In all cases, at least three experiments were performed. \**P* < 0.05 compared with respective control condition. α-SMA, α-smooth muscle cell actin; mycd, myocardin; vegfr2, vascular endothelial growth factor receptor 2; ve-cad, ve-cadherin.



**Figure 6** (A) Effects of EC and SMC on EPC migratory capacity. (B) Effects of SB-431542 (10  $\mu$ M) and BQ-123 (10  $\mu$ M) on the migration capacity of EPC stimulated by SMC. (C) Effects of SB-431542 and BQ-123 on the EPC adhesion capacity over EC cultures. In all cases, at least five experiments were performed. \* $P < 0.05$  compared with respective control condition.

partially blocked the acquisition of mesenchymal markers facilitating their differentiation into EC. These results shed light on some of the molecular mechanisms underlying differentiation of EPC into SMC and provide new insights into identifying potential targets for the treatment of vessel remodelling.

Previous studies based on chromosomal analysis demonstrated that the acquisition of a mesenchymal phenotype was not due to the fusion with existent mature cells, but that it was caused by a real differentiation process.<sup>7</sup> Nevertheless, some doubts regarding the

formation of transitional cells that co-express mesenchymal and endothelial markers remained unresolved. The present study shows that EPC express specific SMC markers from the first 24 h of co-culture with SMC, but they barely experience any increase in specific endothelial cell markers. The specificity of the SMC phenotype is reinforced by upregulation of myocardin, which is the only transcription factor required and sufficient for vascular smooth muscle development.<sup>22</sup> This finding clearly shows that differentiation is not due to a trans-differentiation process from mature EC.

We attempted to explore some of the molecular mechanisms that may trigger EPC differentiation into SMC. Initially, we thought that an EnMT-like process may underlie EPC differentiation, since EnMT is intimately linked to angiogenesis during embryonic development.<sup>23</sup> It has also been suggested that it is involved in pathological processes such as fibrosis, vascular remodelling, and cancer.<sup>24,25</sup> It is conceivable that processes involved in embryonic development might also be used for tissue repair. The main critical transcription factors involved in EnMT and EMT are snail and slug.<sup>14,26</sup> We analysed these EnMT-related transcription factors in EPC co-cultured with SMC. Our results show that these two factors were upregulated during the first days of co-culture indicating that an EnMT-like process is involved in mesenchymal phenotype acquisition. In addition, the gene expression of zeb1 but not zeb2 was also increased in agreement with the antagonistic function of each isoforms.<sup>27</sup> Interestingly, the upregulation of these genes observed in co-cultures were also induced by CM, thereby suggesting that soluble factors contribute to this response. TGF $\beta$ 1 is involved in the transition of endothelial and epithelial cells into SMC-like cells by stimulating the expression of such transcription factors.<sup>9,12,15,28</sup> Other studies have reported that snail mediates the actions of TGF $\beta$  inducing EnMT and EMT in embryonic stem cell-derived EC and in mammary epithelial cells, respectively.<sup>14,29</sup> In our study, the concentration of TGF $\beta$ 1 in CM from SMC was in the range of an effective dose causing EMT in alveolar epithelial cells.<sup>30</sup> These findings suggest that TGF $\beta$ 1 may be one of these soluble factors inducing transition into SMC. The present study confirms that TGF $\beta$ 1 upregulates EnMT transcriptional factors in EPC. Despite the increase in snail and slug expression in EPC incubated with CM or with TGF $\beta$ 1, we did not observe upregulation of mesenchymal genes. Overexpression of snail and slug in EPC also failed to stimulate mesenchymal phenotype acquisition, suggesting that additional factors stimulated during cell-to-cell contact are required to induce the phenotypic change. These findings concur with our previous studies<sup>7</sup> and with observations made by Park and co-workers<sup>7,31</sup> in umbilical cord blood stem cells highlighting the crucial role of cell-to-cell contact for morphology acquisition. In contrast, EPC transfected with small interfering RNA against snail or slug and co-cultured with SMC showed a reduction in  $\alpha$ -SMA filaments, indicating that transition into SMC was partially inhibited. Altogether, these results indicate for the first time that EPC in contact with SMC undergo an EnMT-like process.

According to these observations, we evaluated the effects of TGF $\beta$ RI inhibition on the expression of transcriptional factors in EPC co-cultured with SMC or cultured with CM from SMC. In both cases, snail was downregulated but slug was upregulated, indicating that this gene could be activated through pathways other than TGF $\beta$ /TGF $\beta$ RI. Interestingly, the upregulation of slug was not observed in EPC cultured with CM from SMC and treated with SB-431542. These data once again highlight the importance of cell-to-cell contact in the induction of EnMT, and probably the



dependence of additional pathways for slug upregulation. Nevertheless, we could not establish whether the blocking effect of SB-431542 targeted only EPC, SMC, or both cell types, since they were co-cultured together. In line with the actions of TGFβ1, ET-1 can promote EMT in lung epithelial cells through ETA receptor.<sup>15</sup> It is noteworthy that TGFβ induces ET-1 upregulation through the activation of the TGFβRI/Smad 3 pathway, in which some actions are mediated in an autocrine manner.<sup>32</sup> We detected a significant increase of ET-1 gene expression in EPC treated with CM from SMC, suggesting that ET-1 could play a role in this process.

We next considered whether the TGFβ pathway blockage could prevent the EnMT-like process in EPC co-cultured with SMC. Co-cultures treated with SB-431542 showed a decrease in α-SMA filament formation, and flow cytometry analysis revealed a significant percentage of EPC differentiated into EC. Also, some EPC were positive for CD31, VE-cadherin, and VEGFR2. These results are in agreement with others showing an inhibition of EMT induced by TGFβ when TGFβRI was blocked.<sup>33</sup> We also evaluated the effect of BQ-123 on EPC differentiation, but we did not observe any significant change.

We hypothesized that in physiological conditions, EPC lying in the luminal surface of pulmonary arteries can come into contact with EC or migrate into the intima and interact with SMC, thus acquiring a mesenchymal phenotype. In this respect, we found that SMC exerted greater stimulus on EPC migration than EC, suggesting that in pathological conditions this may hamper the normal process of endothelial repair and thus promote vascular remodelling. SMC can release several stimulatory cytokines, including TGFβ1, that can actively induce EPC to migrate towards the intima. Other authors have reported the pro-migratory function of TGFβ1 in bone marrow mesenchymal stem cells.<sup>34</sup> In this respect, it is interesting to note that in our study, both SB-431542 and BQ-123 inhibited the migration capacity of EPC. We also evaluated the adhesion capacity of EPC treated with SB-431542 and BQ-123. In both cases, we did not observe significant changes, indicating that adhesion capacity was not regulated by these pathways. Interestingly, the ability of EPC to form tubules in co-cultures with EC, the proliferation rate, and apoptosis were not affected by TGFβRI inhibition. In this respect, functionality of EPC to integrate in EC tubules was also preserved in the presence of this inhibitor.

Accordingly, TGFβRI blockage may provide two mechanisms favouring endothelial repair. On the one hand, decreasing the migratory capacity of EPC could avoid the migration and eventual proliferation of these cells into the intimal layer. On the other hand, the blockage of TGFβRI could facilitate the differentiation of EPC into EC. Altogether, our results suggest that EPC combined with TGFβRI blocking agents could facilitate endothelial repair and at the same time prevent the contribution of EPC to vascular remodelling.

## Study limitations

To avoid the partial differentiation of progenitor cells, we used a restricted number of passages during their expansion. This fact conditioned the total number of cells obtained, especially after cell sorting, limiting the number of experiments. Also, the need of cell contact to achieve complete differentiation of EPC makes difficult some techniques such as the identification of lineages, as well as to address the action of blocking agents on a specific cell type. Transferability of qDots in co-culture experiments could be greater than expected. This fact could blunt some differences in the percentage

of differentiation of EPC during FACS analysis, especially when they were co-cultured with EC.

## Supplementary material

Supplementary material is available at *Cardiovascular Research* online.

## Acknowledgments

We thank the confocal microscopy facility (Serveis Científicotècnics, Universitat de Barcelona-IDIBAPS) for technical assistance; Isabel Crespo for her expert technical assistance in flow cytometry; Jordi Alcaraz for help with matrigel assays; and Fernando Rodríguez-Pascual for technical guidance.

**Conflict of interest:** none declared.

## Funding

This work was supported by grants FIS 06/0360, MTV 08–1310, SEPAR-2005, Ferrer/FUCAP 2007 and EU IP-018725 (Pulmotension). The group formed by the authors is integrated into the CIBERES (ISCIII CB06/06). M.M.M. is the recipient of a Sara Borrell award CD08/00182 from the Spanish Ministry of Science and Technology.

## References

1. Raoul W, Wagner-Ballon O, Saber G, Hulin A, Marcos E, Giraudier S *et al.* Effects of bone marrow-derived cells on monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Respir Res* 2007;**8**:8.
2. Takahashi M, Nakamura T, Toba T, Kajiwara N, Kato H, Shimizu Y. Transplantation of endothelial progenitor cells into the lung to alleviate pulmonary hypertension in dogs. *Tissue Eng* 2004;**10**:771–779.
3. Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, Kugathasan L, Zhang Q, Stewart DJ. Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease. *Circ Res* 2005;**96**:442–450.
4. Saiura A, Sata M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M. Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nat Med* 2001;**7**:382–383.
5. Sata M. Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling, and lesion formation. *Trends Cardiovasc Med* 2003;**13**:249–253.
6. Peinado VI, Ramirez J, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Barbera JA. Identification of vascular progenitor cells in pulmonary arteries of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2006;**34**:257–263.
7. Diez M, Barbera JA, Ferrer E, Fernandez-Lloris R, Pizarro S, Roca J *et al.* Plasticity of CD133+ cells: role in pulmonary vascular remodeling. *Cardiovasc Res* 2007;**76**:517–527.
8. Frid MG, Kale VA, Stenmark KR. Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circ Res* 2002;**90**:1189–1196.
9. Arciniegas E, Sutton AB, Allen TD, Schor AM. Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *J Cell Sci* 1992;**103**:521–529.
10. Moonen JR, Krenning G, Brinker MG, Koerts JA, van Luyn MJ, Harmsen MC. Endothelial progenitor cells give rise to pro-angiogenic smooth muscle-like progeny. *Cardiovasc Res* 2010;**86**:506–515.
11. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E *et al.* Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 2007;**13**:952–961.
12. Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype?. *Nat Rev Cancer* 2007;**7**:415–428.
13. Radisky DC. Epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci* 2005;**118**:4325–4326.
14. Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Watabe T, Miyazono K. Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J Cell Sci* 2008;**121**:3317–3324.
15. Jain R, Shaul PW, Borok Z, Willis BC. Endothelin-1 induces alveolar epithelial-mesenchymal transition through endothelin type A receptor-mediated production of TGF-beta1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007;**37**:38–47.
16. Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, Lusinskas FW. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res* 2007;**101**:234–247.
17. Martinez-Estrada OM, Lettice LA, Essafi A, Guadix JA, Slight J, Velecela V *et al.* Wt1 is required for cardiovascular progenitor cell formation through transcriptional control of Snail and E-cadherin. *Nat Genet* 2010;**42**:89–93.

18. Callahan JF, Burgess JL, Fornwald JA, Gaster LM, Harling JD, Harrington FP et al. Identification of novel inhibitors of the transforming growth factor beta1 (TGF-beta1) type 1 receptor (ALK5). *J Med Chem* 2002;**45**:999–1001.
19. Ihara M, Noguchi K, Saeki T, Fukuroda T, Tsuchida S, Kimura S et al. Biological profiles of highly potent novel endothelin antagonists selective for the ETA receptor. *Life Sci* 1992;**50**:247–255.
20. Castanares C, Redondo-Horcajo M, Magan-Marchal N, ten Dijke P, Lamas S, Rodriguez-Pascual F. Signaling by ALK5 mediates TGF-beta-induced ET-1 expression in endothelial cells: a role for migration and proliferation. *J Cell Sci* 2007;**120**:1256–1266.
21. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;**25**:402–408.
22. Li S, Wang DZ, Wang Z, Richardson JA, Olson EN. The serum response factor coactivator myocardin is required for vascular smooth muscle development. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;**100**:9366–9370.
23. Hay ED. Theory for epithelial-mesenchymal transformation based on the “fixed cortex” cell motility model. *Cell Motil Cytoskeleton* 1989;**14**:455–457.
24. Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007;**293**:L1–L8.
25. Paruchuri S, Yang JH, Aikawa E, Melero-Martin JM, Khan ZA, Loukogeorgakis S et al. Human pulmonary valve progenitor cells exhibit endothelial/mesenchymal plasticity in response to vascular endothelial growth factor-A and transforming growth factor-beta2. *Circ Res* 2006;**99**:861–869.
26. Niessen K, Fu Y, Chang L, Hoodless PA, McFadden D, Karsan A. Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization. *J Cell Biol* 2008;**182**:315–325.
27. Postigo AA. Opposing functions of ZEB proteins in the regulation of the TGFbeta/BMP signaling pathway. *EMBO J* 2003;**22**:2443–2452.
28. Morita T, Mayanagi T, Sobue K. Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. *J Cell Biol* 2007;**179**:1027–1042.
29. Vincent T, Neve EP, Johnson JR, Kukalev A, Rojo F, Albanell J et al. A SNAIL1-SMAD3/4 transcriptional repressor complex promotes TGF-beta mediated epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol* 2009;**11**:943–950.
30. Kasai H, Allen JT, Mason RM, Kamimura T, Zhang Z. TGF-beta1 induces human alveolar epithelial to mesenchymal cell transition (EMT). *Respir Res* 2005;**6**:56.
31. Park J, Setter V, Wixler V, Schneider H. Umbilical cord blood stem cells: induction of differentiation into mesenchymal lineages by cell-cell contacts with various mesenchymal cells. *Tissue Eng Part A* 2009;**15**:397–406.
32. Castanares C, Redondo-Horcajo M, Magan-Marchal N, Lamas S, Rodriguez-Pascual F. Transforming growth factor-beta receptor requirements for the induction of the endothelin-1 gene. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;**231**:700–703.
33. Tojo M, Hamashima Y, Hanyu A, Kajimoto T, Saitoh M, Miyazono K et al. The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor-beta. *Cancer Sci* 2005;**96**:791–800.
34. Andrades JA, Han B, Becerra J, Sorgente N, Hall FL, Nimni ME. A recombinant human TGF-beta1 fusion protein with collagen-binding domain promotes migration, growth, and differentiation of bone marrow mesenchymal cells. *Exp Cell Res* 1999;**250**:485–498.

## **Supplementary materials**

### **Endothelial progenitor cells undergo an endothelial to mesenchymal transition-like process mediated by TGF $\beta$ RI**

Marta Díez\*, Melina M. Musri\*, Elisabet Ferrer, Joan A. Barberà, Víctor I. Peinado

Department of Pulmonary Medicine, Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS); Ciber de Enfermedades Respiratorias, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

\*Both authors contributed equally to this work

## **Expanded Methods**

### ***2.1 Primary Cell Cultures***

The EPC used were human hematopoietic progenitor cells CD133<sup>+</sup> obtained from Cambrex Bio Science (Walkersville, MD, USA). Before use, the EPC were expanded for 10 days in flasks at a density of  $1 \times 10^5$  cells/ml in stem span medium supplemented with Flt-3ligand (100 ng/ml), StemCell factor (100 ng/ml) and Thrombopoietin (100 ng/ml) (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada). The cells were characterized for stem cell markers as described elsewhere [7].

Pulmonary artery EC, HPAE-26, were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Primary cells were cultured in endothelial cell growth medium (ECGM) composed of F-12K nutrient mixture (GIBCO BRL, Grand Island, NY, USA) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS), penicillin/streptomycin (100 U/ml), heparin (0.1 mg/ml) and endothelial cell growth factor (0.03 mg/ml) and used at passage 2-4.

Pulmonary artery SMC were obtained from Cambrex Bio Science. Primary cells were cultured in SMC growth medium (SMCGM) composed of SMC basal medium

(Clonetics, Cambrex) supplemented with 5% FBS, insulin, human fibroblast growth factor (hFGF-b), gentamicin/amphotericin-B and human epidermal growth factor (hEGF) (SmGM-2 SingleQuots, Clonetics, Cambrex). Cells were used at passage 2-4. All cell lines were maintained in a humidified atmosphere at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>.

### ***2.3.2 Conditioned Medium***

The concentration of TGFβ1 in SMC-CM cultured in serum free media for 48 h was quantified by ELISA (Quantikine TGFβ1 kit, R&D Systems, Minneapolis, MN). CM was concentrated with Amicon Ultra-4 3K (Millipore). To quantify biologically active TGFβ1 the media was acid-activated according to the manufacturer's instructions and compared with untreated media.

### ***2.11 Matrigel assay***

3D cultures were established by polymerizing 100 μl of Matrigel (BD Bioscience) on 8-well glass slides. PKH26-labeled EPC ( $3 \times 10^4$  cells/well) were coplated with  $3 \times 10^4$  EC-GFP+ that were obtained by sorting GFP+ cells after 72 hours of infection with a lentiviral vector encoding enhanced green fluorescent protein (eGFP). Cells were seeded on Matrigel in assay medium consisting of normal growth medium with 10% FBS in the absence and presence of 10 μM SB-431542 at 37°C, 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere for 3 hours before to capture the images. Time lapse fluorescence confocal microscopy experiments were carried out using a Leica TCS SL laser scanning confocal spectral microscope (Leica Microsystems) with temperature and CO<sub>2</sub> control. To visualize GFP and PKH26, images were acquired using 10x objective lens, and 488 and 543 nm laser lines. Stacks of 4 images were taken at 5 minute intervals for 6 hours. All experiments were performed at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. The dynamics of cell interaction during tubule formation and the maximal fluorescence intensity were quantified using

Image J software (Wayne Rasband, National Institute of Health, USA) and the colocalization Highlighter plugin (P.

Bourdoncle, Institute Jacques Monod, Services Imagerie, Paris, France).

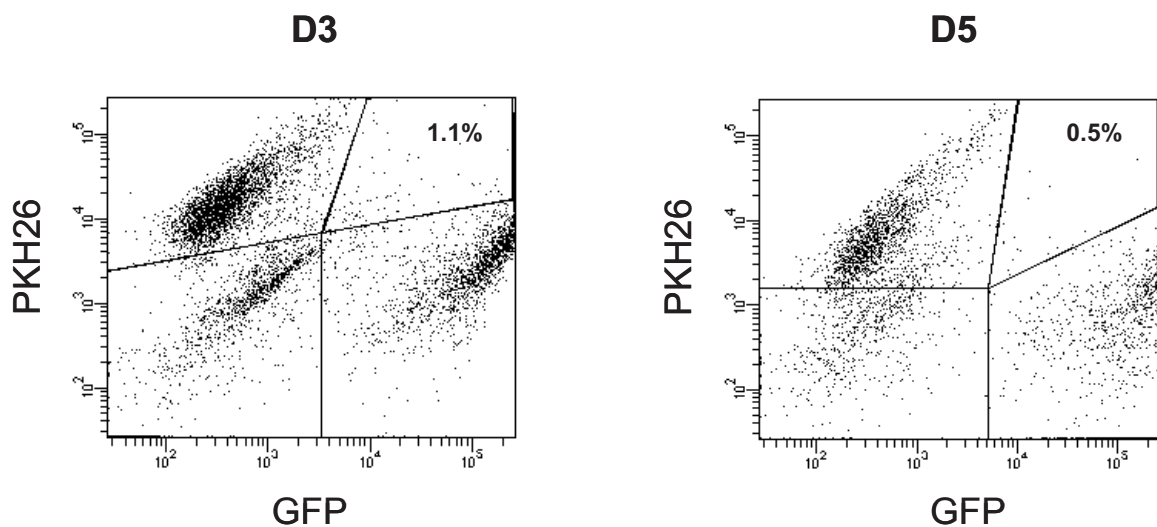
**Supplementary table 1. Primer sequences**

	<b>Forward</b>	<b>Revers</b>
<b>Gapdh</b>	CACCAACTGCTTAGCACCCC	TCTTCTGGGTGGCAGTGATG
<b>Slug</b>	TGCGATGCCAGTCTAGAAA	TGCAGTGAGGGCAAGAAAAA
<b>Snail</b>	CCCAGTGCCTCGACCACTAT	CCAGATGAGCATTGGCAGC
<b>Zeb1</b>	GGCAACCAGTTCTCCTCAGG	TTGGATGCAAGATTGGCTTG
<b>Zeb2</b>	GAGCACATCAAGTACCGCCA	ACCTGCTCCTTGGGTTAGCA
<b>VE-cadherin</b>	GATGCAGACGACCCCACTGT	CCACGATCTCATACTGGCC
<b>CD31</b>	AAAGTCGGACAGTGGGACGT	GGCTGGGAGAGCATTTCACA
<b>VegfR2</b>	TCAGGCAGCTCACAGTCCTAGA	ACTTGTCGTCTGATTCTCCAGTT
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	TTTCCGCTGCCAGAGAC	GTCAATATCACACTTCATGATGCTGT
<b>Mycd</b>	GCACCAAGCTCAGCTTAAGGA	TGGGAGTGGGCTGGTTT
<b>sm22<math>\alpha</math></b>	CCGGTTAGGCCAAGGCTC	GCGGCTCATGCCATAGGA
<b>Endothelin-1</b>	TGCCACCTGGACATCATTTG	GACCTAGGGCTTCCAAGTCCAT

**Supplementary table 2.** Effects of SB-431542 and BQ-123 on cell proliferation and apoptosis

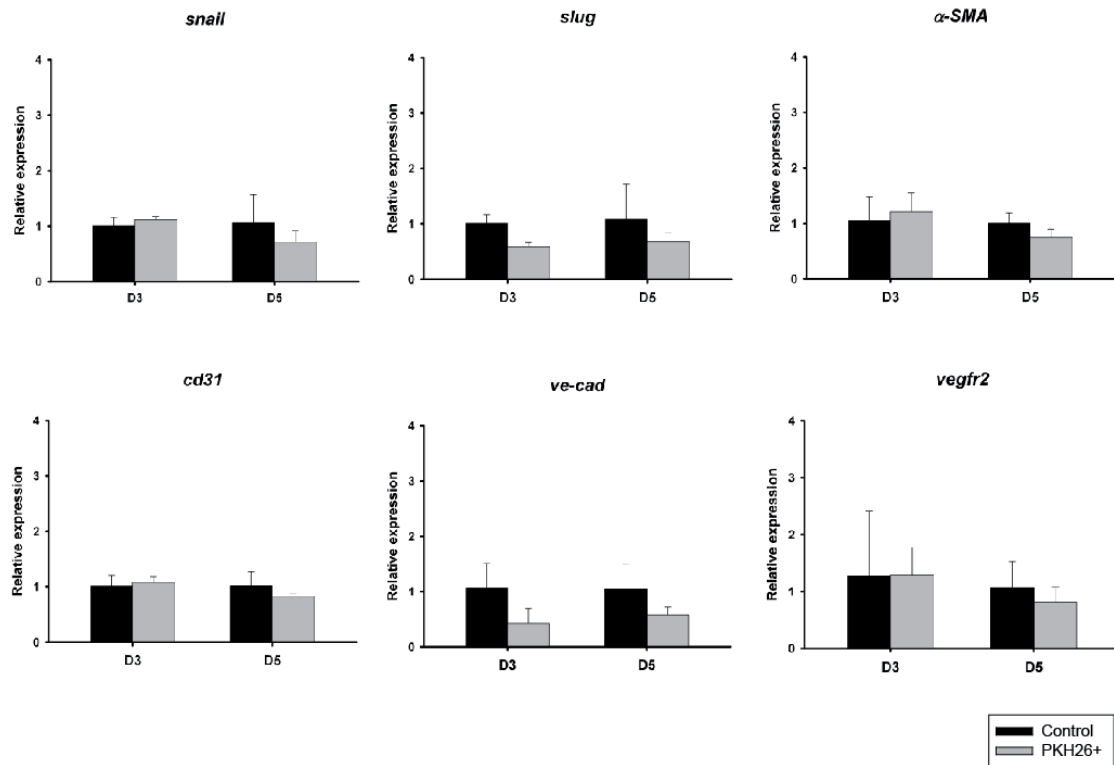
		Control (n=3)	+ SB-431542 (n=3)	Control (n=3)	+ BQ-123 (n=3)
Apoptosis, %	EPC	5.5±2.4	7.7±4.5	6.9±3.2	9.1±6.1
	SMC	6.4±6.1	4.3±4.1	12.7±11.9	10.7±10.1
Proliferation, %	EPC	6.1±3.5	7±3.4	10.5±5.8	9±5.7
	SMC	11.9±5.4	10.7±4	6.1±3.5	7±3.4

**Supplementary figure 1**



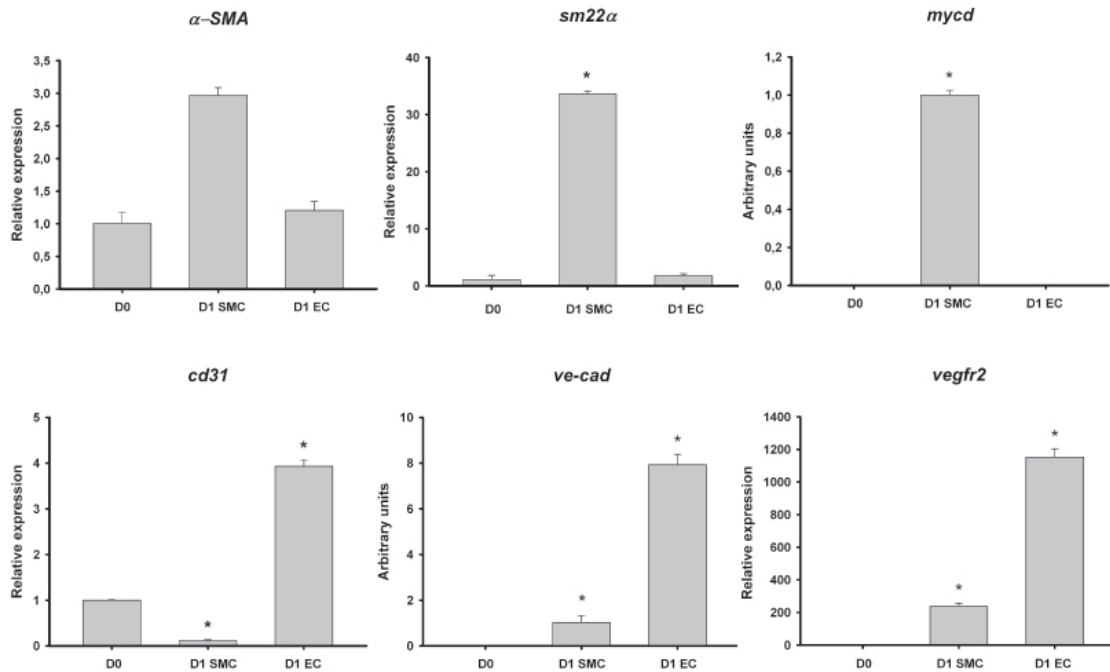
**Supplementary figure 1.** Representative flow cytometric analysis for the transferability of PKH26 from labeled EPC to GFP-SMC in co-cultures during 3 and 5 days (D3 and D5 respectively).

## Supplementary figure 2



**Supplementary figure 2.** Effects of PKH26 in the gene expression of EnMT-related transcriptional factors (snail and slug) and endothelial (cd31, ve-cad and vegfr2) and mesenchymal ( $\alpha$ -SMA) cell markers in EPC cultured for 3 and 5 days (D3 and D5 respectively). The gene expression of sm22 $\alpha$  and myocardin was not detectable in both groups. Abbreviations: ve-cad, ve-cadherin; vegfr2, vascular endothelial growth factor 2;  $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -smooth muscle cell actin.

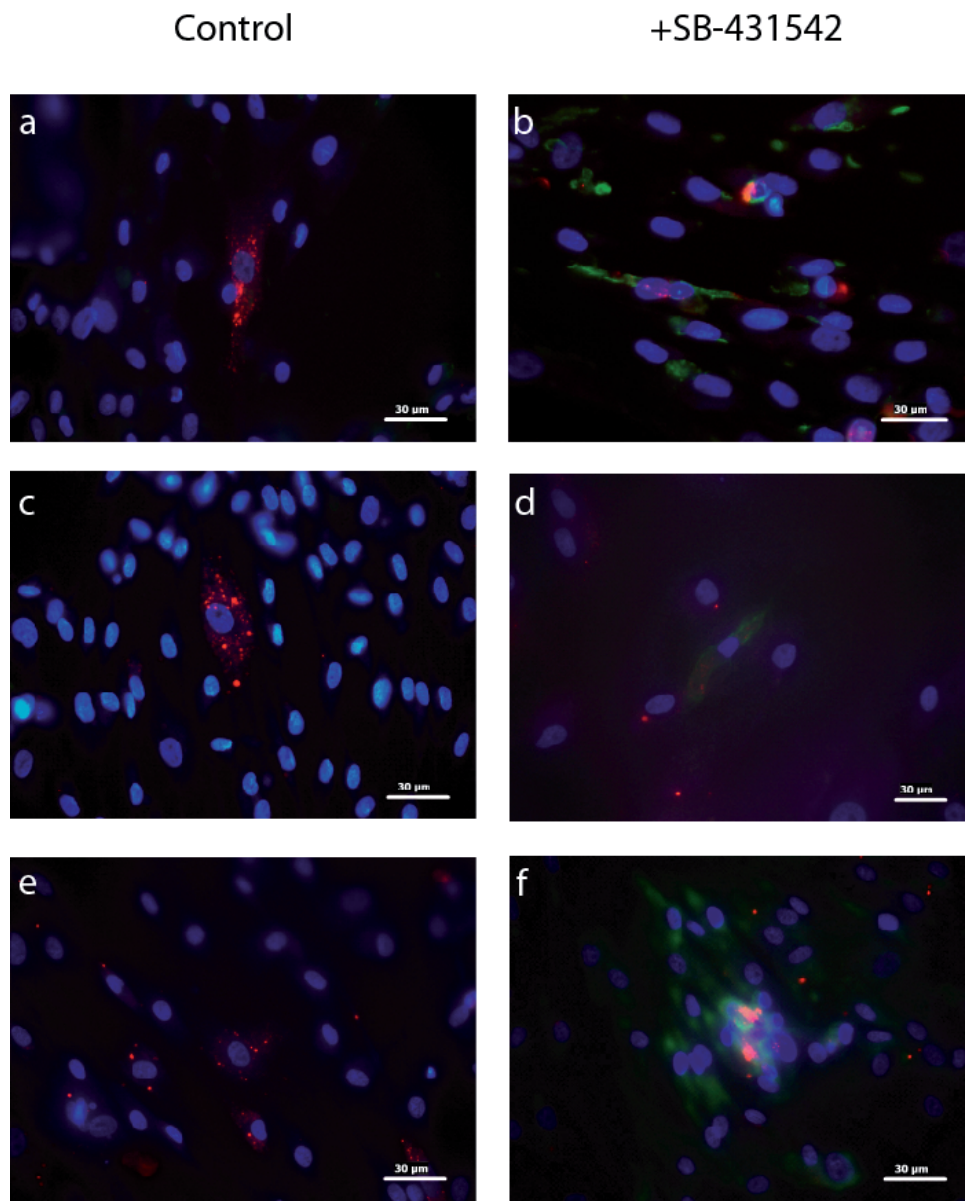
### Supplementary figure 3



**Supplementary figure 3.** Gene expression analysis of mesenchymal cell markers ( $\alpha$ -SMA, sm22 $\alpha$  and mycd) and endothelial cell markers (cd31, ve-cad and vegfr2) in EPC co-cultured with SMC (D1 SMC) or with EC (D1 EC) and separated by cell sorting at day 1. \* p<0.05 compared with EPC at day 0 (D0). Arbitrary units were used when gene expression was not detected at D0. Abbreviations:  $\alpha$ -SMA,  $\alpha$ -smooth muscle cell actin; mycd, myocardin; vegfr2, vascular endothelial growth factor receptor 2; ve-cad, ve-cadherin.



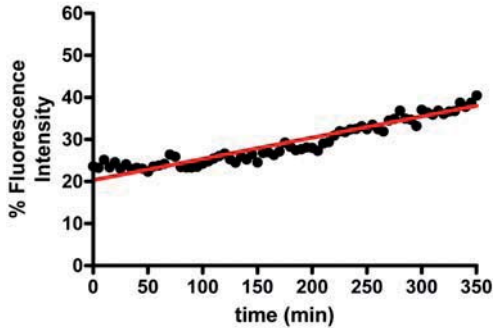
## Supplementary figure 4



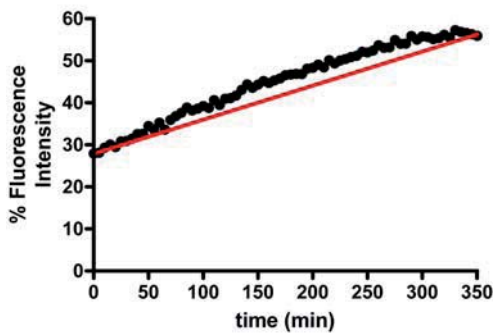
**Supplementary figure 4.** Merged images of CD31 (a,b), ve-cad (c,d) and vegfr2 (e,f) immunofluorescence in PKH26-labeled EPC (red) co-cultured with SMC for 6 days in absence or presence of SB-431542. Co-cultures were immunostained with a monoclonal antibody against CD31, ve-cad or vegfr2 (green). Nuclei (blue) were counterstained with DAPI. Abbreviations: ve-cad, ve-cadherin; vegfr2, vascular endothelial growth factor receptor 2.

## Supplementary figure 5

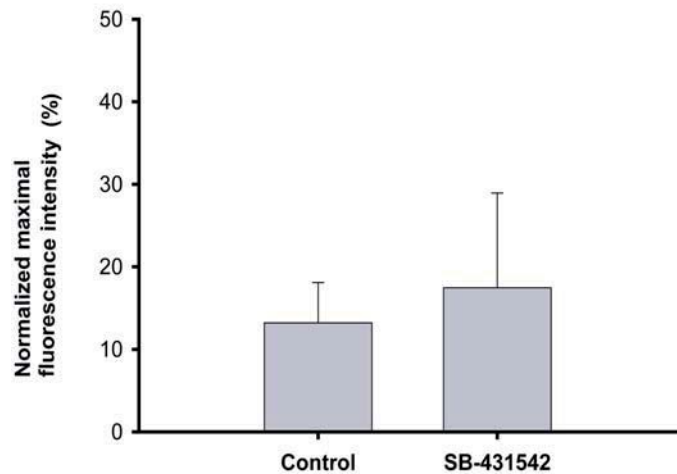
### A) Control



### B) + SB-431542



### C)



**Supplementary figure 5.** Quantification of EPC interaction during tubule formation by EC. Representative graphs of one experiment showing the minute pattern of % fluorescence intensity from co-cultures in control condition (A) or adding SB-431542 (10  $\mu$ M) (B). Quantification of % normalized maximal fluorescence intensity from co-cultures in presence or absence of SB-431542. Mean values  $\pm$  SE from two experiments are shown (C). Co-cultures were prepared by co-plating PKH26-labeled EPC (red) and EC-GFP+ (green) on Matrigel, and images were captured every 5 minutes over 6 hours by a fluorescence confocal microscopy. To obtain the % of fluorescence intensity, total pixel intensity of red cell area was divided by total pixel intensity of green and red cells.

A linear regression analysis was performed from a dot plot of % fluorescence intensity for every time point and the slope was calculated. The normalized maximal fluorescence intensity also was calculated and compared between different groups.

**Segon treball****EPC en contacte amb SMC segueixen un procés similar al d'EnMT mitjançant****TGF $\beta$ RI**

Amb el primer treball vam demostrar la plasticitat de les EPC per diferenciar-se a EC i SMC *in vitro*, i la capacitat d'aquestes per diferenciar-se a EC en l'endoteli vascular o bé infiltrar-se a la capa íntima de les artèries pulmonars i diferenciar-se a SMC, contribuint també al procés de remodelat vascular. Els mecanismes que regulen la diferenciació i la migració de les EPC no es coneixen. L'estudi d'aquests mecanismes ens ajudaria a entendre la contribució de les EPC en el remodelat vascular associat a la MPOC i ens aportaria importants coneixements a l'hora de desenvolupar una teràpia amb EPC dirigida a reparar l'endoteli, i així evitar la progressió del remodelat vascular. Per tant, aquest segon treball està dirigit a estudiar els mecanismes moleculars implicats en la diferenciació de les EPC a EC i SMC, i intentar bloquejar la diferenciació de les EPC a SMC pensant en la possibilitat d'una teràpia cel·lular combinada amb fàrmacs que eviti els efectes adversos d'aquestes.

Els resultats d'aquest estudi es resumeixen a continuació:

1. **El contacte amb les SMC indueix l'expressió gènica dels marcadors mesenquimals en les EPC.**

Amb l'objectiu de determinar el patró d'expressió gènica dels marcadors mesenquimals i endotelials durant la diferenciació de les EPC, aquestes es van co-cultivar amb SMC o EC i després de 1, 3, o 5 dies es van separar mitjançant *cell sorting*. L'anàlisi de l'expressió gènica dels marcadors es va realitzar mitjançant *Real Time PCR*. Els resultats demostren un augment de l'expressió dels marcadors mesenquimals,  $\alpha$ -SMA, sm22 $\alpha$  i miocardina, en les EPC co-cultivades amb SMC a partir del dia 1. En aquestes

mateixes condicions, també s'observa una disminució de l'expressió del marcador endotelial CD31 i tot i que l'expressió d'altres marcadors endotelials com VE-caderina o VEGFR2 augmenten, aquest augment és molt menor comparat amb el que s'observa quan les EPC es co-cultiven amb EC.

## 2. Les SMC indueixen l'expressió gènica dels factors de transcripció relacionats amb el procés d'EnMT en les EPC.

Els resultats del primer apartat indiquen que durant la diferenciació de les EPC a SMC aquestes poden seguir un procés similar al d'EnMT, ja que s'observa un augment de l'expressió dels marcadors mesenquimals i en paral·lel una disminució de l'expressió de marcadors endotelials. Per tal de comprovar si aquest procés està implicat en la diferenciació de les EPC cap a SMC es va analitzar l'expressió gènica dels principals factors de transcripció relacionats amb el procés d'EnMT: Snail, Slug, ZEB1 i ZEB2. Tant en les EPC co-cultivades amb SMC durant 3 i 5 dies, com en les cultivades durant 48 hores amb medi condicionat de SMC (EPC separades del cultiu de SMC mitjançant *trans-wells*) l'expressió gènica dels factors Snail, Slug i ZEB1 augmenta significativament en comparació amb les EPC cultivades soles. Aquest augment també s'observa en les EPC tractades amb TGF $\beta$ 1 (un dels principals iniciadors del procés d'EnMT), en canvi en les cèl·lules tractades amb VEGF (un repressor d'EnMT) l'expressió d'Snail i Slug disminueix.

## 3. L'expressió dels factors de transcripció Snail i Slug és necessària per la completa diferenciació de les EPC.

Tal i com es demostra a l'apartat anterior, durant el procés de diferenciació de EPC a SMC s'expressen alguns factors de transcripció relacionats amb l'EnMT, com Snail i

Slug. Per tal de comprovar si aquests factors són necessaris per l'adquisició del fenotip mesenquimal, es van realitzar co-cultius de EPC transfectades amb RNA d'interferència contra Snail o Slug junt amb SMC durant 6 dies i posteriorment es van valorar els filaments de  $\alpha$ -SMA mitjançant immunofluorescència. Els resultats mostren una disminució dels filaments de  $\alpha$ -SMA en les EPC transfectades en comparació amb els cultius control. En aquestes mateixes condicions, també es va valorar la diferenciació a EC de les EPC transfectades mitjançant citometria de flux, i els resultats no mostren un augment del percentatge de cèl·lules UEA+ (específic de EC). La sobreexpressió d'Snail o Slug en les EPC cultivades soles tampoc va induir la seva diferenciació cap a SMC.

#### 4. La inhibició del TGF $\beta$ RI regula negativament l'expressió gènica d'Snail en les EPC.

Varis estudis han posat en evidència el paper del TGF $\beta$ 1 com a iniciador del procés d'EnMT. Per tal d'estudiar l'efecte de la inhibició de la via del TGF $\beta$ 1 sobre l'expressió d'Snail i Slug durant la diferenciació de les EPC, es va analitzar l'expressió gènica d'aquests factors en EPC co-cultivades amb SMC durant 3 i 5 dies, i en EPC cultivades amb medi condicionat de SMC després d'afegir SB-431542 (un inhibidor específic del TGF $\beta$ RI). En presència de l'inhibidor l'expressió d'Snail disminueix en ambdues condicions, però l'expressió d'Slug augmenta en les EPC co-cultivades amb SMC i no varia en les EPC cultivades amb medi condicionat de SMC.

#### 5. SMC indueixen l'expressió d'ET-1 en les EPC.

Després de comprovar que la diferenciació de EPC a SMC segueix un procés similar al d'EnMT, i tenint en compte que l'ET-1 es considera un dels principals iniciadors d'aquest procés, es va estudiar l'expressió gènica d'aquesta tant en EPC cultivades en

medi condicionat de SMC, com en EPC tractades amb TGF $\beta$ 1. En els dos casos s'observa un augment de l'expressió d'ET-1, tot i que en el cas de les EPC tractades amb TGF $\beta$ 1 aquest augment no es significatiu.

6. La inhibició de TGF $\beta$ RI disminueix la diferenciació de EPC a SMC i facilita la seva diferenciació a EC.

A continuació es va avaluar l'efecte de la inhibició del TGF $\beta$ RI i del receptor A de l'endotelina-1 (ETA) sobre la diferenciació de les EPC. Per això, els co-cultius de EPC amb SMC es van tractar amb SB-431542 o BQ-123 (inhibidor específic d'ETA) i 6 dies després es van avaluar mitjançant immunofluorescència i citometria de flux. Els resultats mostren que el tractament amb SB-431542 redueix la formació dels filaments de  $\alpha$ -SMA i augmenta el percentatge de EPC diferenciades a EC (es mesura per l'afinitat a UEA), en canvi no s'observa cap diferència entre els cultius tractats amb BQ-123 i els cultius control. Per tal de comprovar aquest resultat es va avaluar l'expressió gènica dels marcadors mesenquimals i endotelials en els co-cultius tractats amb SB-431542. En aquest cas, l'expressió dels marcadors mesenquimals ( $\alpha$ -SMA, sm22 $\alpha$  i miocardina) disminueix significativament en les EPC dels co-cultius tractats amb l'inhibidor, mentre que l'expressió de marcadors endotelials (CD31, VE-caderina i VEGFR2) augmenta significativament en aquestes condicions.

7. La inhibició del TGF $\beta$ RI i ETA disminueix la capacitat de migració de les EPC.

Els assaigs de migració es van realitzar en cultius de EPC separats de SMC o EC mitjançant *trans-wells* en presència o absència dels inhibidors SB-431542 o BQ-123. Els resultats demostren una major capacitat de migració de les EPC en presència de SMC. També s'observa una disminució en la migració de les EPC en presència

d'ambdós inhibidors. Per últim, no s'observa cap efecte dels inhibidors sobre la capacitat d'adhesió de les EPC.

8. La inhibició de TGF $\beta$ R1 i ETA no afecta l'apoptosi i la proliferació cel·lular.

Els percentatges d'apoptosi i de proliferació cel·lular en els cultius de EPC i SMC tractats amb SB-431542 o BQ-123 no varien en comparació amb els cultius control.

9. La inhibició de TGF $\beta$ R1 no afecta la funcionalitat de les EPC.

Després de comprovar l'efecte de la inhibició del TGF $\beta$ R1 sobre la diferenciació i la migració de les EPC, es va avaluar l'efecte sobre la funcionalitat mesurant la seva habilitat per integrar-se a les estructures tubulars formades per les EC en assaigs amb Matrigel en presència o absència de SB-431542. En aquestes condicions no observem diferències en el comportament de les EPC entre els cultius tractats amb l'inhibidor i els cultius control.





*Discussió*

Les alteracions vasculars en la circulació pulmonar representen un component important en la malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC). Les alteracions a l'estructura dels vasos són molt prevalents i les anormalitats en la seva funció dificulten l'intercanvi de gasos i provoquen hipertensió pulmonar (HP), un dels principals factors associats amb una baixa supervivència en la MPOC. Les opcions terapèutiques adreçades a tractar les anormalitats vasculars i la HP associada a la MPOC són limitades. Actualment, l'oxigenoteràpia dirigida a corregir la hipoxèmia és l'únic tractament eficaç a l'hora de retardar o revertir la progressió de la HP (Weitzenblum et al, 1985). Tot i així, la pressió pulmonar arterial rarament retorna als valors normals i les anormalitats en l'estructura dels vasos pulmonars no es corregeixen (Wilkinson et al, 1988a). D'altra banda, no es recomana el tractament amb vasodilatadors perquè provoquen efectes adversos en l'intercanvi de gasos, ja que inhibeixen la vasoconstricció hipòxica (Barbera et al, 1996).

Actualment, molts estudis emmarcats en la HP suggereixen que els tractaments adreçats a corregir la disfunció endotelial i/o la destrucció de la capa endotelial dels vasos, una causa probable de HP associada a la MPOC, podrien revertir la progressió d'aquesta malaltia. Per aquest motiu la idea de repoblar la circulació pulmonar amb EC funcionals esdevé molt atractiva. En aquest sentit, les EPC ofereixen un gran potencial ja que tenen la capacitat de diferenciar-se a EC madures, i alguns estudis en models animals ja han demostrat que l'administració de EPC pot inhibir la HP i el remodelat vascular accelerant la reparació de l'endoteli dels vasos lesionats. Tot i el paper beneficiós d'aquestes cèl·lules, alguns estudis demostren la participació de les EPC en la progressió de lesions vasculars, contribuint a la hiperplàsia de la íntima. Estudis anteriors del nostre grup centrats en pacients amb MPOC, demostren un augment del nombre de EPC infiltrant la íntima hiperplàsica de les artèries pulmonars, properes a

zones denudades de l'endoteli i una correlació entre el número de EPC i el gruix de la paret arterial, suggerint una relació amb el grau de remodelat vascular (Peinado et al, 2006).

Els resultats del primer treball d'aquesta tesi demostren la plasticitat de les EPC circulants derivades de medul·la òssia per diferenciar-se a EC i SMC tant en cultius *in vitro* com en explants d'artèries pulmonars humanes. Els co-cultius de EPC derivades de medul·la òssia (cèl·lules AC133+) amb SMC o EC posen en evidència la multipotencialitat d'aquestes cèl·lules, és a dir, la capacitat d'aquestes cèl·lules per diferenciar-se a qualsevol tipus cel·lular de la mateixa capa germinal. De moment no es coneix amb exactitud quines són les citosines o factors de creixement alliberats per les SMC o les EC que poden estar actuant sobre la diferenciació de les EPC, però el fet que no s'observi una completa diferenciació en cultius de EPC separats de cultius de SMC o EC mitjançant una membrana, indica la importància del contacte cel·lular en aquest procés. D'altra banda, el microambient o el que també s'anomena nínxol en el que es troben les cèl·lules mare és un factor determinant per la seva diferenciació (Scadden, 2006). Per això es va realitzar una segona tanda d'experiments en els que es van injectar EPC dins d'explants d'artèries pulmonars humanes remodelades per tal de poder entendre millor el paper que aquestes cèl·lules juguen en el remodelat vascular associat a la MPOC. Els resultats d'aquests experiments mostren un paper dual de les EPC, ja que aquestes tenen capacitat per adherir-se a l'endoteli i diferenciar-se a un llinatge endotelial, contribuint a la reparació vascular, però alhora també poden migrar des del lumen cap a la capa íntima de les artèries i adquirir un fenotip mesenquimal, contribuint així a la hiperplàsia de la íntima, i per tant a la patogènesi del remodelat vascular. Aquests resultats recolzen altres estudis que demostren que les EPC també estan

implicades en la progressió de patologies vasculares, contribuint a la proliferació de SMC i a la hiperplàsia de la íntima (Saiura et al, 2001; Sata et al, 2002).

És interessant destacar que les EPC que migren cap a la capa íntima es situen prop de les àrees denudades de l'endoteli, el que indica que l'endoteli també actua com a barrera per impedir el pas de les EPC cap a la íntima, i d'aquesta forma també evita la progressió del remodelat vascular. Per últim, els estudis mitjançant *immunofish* de les artèries incubades amb EPC indiquen que la fusió cel·lular no és un fenomen estrany en l'endoteli, però el fet que no s'observin EPC amb nuclis poliploids indica que aquestes adquireixen el fenotip de les cèl·lules madures mitjançant un procés de diferenciació i no de fusió cel·lular.

Aquestes dades són importants des de el punt de vista de la capacitat de regeneració de les EPC. Tots aquests resultats suggereixen que abans de considerar l'ús de EPC derivades de la medul·la òssia com a opció terapèutica pel tractament del remodelat vascular associat a la MPOC, són necessaris estudis més detallats centrats en els mecanismes moleculars implicats en la diferenciació i migració d'aquestes cèl·lules per tal d'evitar els efectes adversos que aquestes poden ocasionar. Entendre aquests mecanismes és fonamental per tal d'aconseguir identificar els agents que modulen la diferenciació i la migració de les EPC, i evitar així la seva contribució a la progressió de la malaltia.

Amb aquest objectiu es va plantejar el segon estudi realitzat en aquesta tesi doctoral.

Els resultats d'aquest segon estudi van mostrar que durant la diferenciació de les EPC a SMC, l'expressió gènica dels marcadors mesenquimals augmenta i l'expressió dels marcadors endotelials disminueix ja en les primeres 24 hores després de co-cultivar aquests dos tipus cel·lulars, indicant que les EPC en contacte amb SMC es diferencien directament a aquest tipus cel·lular sense patir prèviament una diferenciació a EC i una

posterior transdiferenciació a SMC. En aquest context, molts estudis han descrit que durant el procés anomenat de transició de EC a cèl·lula mesenquimal (EnMT), les EC també expressen marcadors mesenquimals i perden marcadors endotelials, el que suggereix que un procés similar a aquest pot tenir lloc durant la diferenciació de les EPC (Arciniegas et al, 2007). L'expressió gènica dels factors de transcripció relacionats amb el procés d'EnMT (Snail, Slug i ZEB1) en les EPC co-cultivades amb SMC confirma que el procés d'EnMT està implicat en la diferenciació de les EPC. Aquests factors estan implicats activament en la supressió de l'E-cadherina, i per tant en la pèrdua del contacte cel·lular, un pas clau en el procés d'EnMT, i en la supressió d'altres proteïnes específiques de EC (Peinado et al, 2007). A més, també s'ha demostrat un augment de l'expressió de Snail, Slug i ZEB1 en EPC cultivades amb medis condicionats de SMC, indicant que factors solubles alliberats per les SMC contribueixen a iniciar aquesta resposta. Un dels factors coneguts alliberats per les SMC i que actua com a iniciador d'EnMT és el TGF $\beta$ 1 (Mercado-Pimentel et al, 2007; Peinado et al, 2003). Molts estudis han demostrat l'acció d'aquest factor de creixement en el procés d'EnMT durant l'embriogènesi i també en diverses patologies (Hay, 1989; Willis and Borok, 2007; Zeisberg et al, 2007b). En aquests experiments també es mostra un augment de l'expressió de Snail, Slug i ZEB1 en els cultius de EPC tractats amb TGF $\beta$ 1. Altres estudis realitzats per Kokudo et al. demostren que Snail indueix el procés d'EnMT en cèl·lules mare embrionàries derivades de EC mitjançant l'acció de TGF $\beta$ 1 (Kokudo et al, 2008). Tot això indica un paper important del TGF $\beta$ 1 en la diferenciació de les EPC a un fenotip mesenquimal. Però, tant les EPC cultivades amb medi condicionat de SMC, com les tractades amb TGF $\beta$ 1 no adquireixen la morfologia mesenquimal, fent evident que factors addicionals estimulats durant el contacte cel·lular són necessaris per la diferenciació completa de les EPC. Pel contrari, les EPC

transfectades amb RNA d'interferència contra Snail o Slug i co-cultivades amb SMC mostren una reducció dels filaments de  $\alpha$ -SMA, i per tant una inhibició parcial de la transició a SMC. Aquests resultats demostren la importància de Snail i Slug en la diferenciació de les EPC. Tot i això, la sobreexpressió d'aquests factors en les EPC cultivades soles no va ser suficient per induir la seva diferenciació a SMC, segurament degut a la manca de contacte cel·lular amb cèl·lules madures, tal i com s'ha comentat anteriorment. En conjunt, tots aquests resultats demostren per primera vegada que les EPC en contacte amb SMC pateixen un procés similar al d'EnMT.

Els resultats de l'estudi demostren que el TGF $\beta$ 1 sembla estar implicat en aquest procés. Altres autors han demostrat una inhibició del procés d'EMT (transició de la cèl·lula epitelial a cèl·lula mesenquimal) induït per TGF $\beta$ 1 quan TGF $\beta$ RI està bloquejat (Tojo et al, 2005). Per aquest motiu, en aquest estudi es va avaluar l'efecte de la inhibició del TGF $\beta$ RI sobre la diferenciació de les EPC. En primer lloc, es va comprovar que la inhibició del TGF $\beta$ RI produïa una disminució de l'expressió d'Snail tant en les EPC co-cultivades amb SMC com en les EPC cultivades amb medi condicionat de SMC. Curiosament, en aquestes mateixes condicions es va observar un augment de l'expressió d'Slug en EPC co-cultivades amb SMC, suggerint que aquest factor pot estar activat per vies diferents a TGF $\beta$ 1/TGF $\beta$ RI, però no es van produir canvis en l'expressió d'aquest en les EPC cultivades amb medi condicionat de SMC, fent palès una vegada més la importància del contacte cel·lular en la regulació de l'expressió d'aquests factors. Aquests resultats indiquen que el TGF $\beta$ 1 mitjançant el TGF $\beta$ RI pot regular l'expressió d'Snail, i que per tant està implicat en el procés d'EnMT que té lloc durant la diferenciació de les EPC. Això ens va portar a pensar que la inhibició de TGF $\beta$ RI podria bloquejar, com a mínim parcialment, el procés de diferenciació de les EPC a SMC.

El TGF $\beta$ 1 també pot induir l'expressió d'ET-1 (Castanares et al, 2006). Altres estudis han demostrat el paper de l'ET-1 en l'inici del procés d'EMT en cèl·lules epitelials de pulmó mitjançant el receptor ETA (Jain et al, 2007). En aquest estudi s'ha comprovat que en EPC cultivades amb medi condicionat de SMC també hi ha un augment de l'expressió d'ET-1, indicant que aquest pèptid pot jugar un paper important durant la diferenciació de les EPC. Per aquest motiu, en aquest segon estudi també es va avaluar l'efecte de la inhibició del receptor ETA sobre la diferenciació de les EPC.

La inhibició del TGF $\beta$ RI en els co-cultius de EPC amb SMC va disminuir la formació dels filaments de  $\alpha$ -SMA, i les anàlisis mitjançant citometria de flux van demostrar que un percentatge significatiu de EPC es van diferenciar a EC tot i estar en contacte amb SMC. Aquests resultats mostren per primera vegada que la inhibició del TGF $\beta$ RI modula la diferenciació de les EPC, inhibint parcialment la seva diferenciació a SMC i facilitant la diferenciació a EC. D'altra banda, en el cas dels co-cultius tractats amb l'inhibidor del receptor ETA no es van observar canvis respecte els co-cultius control, indicant que la inhibició d'ETA no afecta la diferenciació de les EPC cap a SMC o EC.

En aquest estudi també es va considerar de gran importància comprovar l'efecte d'aquests inhibidors sobre la capacitat de migració de les EPC, ja que tal i com s'ha demostrat anteriorment, la migració de les EPC cap a la íntima de les artèries pulmonars permet que aquestes contactin amb SMC i posteriorment es diferenciïn a aquest tipus cel·lular. Els assaigs de migració d'aquest segon estudi van mostrar en primer lloc que els cultius de SMC exerceixen un estímul més potent que els de EC sobre la capacitat de migració de les EPC. Aquests resultats, que corroboren els resultats obtinguts en el primer estudi, suggereixen que en certes situacions patològiques les SMC poden actuar alliberant factors que estimulen la migració de les EPC, el que dificulta la reparació endotelial i promou el remodelat vascular. En segon lloc, els resultats d'aquests assaigs



també van demostrar una disminució de la capacitat de migració de les EPC com a conseqüència de la inhibició del TGF $\beta$ RI o del receptor ETA, indicant que el TGF $\beta$ 1 i l'ET-1 que alliberen les SMC estan implicats en la regulació de la migració d'aquestes cèl·lules. Aquests resultats concorden amb la idea de que les EPC segueixen un procés d'EnMT induït pel TGF $\beta$ 1 a l'hora de diferenciar-se a SMC, ja que aquest procés també es caracteritza per l'adquisició d'un fenotip migratori (Andrades et al, 1999; Park et al, 2008).

Després de comprovar els efectes dels inhibidors sobre la diferenciació i la migració de les EPC, es van avaluar els efectes sobre l'adhesió cel·lular i no es van observar canvis respecte el cultiu control, indicant que l'adhesió d'aquestes cèl·lules a l'endoteli vascular i, per tant, la reparació d'aquest no es veu compromesa per l'acció d'aquests inhibidors. Per últim es va comprovar si els inhibidors afectaven el cicle cel·lular de les EPC i aspectes més funcionals de la pròpia cèl·lula. En aquest sentit, cap dels inhibidors va variar el percentatge d'apoptosi o de proliferació cel·lular. Com a mesura de funcionalitat cel·lular es va valorar la capacitat de les EPC per formar túbuls junt amb EC en assaigs amb Matrigel (tipus de matriu extracel·lular que afavoreix el creixement cel·lular) i es va comprovar que aquesta no es veia afectada per la inhibició del TGF $\beta$ RI. Per tant, la inhibició del TGF $\beta$ RI per una banda disminueix la capacitat de migració de les EPC sense afectar la seva capacitat d'adhesió, ni la funcionalitat, el que evitaria en part la migració i la proliferació d'aquestes a la íntima de les artèries pulmonars sense afectar la capacitat de reparació d'aquestes. I d'altra banda també pot prevenir la hiperplàsia de la íntima modulant el destí de les EPC, ja que s'ha demostrat que actua facilitant la seva diferenciació a EC i bloquejant parcialment la diferenciació cap a SMC.

En conjunt, aquests resultats suggereixen que en el cas que es contempli la teràpia amb EPC, la combinació amb agents bloquejants de TGF $\beta$ RI podria facilitar la reparació de l'endoteli vascular i prevenir la contribució de les EPC al remodelat vascular. Així, aquest estudi ens aporta noves dianes terapèutiques interessants per l'estudi de nous tractaments adreçats a malalties com la MPOC i la HP.

Tot i això, actualment encara no es té prou coneixement dels mecanismes moleculars que coordinen l'activació de les EPC des de la medul·la òssia, o el reclutament i la diferenciació d'aquestes als vasos. Per aquest motiu, creiem que s'ha de tenir molta cura a l'hora de plantejar una teràpia cel·lular dirigida al tractament d'aquestes patologies i seguir investigant en aquest camp en el futur.

# *Conclusions*

A partir dels resultats obtinguts en aquests dos estudis s'extreuen les següents conclusions:

1. *In vitro*, les EPC mostren plasticitat per diferenciar-se tant a EC com a SMC. Aquest procés requereix el contacte amb les EC o SMC madures.
2. En les artèries pulmonars humanes, les EPC poden diferenciar-se a EC a l'endoteli vascular, però també poden migrar cap a la íntima i diferenciar-se a SMC, suggerint que aquestes cèl·lules poden participar en el remodelat vascular pulmonar. Aquest procés de diferenciació és directe i no mitjançant processos de fusió cel·lular.
3. En co-cultiu amb SMC, les EPC es diferencien a SMC mitjançant un procés similar al procés de transició de la cèl·lula endotelial a cèl·lula mesenquimal (EnMT).
4. La inhibició del TGF $\beta$ R1 modula la diferenciació de les EPC, inhibint parcialment la seva diferenciació a SMC i facilitant la diferenciació a EC.
5. Les SMC exerceixen un efecte major sobre la migració de les EPC que les EC. La inhibició del TGF $\beta$ R1 o del receptor ETA disminueix la capacitat de migració de les EPC, indicant que el TGF $\beta$ 1 i l'ET-1 poden jugar un paper en la regulació de la migració d'aquestes cèl·lules.
6. La inhibició del TGF $\beta$ R1 no modifica la capacitat d'adhesió, de proliferació, l'apoptosi o la funcionalitat de les EPC.

# *Bibliografia*

Adams DH, Hathaway M, Shaw J, Burnett D, Elias E, and Strain AJ (1991). Transforming growth factor-beta induces human T lymphocyte migration in vitro. *J Immunol* 147:609-612.

Akhurst R (2007). TGF- $\beta$  signaling in epithelial-mesenchymal transition and invasion and metastasis. In: Derynck R and Miyazono K, editors. *The TGF-beta family*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 939-964.

Alison MR, Poulson R, Jeffery R, Dhillon AP, Quaglia A, Jacob J, Novelli M, Prentice G, Williamson J, and Wright NA (2000). Hepatocytes from non-hepatic adult stem cells. *Nature* 406:257.

Andrades JA, Han B, Becerra J, Sorgente N, Hall FL, and Nimni ME (1999). A recombinant human TGF-beta1 fusion protein with collagen-binding domain promotes migration, growth, and differentiation of bone marrow mesenchymal cells. *Exp Cell Res* 250:485-498.

Ansieau S, Bastid J, Doreau A, Morel AP, Bouchet BP, Thomas C, Fauvet F, Puisieux I, Doglioni C, Piccinin S, Maestro R, Voeltzel T, Selmi A, Valsesia-Wittmann S, Caron de FC, and Puisieux A (2008). Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell* 14:79-89.

Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, and Stenmark KR (2007). Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L1-L8.

Arciniegas E, Neves CY, Carrillo LM, Zambrano EA, and Ramirez R (2005). Endothelial-mesenchymal transition occurs during embryonic pulmonary artery development. *Endothelium* 12:193-200.

Arciniegas E, Servin M, Arguello C, and Mota M (1989). Development of the aorta in the chick embryo: structural and ultrastructural study. *Atherosclerosis* 76:219-235.

Arciniegas E, Sutton AB, Allen TD, and Schor AM (1992). Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *J Cell Sci* 103 ( Pt 2):521-529.

Armstrong EJ and Bischoff J (2004). Heart valve development: endothelial cell signaling and differentiation. *Circ Res* 95:459-470.

Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der ZR, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, and Isner JM (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 275:964-967.

Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, and Isner JM (1999). VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 18:3964-3972.

Baber SR, Deng W, Master RG, Bunnell BA, Taylor BK, Murthy SN, Hyman AL, and Kadowitz PJ (2007). Intratracheal mesenchymal stem cell administration attenuates monocrotaline-induced pulmonary hypertension and endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 292:H1120-H1128.

Barbera JA, Peces-Barba G, Agusti AG, Izquierdo JL, Monso E, Montemayor T, and Viejo JL (2001). [Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of chronic obstructive pulmonary disease]. *Arch Bronconeumol* 37:297-316.

Barbera JA, Peinado VI, and Santos S (2003). Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 21:892-905.

Barbera JA, Riverola A, Roca J, Ramirez J, Wagner PD, Ros D, Wiggs BR, and Rodriguez-Roisin R (1994). Pulmonary vascular abnormalities and ventilation-perfusion relationships in mild chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 149:423-429.

Barbera JA, Roger N, Roca J, Rovira I, Higenbottam TW, and Rodriguez-Roisin R (1996). Worsening of pulmonary gas exchange with nitric oxide inhalation in chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 347:436-440.

Barrallo-Gimeno A and Nieto MA (2005). The Snail genes as inducers of cell movement and survival: implications in development and cancer. *Development* 132:3151-3161.

Battle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, and Garcia De HA (2000). The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol* 2:84-89.

Beranek JT (1995). Vascular endothelium-derived cells containing smooth muscle actin are present in restenosis. *Lab Invest* 72:771.

Beranek JT and Cavarocchi NC (1990). Undifferentiated vascular endothelial cells in coronary allograft atherosclerosis. *Int J Cardiol* 28:127-128.

Brazelton TR, Rossi FM, Keshet GI, and Blau HM (2000). From marrow to brain: expression of neuronal phenotypes in adult mice. *Science* 290:1775-1779.

Cano A, Perez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, and Nieto MA (2000). The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol* 2:76-83.

Caplice NM and Doyle B (2005). Vascular progenitor cells: origin and mechanisms of mobilization, differentiation, integration, and vasculogenesis. *Stem Cells Dev* 14:122-139.

Castanares C, Redondo-Horcajo M, Magan-Marchal N, Lamas S, and Rodriguez-Pascual F (2006). Transforming growth factor-beta receptor requirements for the induction of the endothelin-1 gene. *Exp Biol Med (Maywood)* 231:700-703.

Celermajer DS, Adams MR, Clarkson P, Robinson J, McCredie R, Donald A, and Deanfield JE (1996). Passive smoking and impaired endothelium-dependent arterial dilatation in healthy young adults. *N Engl J Med* 334:150-154.

Chu L, Jiang Y, Hao H, Xia Y, Xu J, Liu Z, Verfaillie CM, Zweier JL, and Liu Z (2008). Nitric oxide enhances Oct-4 expression in bone marrow stem cells and promotes endothelial differentiation. *Eur J Pharmacol* 591:59-65.

Coker RK, Laurent GJ, Shahzeidi S, Hernandez-Rodriguez NA, Pantelidis P, du Bois RM, Jeffery PK, and McAnulty RJ (1996). Diverse cellular TGF-beta 1 and TGF-beta 3 gene expression in normal human and murine lung. *Eur Respir J* 9:2501-2507.

Comijn J, Berx G, Vermassen P, Verschueren K, van GL, Bruyneel E, Mareel M, Huylebroeck D, and van RF (2001). The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 7:1267-1278.

Crosby JR, Kaminski WE, Schatteman G, Martin PJ, Raines EW, Seifert RA, and Bowen-Pope DF (2000). Endothelial cells of hematopoietic origin make a significant contribution to adult blood vessel formation. *Circ Res* 87:728-730.

Cui W, Fowles DJ, Bryson S, Duffie E, Ireland H, Balmain A, and Akhurst RJ (1996). TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell* 86:531-542.

De CB, van RF, and Berx G (2005). Unraveling signalling cascades for the Snail family of transcription factors. *Cell Signal* 17:535-547.

Derynck R, Zhang Y, and Feng XH (1998). Smads: transcriptional activators of TGF-beta responses. *Cell* 95:737-740.

Diller GP, van ES, Okonko DO, Howard LS, Ali O, Thum T, Wort SJ, Bedard E, Gibbs JS, Bauersachs J, Hobbs AJ, Wilkins MR, Gatzoulis MA, and Wharton J (2008). Circulating endothelial progenitor cells in patients with Eisenmenger syndrome and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation* 117:3020-3030.

Duband JL and Thiery JP (1982). Appearance and distribution of fibronectin during chick embryo gastrulation and neurulation. *Dev Biol* 94:337-350.

Eger A, Aigner K, Sonderegger S, Dampier B, Oehler S, Schreiber M, Berx G, Cano A, Beug H, and Foisner R (2005). DeltaEF1 is a transcriptional repressor of E-cadherin and regulates epithelial plasticity in breast cancer cells. *Oncogene* 24:2375-2385.

Feng XH and Derynck R (2005). Specificity and versatility in tgf-beta signaling through Smads. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:659-693.

Ferrari G, Cusella-De AG, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, and Mavilio F (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279:1528-1530.

Foubert P, Silvestre JS, Souttou B, Barateau V, Martin C, Ebrahimian TG, Lere-Dean C, Contreres JO, Sulpice E, Levy BI, Plouet J, Tobelem G, and Le Ricousse-Roussanne S (2007). PSGL-1-mediated activation of EphB4 increases the proangiogenic potential of endothelial progenitor cells. *J Clin Invest* 117:1527-1537.

Frid MG, Kale VA, and Stenmark KR (2002). Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis. *Circ Res* 90:1189-1196.

Fujiyama S, Amano K, Uehira K, Yoshida M, Nishiwaki Y, Nozawa Y, Jin D, Takai S, Miyazaki M, Egashira K, Imada T, Iwasaka T, and Matsubara H (2003). Bone marrow



monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circ Res* 93:980-989.

Furchgott RF and Zawadzki JV (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288:373-376.

Furukawa Y, Matsumori A, Ohashi N, Shioi T, Ono K, Harada A, Matsushima K, and Sasayama S (1999). Anti-monocyte chemoattractant protein-1/monocyte chemotactic and activating factor antibody inhibits neointimal hyperplasia in injured rat carotid arteries. *Circ Res* 84:306-314.

Galie N, Torbicki A, Barst R, Darteville P, Haworth S, Higenbottam T, Olschewski H, Peacock A, Pietra G, Rubin LJ, Simonneau G, Priori SG, Garcia MA, Blanc JJ, Budaj A, Cowie M, Dean V, Deckers J, Burgos EF, Lekakis J, Lindahl B, Mazzotta G, McGregor K, Morais J, Oto A, Smiseth OA, Barbera JA, Gibbs S, Hoeper M, Humbert M, Naeije R, and Pepke-Zaba J (2004). Guidelines on diagnosis and treatment of pulmonary arterial hypertension. The Task Force on Diagnosis and Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 25:2243-2278.

Gehling UM, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld DK, and Fiedler W (2000). In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 95:3106-3112.

George J, Afek A, Abashidze A, Shmilovich H, Deutsch V, Kopolovich J, Miller H, and Keren G (2005). Transfer of endothelial progenitor and bone marrow cells influences atherosclerotic plaque size and composition in apolipoprotein E knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25:2636-2641.

Giaid A and Saleh D (1995). Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 333:214-221.

Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, and Stewart DJ (1993). Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 328:1732-1739.

Gill M, Dias S, Hattori K, Rivera ML, Hicklin D, Witte L, Girardi L, Yurt R, Himel H, and Rafii S (2001). Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+)/AC133(+) endothelial precursor cells. *Circ Res* 88:167-174.

Griese DP, Ehsan A, Melo LG, Kong D, Zhang L, Mann MJ, Pratt RE, Mulligan RC, and Dzau VJ (2003). Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation* 108:2710-2715.

Hall SM, Hislop AA, and Haworth SG (2002). Origin, differentiation, and maturation of human pulmonary veins. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26:333-340.

Hall SM, Hislop AA, Pierce CM, and Haworth SG (2000). Prenatal origins of human intrapulmonary arteries: formation and smooth muscle maturation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 23:194-203.

Hay ED (1989). Theory for epithelial-mesenchymal transformation based on the "fixed cortex" cell motility model. *Cell Motil Cytoskeleton* 14:455-457.

Hay ED (2005). The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn* 233:706-720.

Hay ED (2010). Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo. In: R.Fleischmajer and R.E Billingham, editors. *In epithelial-mesenchymal interactions*. Baltimore, Maryland, USA: William & Wilkins, 31-55.

He T, Smith LA, Harrington S, Nath KA, Caplice NM, and Katusic ZS (2004). Transplantation of circulating endothelial progenitor cells restores endothelial function of denuded rabbit carotid arteries. *Stroke* 35:2378-2384.

Heath D, Williams D, Rios-Dalenz J, Calderon M, and Gosney J (1990). Small pulmonary arterial vessels of Aymara Indians from the Bolivian Andes. *Histopathology* 16:565-571.

Helset E, Ytrehus K, Tveita T, Kjaeve J, and Jorgensen L (1994). Endothelin-1 causes accumulation of leukocytes in the pulmonary circulation. *Circ Shock* 44:201-209.

Hemavathy K, Ashraf SI, and Ip YT (2000). Snail/slug family of repressors: slowly going into the fast lane of development and cancer. *Gene* 257:1-12.

Herzog EL, Chai L, and Krause DS (2003). Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood* 102:3483-3493.

Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, and Finkel T (2003). Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348:593-600.

Hislop A and Reid L (1976). New findings in pulmonary arteries of rats with hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Br J Exp Pathol* 57:542-554.

Hoot KE, Lighthall J, Han G, Lu SL, Li A, Ju W, Kulesz-Martin M, Bottinger E, and Wang XJ (2008). Keratinocyte-specific Smad2 ablation results in increased epithelial-mesenchymal transition during skin cancer formation and progression. *J Clin Invest* 118:2722-2732.

Hristov M, Zerneck A, Bidzhekov K, Liehn EA, Shagdarsuren E, Ludwig A, and Weber C (2007). Importance of CXC chemokine receptor 2 in the homing of human peripheral blood endothelial progenitor cells to sites of arterial injury. *Circ Res* 100:590-597.

Imamichi Y and Menke A (2007). Signaling pathways involved in collagen-induced disruption of the E-cadherin complex during epithelial-mesenchymal transition. *Cells Tissues Organs* 185:180-190.

Jain R, Shaul PW, Borok Z, and Willis BC (2007). Endothelin-1 induces alveolar epithelial-mesenchymal transition through endothelin type A receptor-mediated production of TGF-beta1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 37:38-47.

Junhui Z, Xingxiang W, Guosheng F, Yunpeng S, Furong Z, and Junzhu C (2008). Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respir Med* 102:1073-1079.

Kessler R, Faller M, Fourgaut G, Menecier B, and Weitzenblum E (1999). Predictive factors of hospitalization for acute exacerbation in a series of 64 patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 159:158-164.

Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Watabe T, and Miyazono K (2008). Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *J Cell Sci* 121:3317-3324.

Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, and Murohara T (2004). Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24:1442-1447.

Kong D, Melo LG, Mangi AA, Zhang L, Lopez-Illasaca M, Perrella MA, Liew CC, Pratt RE, and Dzau VJ (2004). Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells. *Circulation* 109:1769-1775.

Kotton DN, Ma BY, Cardoso WV, Sanderson EA, Summer RS, Williams MC, and Fine A (2001). Bone marrow-derived cells as progenitors of lung alveolar epithelium. *Development* 128:5181-5188.

Kowanetz M, Valcourt U, Bergstrom R, Heldin CH, and Moustakas A (2004). Id2 and Id3 define the potency of cell proliferation and differentiation responses to transforming growth factor beta and bone morphogenetic protein. *Mol Cell Biol* 24:4241-4254.

Krause DS, Theise ND, Collector MI, Henegariu O, Hwang S, Gardner R, Neutzel S, and Sharkis SJ (2001). Multi-organ, multi-lineage engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell* 105:369-377.

Laufs U, Werner N, Link A, Endres M, Wassmann S, Jurgens K, Miche E, Bohm M, and Nickenig G (2004). Physical training increases endothelial progenitor cells, inhibits neointima formation, and enhances angiogenesis. *Circulation* 109:220-226.

Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, and Thompson EW (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 172:973-981.

Levin ER (1995). Endothelins. *N Engl J Med* 333:356-363.

Liao F, Huynh HK, Eiroa A, Greene T, Polizzi E, and Muller WA (1995). Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. *J Exp Med* 182:1337-1343.

Liebner S, Cattelino A, Gallini R, Rudini N, Iurlaro M, Piccolo S, and Dejana E (2004). Beta-catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse. *J Cell Biol* 166:359-367.

LIEBOW AA (1959). Pulmonary emphysema with special reference to vascular changes. *Am Rev Respir Dis* 80:67-93.

Lipton BH, Bensch KG, and Karasek MA (1992). Histamine-modulated transdifferentiation of dermal microvascular endothelial cells. *Exp Cell Res* 199:279-291.

Markwald RR, Fitzharris TP, and Manasek FJ (1977). Structural development of endocardial cushions. *Am J Anat* 148:85-119.

Markwald RR, Fitzharris TP, and Smith WN (1975). Structural analysis of endocardial cytodifferentiation. *Dev Biol* 42:160-180.

Marsboom G, Pokreisz P, Gheysens O, Vermeersch P, Gillijns H, Pellens M, Liu X, Collen D, and Janssens S (2008). Sustained endothelial progenitor cell dysfunction after chronic hypoxia-induced pulmonary hypertension. *Stem Cells* 26:1017-1026.

Masaki T (2004). Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol Sci* 25:219-224.

Mercado-Pimentel ME, Hubbard AD, and Runyan RB (2007). Endoglin and Alk5 regulate epithelial-mesenchymal transformation during cardiac valve formation. *Dev Biol* 304:420-432.

Moncada S and Higgs A (1993). The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 329:2002-2012.

Morita T, Mayanagi T, and Sobue K (2007). Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling. *J Cell Biol* 179:1027-1042.

Moustakas A and Heldin CH (2007). Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression. *Cancer Sci* 98:1512-1520.

Murayama T, Tepper OM, Silver M, Ma H, Losordo DW, Isner JM, Asahara T, and Kalka C (2002). Determination of bone marrow-derived endothelial progenitor cell significance in angiogenic growth factor-induced neovascularization in vivo. *Exp Hematol* 30:967-972.

Nelson WJ and Nusse R (2004). Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 303:1483-1487.

nh-Xuan AT, Higenbottam TW, Clelland CA, Pepke-Zaba J, Cremona G, Butt AY, Large SR, Wells FC, and Wallwork J (1991). Impairment of endothelium-dependent pulmonary-artery relaxation in chronic obstructive lung disease. *N Engl J Med* 324:1539-1547.

Nieto MA, Sargent MG, Wilkinson DG, and Cooke J (1994). Control of cell behavior during vertebrate development by Slug, a zinc finger gene. *Science* 264:835-839.

Nishimura G, Manabe I, Tsushima K, Fujiu K, Oishi Y, Imai Y, Maemura K, Miyagishi M, Higashi Y, Kondoh H, and Nagai R (2006). DeltaEF1 mediates TGF-beta signaling in vascular smooth muscle cell differentiation. *Dev Cell* 11:93-104.

Ohkubo T and Ozawa M (2004). The transcription factor Snail downregulates the tight junction components independently of E-cadherin downregulation. *J Cell Sci* 117:1675-1685.

Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, Jakoniuk I, Anderson SM, Li B, Pickel J, McKay R, Nadal-Ginard B, Bodine DM, Leri A, and Anversa P (2001). Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 410:701-705.

Palange P, Testa U, Huertas A, Calabro L, Antonucci R, Petrucci E, Pelosi E, Pasquini L, Satta A, Morici G, Vignola MA, and Bonsignore MR (2006). Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells are decreased in COPD. *Eur Respir J* 27:529-541.

Park SM, Jung JS, Jang MS, Kang KS, and Kang SK (2008). Transforming growth factor-beta1 regulates the fate of cultured spinal cord-derived neural progenitor cells. *Cell Prolif* 41:248-264.

Pauwels RA, Buist AS, Calverley PM, Jenkins CR, and Hurd SS (2001). Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. NHLBI/WHO Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease (GOLD) Workshop summary. *Am J Respir Crit Care Med* 163:1256-1276.

Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, and Rafii S (2000). Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood* 95:952-958.

Peinado H, Olmeda D, and Cano A (2007). Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer* 7:415-428.

Peinado H, Quintanilla M, and Cano A (2003). Transforming growth factor beta-1 induces snail transcription factor in epithelial cell lines: mechanisms for epithelial mesenchymal transitions. *J Biol Chem* 278:21113-21123.

Peinado VI, Barbera JA, Abate P, Ramirez J, Roca J, Santos S, and Rodriguez-Roisin R (1999). Inflammatory reaction in pulmonary muscular arteries of patients with mild chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 159:1605-1611.

Peinado VI, Barbera JA, Ramirez J, Gomez FP, Roca J, Jover L, Gimferrer JM, and Rodriguez-Roisin R (1998). Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild COPD. *Am J Physiol* 274:L908-L913.

Peinado VI, Ramirez J, Roca J, Rodriguez-Roisin R, and Barbera JA (2006). Identification of vascular progenitor cells in pulmonary arteries of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34:257-263.

Piek E, Heldin CH, and ten DP (1999). Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J* 13:2105-2124.



Pillariseti K and Gupta SK (2001). Cloning and relative expression analysis of rat stromal cell derived factor-1 (SDF-1): SDF-1 alpha mRNA is selectively induced in rat model of myocardial infarction. *Inflammation* 25:293-300.

Poulsom R, Forbes SJ, Hodivala-Dilke K, Ryan E, Wyles S, Navaratnasah S, Jeffery R, Hunt T, Alison M, Cook T, Pusey C, and Wright NA (2001). Bone marrow contributes to renal parenchymal turnover and regeneration. *J Pathol* 195:229-235.

Quirici N, Soligo D, Caneva L, Servida F, Bossolasco P, and Delilieri GL (2001). Differentiation and expansion of endothelial cells from human bone marrow CD133(+) cells. *Br J Haematol* 115:186-194.

Raoul W, Wagner-Ballon O, Saber G, Hulin A, Marcos E, Giraudier S, Vainchenker W, Adnot S, Eddahibi S, and Maitre B (2007). Effects of bone marrow-derived cells on monocrotaline- and hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. *Respir Res* 8:8.

Reyes M, Dudek A, Jahagirdar B, Koodie L, Marker PH, and Verfaillie CM (2002). Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow. *J Clin Invest* 109:337-346.

Rodriguez-Pascual F, Reimunde FM, Redondo-Horcajo M, and Lamas S (2004). Transforming growth factor-beta induces endothelin-1 expression through activation of the Smad signaling pathway. *J Cardiovasc Pharmacol* 44 Suppl 1:S39-S42.

Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, and Brigham KL (2005). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33:145-152.

Romero LI, Zhang DN, Herron GS, and Karasek MA (1997). Interleukin-1 induces major phenotypic changes in human skin microvascular endothelial cells. *J Cell Physiol* 173:84-92.

Rosano L, Spinella F, Di C, V, Dedhar S, Nicotra MR, Natali PG, and Bagnato A (2006). Integrin-linked kinase functions as a downstream mediator of endothelin-1 to promote invasive behavior in ovarian carcinoma. *Mol Cancer Ther* 5:833-842.

Rosano L, Spinella F, Di C, V, Nicotra MR, Dedhar S, de Herreros AG, Natali PG, and Bagnato A (2005). Endothelin-1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in human ovarian cancer cells. *Cancer Res* 65:11649-11657.

Ross R (1999). Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 340:115-126.

Saiura A, Sata M, Hirata Y, Nagai R, and Makuuchi M (2001). Circulating smooth muscle progenitor cells contribute to atherosclerosis. *Nat Med* 7:382-383.

Santos S, Peinado VI, Ramirez J, Melgosa T, Roca J, Rodriguez-Roisin R, and Barbera JA (2002). Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD. *Eur Respir J* 19:632-638.

Sata M (2003). Circulating vascular progenitor cells contribute to vascular repair, remodeling, and lesion formation. *Trends Cardiovasc Med* 13:249-253.

Sata M, Saiura A, Kunisato A, Tojo A, Okada S, Tokuhisa T, Hirai H, Makuuchi M, Hirata Y, and Nagai R (2002). Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis. *Nat Med* 8:403-409.

Scadden DT (2006). The stem-cell niche as an entity of action. *Nature* 441:1075-1079.

Shi Q, Rafii S, Wu MH, Wijelath ES, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Storb RF, and Hammond WP (1998). Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 92:362-367.

Shintani S, Murohara T, Ikeda H, Ueno T, Honma T, Katoh A, Sasaki K, Shimada T, Oike Y, and Imaizumi T (2001). Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation* 103:2776-2779.

Simonneau G, Robbins IM, Beghetti M, Channick RN, Delcroix M, Denton CP, Elliott CG, Gaine SP, Gladwin MT, Jing ZC, Krowka MJ, Langleben D, Nakanishi N, and Souza R (2009). Updated clinical classification of pulmonary hypertension. *J Am Coll Cardiol* 54:S43-S54.

Spaderna S, Schmalhofer O, Wahlbuhl M, Dimmler A, Bauer K, Sultan A, Hlubek F, Jung A, Strand D, Eger A, Kirchner T, Behrens J, and Brabletz T (2008). The transcriptional repressor ZEB1 promotes metastasis and loss of cell polarity in cancer. *Cancer Res* 68:537-544.

Takahashi M, Nakamura T, Toba T, Kajiwara N, Kato H, and Shimizu Y (2004). Transplantation of endothelial progenitor cells into the lung to alleviate pulmonary hypertension in dogs. *Tissue Eng* 10:771-779.

Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, and Asahara T (1999). Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med* 5:434-438.

Takamiya M, Okigaki M, Jin D, Takai S, Nozawa Y, Adachi Y, Urao N, Tateishi K, Nomura T, Zen K, Ashihara E, Miyazaki M, Tatsumi T, Takahashi T, and Matsubara H (2006). Granulocyte colony-stimulating factor-mobilized circulating c-Kit<sup>+</sup>/Flk-1<sup>+</sup> progenitor cells regenerate endothelium and inhibit neointimal hyperplasia after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:751-757.

Tanaka K, Sata M, Natori T, Kim-Kaneyama JR, Nose K, Shibamura M, Hirata Y, and Nagai R (2008). Circulating progenitor cells contribute to neointimal formation in nonirradiated chimeric mice. *FASEB J* 22:428-436.

ten DP and Arthur HM (2007). Extracellular control of TGFbeta signalling in vascular development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:857-869.

Terada N, Hamazaki T, Oka M, Hoki M, Mastalerz DM, Nakano Y, Meyer EM, Morel L, Petersen BE, and Scott EW (2002). Bone marrow cells adopt the phenotype of other cells by spontaneous cell fusion. *Nature* 416:542-545.

Timmerman LA, Grego-Bessa J, Raya A, Bertran E, Perez-Pomares JM, Diez J, Aranda S, Palomo S, McCormick F, Izpisua-Belmonte JC, and de la Pompa JL (2004). Notch

promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation. *Genes Dev* 18:99-115.

Tojo M, Hamashima Y, Hanyu A, Kajimoto T, Saitoh M, Miyazono K, Node M, and Imamura T (2005). The ALK-5 inhibitor A-83-01 inhibits Smad signaling and epithelial-to-mesenchymal transition by transforming growth factor-beta. *Cancer Sci* 96:791-800.

Toshner M, Voswinckel R, Southwood M, Al-Lamki R, Howard LS, Marchesan D, Yang J, Suntharalingam J, Soon E, Exley A, Stewart S, Hecker M, Zhu Z, Gehling U, Seeger W, Pepke-Zaba J, and Morrell NW (2009). Evidence of dysfunction of endothelial progenitors in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 180:780-787.

Tuder RM, Marecki JC, Richter A, Fijalkowska I, and Flores S (2007). Pathology of pulmonary hypertension. *Clin Chest Med* 28:23-42, vii.

Urbich C and Dimmeler S (2004). Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 95:343-353.

Vajkoczy P, Blum S, Lamparter M, Mailhammer R, Erber R, Engelhardt B, Vestweber D, and Hatzopoulos AK (2003). Multistep nature of microvascular recruitment of ex vivo-expanded embryonic endothelial progenitor cells during tumor angiogenesis. *J Exp Med* 197:1755-1765.

Valcourt U, Kowanetz M, Niimi H, Heldin CH, and Moustakas A (2005). TGF-beta and the Smad signaling pathway support transcriptomic reprogramming during epithelial-mesenchymal cell transition. *Mol Biol Cell* 16:1987-2002.

Vandewalle C, Comijn J, De CB, Vermassen P, Bruyneel E, Andersen H, Tulchinsky E, van RF, and Berx G (2005). SIP1/ZEB2 induces EMT by repressing genes of different epithelial cell-cell junctions. *Nucleic Acids Res* 33:6566-6578.

Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, and Dimmeler S (2001). Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89:E1-E7.

Voelkel N and Taraseviciene-Stewart L (2005). Emphysema: an autoimmune vascular disease? *Proc Am Thorac Soc* 2:23-25.

Walter DH, Rittig K, Bahlmann FH, Kirchmair R, Silver M, Murayama T, Nishimura H, Losordo DW, Asahara T, and Isner JM (2002). Statin therapy accelerates reendothelialization: a novel effect involving mobilization and incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Circulation* 105:3017-3024.

Wang XX, Zhang FR, Shang YP, Zhu JH, Xie XD, Tao QM, Zhu JH, and Chen JZ (2007). Transplantation of autologous endothelial progenitor cells may be beneficial in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension: a pilot randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol* 49:1566-1571.



Ward MR, Stewart DJ, and Kutryk MJ (2007). Endothelial progenitor cell therapy for the treatment of coronary disease, acute MI, and pulmonary arterial hypertension: current perspectives. *Catheter Cardiovasc Interv* 70:983-998.

Weitzenblum E, Hirth C, Ducolone A, Mirhom R, Rasaholinjanahary J, and Ehrhart M (1981). Prognostic value of pulmonary artery pressure in chronic obstructive pulmonary disease. *Thorax* 36:752-758.

Weitzenblum E, Sautegeau A, Ehrhart M, Mammosser M, and Pelletier A (1985). Long-term oxygen therapy can reverse the progression of pulmonary hypertension in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am Rev Respir Dis* 131:493-498.

Wilkinson M, Langhorne CA, Heath D, Barer GR, and Howard P (1988b). A pathophysiological study of 10 cases of hypoxic cor pulmonale. *Q J Med* 66:65-85.

Wilkinson M, Langhorne CA, Heath D, Barer GR, and Howard P (1988a). A pathophysiological study of 10 cases of hypoxic cor pulmonale. *Q J Med* 66:65-85.

Willis BC and Borok Z (2007). TGF-beta-induced EMT: mechanisms and implications for fibrotic lung disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293:L525-L534.

Willis BC, Liebler JM, Luby-Phelps K, Nicholson AG, Crandall ED, du Bois RM, and Borok Z (2005). Induction of epithelial-mesenchymal transition in alveolar epithelial cells by transforming growth factor-beta1: potential role in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Pathol* 166:1321-1332.

Wright JL, Petty T, and Thurlbeck WM (1992). Analysis of the structure of the muscular pulmonary arteries in patients with pulmonary hypertension and COPD: National Institutes of Health nocturnal oxygen therapy trial. *Lung* 170:109-124.

Xu J, Lamouille S, and Derynck R (2009). TGF-beta-induced epithelial to mesenchymal transition. *Cell Res* 19:156-172.

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, meida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, and Buck DW (1997). AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 90:5002-5012.

Zavadil J, Cermak L, Soto-Nieves N, and Bottinger EP (2004). Integration of TGF-beta/Smad and Jagged1/Notch signalling in epithelial-to-mesenchymal transition. *EMBO J* 23:1155-1165.

Zeiber AM, Schachinger V, and Minners J (1995). Long-term cigarette smoking impairs endothelium-dependent coronary arterial vasodilator function. *Circulation* 92:1094-1100.

Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, and Kalluri R (2007a). Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 67:10123-10128.

Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, and

Kalluri R (2007b). Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 13:952-961.

Zhao YD, Courtman DW, Deng Y, Kugathasan L, Zhang Q, and Stewart DJ (2005). Rescue of monocrotaline-induced pulmonary arterial hypertension using bone marrow-derived endothelial-like progenitor cells: efficacy of combined cell and eNOS gene therapy in established disease. *Circ Res* 96:442-450.

Zhu C, Ying D, Zhou D, Mi J, Zhang W, Chang Q, and Li L (2005). Expression of TGF-beta1 in smooth muscle cells regulates endothelial progenitor cells migration and differentiation. *J Surg Res* 125:151-156.

Zhu JH, Wang XX, Zhang FR, Shang YP, Tao QM, Zhu JH, and Chen JZ (2008). Safety and efficacy of autologous endothelial progenitor cells transplantation in children with idiopathic pulmonary arterial hypertension: open-label pilot study. *Pediatr Transplant* 12:650-655.

Zhu P, Huang L, Ge X, Yan F, Wu R, and Ao Q (2006). Transdifferentiation of pulmonary arteriolar endothelial cells into smooth muscle-like cells regulated by myocardin involved in hypoxia-induced pulmonary vascular remodelling. *Int J Exp Pathol* 87:463-474.

Zohlhofer D, Klein CA, Richter T, Brandl R, Murr A, Nuhrenberg T, Schomig A, Baeuerle PA, and Neumann FJ (2001). Gene expression profiling of human stent-induced neointima by cDNA array analysis of microscopic specimens retrieved by helix cutter atherectomy: Detection of FK506-binding protein 12 upregulation. *Circulation* 103:1396-1402.

# *Agraiments*

Aquest camí m'ha donat la oportunitat d'aprendre, créixer, compartir, estimar.....VIURE. Ha sigut així gràcies a vosaltres, els meus companys de viatge, les persones que m'heu acompanyat donant-me la força necessària per tirar endavant dia rere dia. Mai deixaré d'aprendre de vosaltres. I sempre em sentiré immensament afortunada i agraïda. De tot cor i a tots vosaltres....GRÀCIES.

Gracias a ti, Víctor, por ser mi jefe y mi amigo. Gracias por todo tu esfuerzo y dedicación. Me has enseñado millones de cosas, pero sobretodo a ser un poco más paciente (aunque parezca imposible!), a tener mi propia opinión, a esforzarme y a intentar mejorar cada día. Siempre valoraré que nos escucharas y nos apoyaras en todo momento. Por todo, muchas gracias capitán.

Gràcies Joan Albert, per transmetre'm valors tan importants a l'hora de créixer com la responsabilitat, l'esforç i el respecte. Per mi, ets un referent. Gràcies per la teva confiança i el teu suport durant tots aquests anys.

Als meus companys i especialment a l'Elisabet. Aquest camí l'hem viscut juntes i estic convençuda de que no podria haver tingut millor sort. Si encara ara necessito tenir-te al davant durant les meves presentacions..què faré sense tu! Mai arribaràs a saber com m'ha ajudat el teu optimisme, els teus consells o les teves abraçades. Gràcies per estar sempre disposada a ajudar i escoltar. Et trobaré moltíssim a faltar..i, no sé com, però no em penso perdre la teva tesi!...No ploris!. A Melina, por enseñarme a “querer” la ciencia, por tu sinceridad en los momentos complicados, por tus críticas constructivas. Gracias a ti hoy me siento más segura y más fuerte. Y a Marla, que con sólo 6 meses también ha cambiado cosas en mí! A en David, que darrera del micro amaga un sentit del humor increïblement bo i pervers. A en Borja, la Jéssica i la Nuria per l'aire fresc, el bon rotllo i l'energia positiva. Ho fareu genial, no en tinc cap dubte..Ànims! A aquells companys, que ja no hi són, però que han viscut en primera persona totes les penúries i les alegries d'aquesta tesi. No oblidaré les enriquidores converses d'en Ricard, l'amabilitat de la Laia, la proximitat d'en César, l'alegria de la Vives i la fresca espontaneïtat de la Rake.

A tota la gent de Pneumo, que no és poca! A la Sandra, la teva gratitud junt amb la teva humilitat fa que sigui obligatori estimar-te. A en Juli, Diego, Yolanda, Elena, Isabel, Hernan, Philip, etc.. sou tants! no crec que em torni a creuar amb gent tan “humana”.

Als nostres veïns del 502 i 503, pel vostre gran companyerisme. La Sonia i l'Anna pels inicis (sempre difícils). Al Dr. Ramon Bataller per fer-me riure sempre, i a tots els del seu grup per dir-me sempre que "sí" cada cop que us demano algo...sou un sol. A les "noves generacions" de la planta per crear nous vincles i tan bon ambient. A l'Anita, Pedrin, Javi...semblava impossible que arribés aquest dia. A la Pepa de cultius, sort de tu! A la Marce, que siempre tiene respuestas. A en Jordi Alcaraz, per animar-me amb els meus plans i estar sempre disposat a col·laborar. A la Isa del citòmetre per tenir un somriure preparat faci sol o núvol i a les noies del confocal per atrevir-se a inventar constantment.

Als "incombustibles", perquè no tinc cap dubte que és una de les millors coses que he aconseguit en aquests últims anys. A tu Isa per contagiar-nos les teves ganes de viure sempre intensament, per ser així d'impulsiva i autèntica. La teva alegria ha estat una llum al camí. A en Marc, per mi tot un savi. Sempre admiraré la teva pau interior o la teva manera de veure la part positiva de tot. Gràcies a persones com tu entenc la famosa frase de "l'home més ric és aquell que té els plaers més barats". Per fi les nostres "birretes" no hauran d'esperar! Nachete...només ens faltaves tu perquè les nostres quedades es tornessin encara més perilloses! Felix "Der Mann ohne Zukunft" war großartig, so viele Momente mit euch teilen. I a tu Joan, com et trobo a faltar..ni t'ho imagines. Ja saps com ets d'especial per mi. Gràcies per estar sempre tan a prop meu.

I no penseu que m'he oblidat dels "biotec", amb vosaltres va començar tot: Dani, Kino, J, Armi, Javo, Laia, Joana, Nina, Aida, Anna, Isa, Gabri i Marga. I tot i que a vegades la vida ens porti per diferents camins, el carinyo que ens uneix mai deixarà que ens perdem la pista. Tornaria enrere una vegada i una altra. A la Cris i en Roger per ser com són. I a la resta de "penya biokit" (mai vaig imaginar treure tant de profit d'unes pràctiques en empresa!). A la meva petita família de kike's, a la Marga i l'Edu per fer de casa nostre una llar tan acollidora.

A les meves grans amigues, un dels pilars de la meva vida. A tu Gabri, per saber escoltar, per saber callar, per fer-te càrrec de les meves preocupacions, per la teva generositat, per comprendre'm i per ser-hi físicament i anímicament en el moment oportú. Tots aquests actes et fan simplement genial. A la Queralt, per ser la mà que acarona. Tu m'has ensenyat que amb les carícies i la tendresa ens podem retrobar i expressar allò que les paraules no arriben a copsar. A la Lúcia, per ensenyar-me el que

és essencial. Perquè la teva força interior sempre ens ha servit de guia. I la teva bondat i humilitat, autèntica i sincera, com mou des de la senzillesa. A la Marta, per ser la meva còmplice i la trucada en la qual unes quantes paraules es converteixen en un fonament. A totes us estimo amb bogeria.

Al meu germà, en Xavier. No t'ho dic sovint, però cada dia em sento orgullosa de tu. Ets la persona més lleial que conec i m'has ensenyat que per estimar és important respectar les fronteres que ens separen i que també ens uneixen. Per manifestar-te en les petites coses, en els gestos gens aparatosos, però d'un valor incalculable per mi. I a la Cris, la meva cunyada, per ser una més de la família i contagiar-nos la seva alegria i entusiasme. A tota la família Diez, tiets i cosins. Per mantenir-nos units i estimar-nos tantíssim. Gràcies pel vostre suport incondicional. Als Cuñado per formar part de mi i ensenyar-me que la gràcia està en que tots som diferents. A la yaya, la única abuela que me gana corriendo! Gracias por transmitirme tanta vitalidad. Te echo de menos.

A en David, per estimar-me per sobre de tot. Gràcies per estar avui aquí i per creure que “qui té perquè viure sempre trobarà com fer-ho”. Com diu la cançó, només ens cal “un poc de sort i que la vida ens doni un camí ben llarg...”

A la família Lucia, per rebre'm sempre com una més i especialment a tu Imma pels teus consells de dona a dona. A en Marc i a en Dani per ser els meus amics.

I per últim als meus pares, en Xavier i l'Estrella. No tinc paraules per agrair-vos el vostre esforç, la vostra ajuda i tot l'amor que em doneu. A tu papa, gràcies per crear la felicitat estimant, cuidant, compartint o brindant alegria i optimisme als qui t'envolten. Per acompanyar tots els bons moments amb una frase que mai oblidaré: “soc feliç perquè la vostra felicitat és la meva felicitat”. Per ensenyar-me que per viure també és necessari el sentit de l'humor i creure en mi mateixa. A tu mama, per permetre'm caure però obligar-me a aixecar i tornar a intentar-ho. Per ser forta, fer-me creure que si vull, puc i que la resignació no és un camí. Per donar-nos llibertat i confiar sempre en el nostre propi criteri. Esperar-nos amb els braços oberts quan ja saps que ens equivocarem. Per fer de casa nostra el millor lloc del món. Us estimo moltíssim.

A tots, gràcies per acompanyar-me en aquest camí que tot just torna a començar...

Marta