

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR



**Análisis de los mecanismos
centrales de regulación de los
progenitores cardíacos $Bmi1^+$
en ratón adulto**

TESIS DOCTORAL

Guillermo Albericio Bonilla

Madrid, 2021



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR**

Análisis de los mecanismos centrales de regulación de los progenitores cardíacos $Bmi1^+$ en ratón adulto

Guillermo Albericio Bonilla

Graduado en Biotecnología

Director:

Dr. Antonio Bernad
Miana

Co-directora:

Dra. Carmen Mora
Gallardo

Tutora:

Dra. Eva Porlan
Alonso

CENTRO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA – CSIC

MADRID, 2021

El trabajo que se presenta en esta memoria ha sido realizado en el Departamento de Inmunología y Oncología del Centro Nacional de Biotecnología bajo la dirección del Dr. Antonio Bernad Miana y de la Dra. Carmen Mora Gallardo.

Guillermo Albericio Bonilla ha sido beneficiario de una beca FPI (FPI BES-2016-076312) concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación dentro del proyecto SAF2015-70882-R.

*Gracias a mi familia y a mis amigos,
porque así todo es más bonito.*

**“Razona que el presente es indefinido,
que el futuro no tiene realidad
sino como esperanza del presente,
que el pasado no tiene realidad
sino como recuerdo del presente.”**

Jorge Luis Borges

ÍNDICE

RESUMEN14
ABREVIATURAS20
INTRODUCCIÓN24
1. El corazón24
1.1 Centro del sistema circulatorio24
1.2 Estructura y funcionamiento del corazón25
1.3 Tipos celulares que componen el corazón26
2. Regeneración celular en el corazón28
2.1 Capacidad de renovación celular en el corazón28
2.2 Capacidad de regeneración cardíaca frente a daño29
2.3 Orígenes de la renovación celular en el corazón31
2.3.1. Des-diferenciación, plasticidad y competición celular31
2.3.2. Células Progenitoras Cardíacas32
3. Progenitores cardíacos <i>Bmi1</i>⁺34
3.1. Papel del complejo Policomb y <i>Bmi1</i>34
3.2. Células progenitoras cardíacas <i>Bmi1</i> ⁺35
3.2.1. <i>Bmi1</i> -CPC en el contexto de homeostasis cardíaca36
3.2.2. <i>Bmi1</i> -CPC en el contexto de daño cardíaco37
3.2.3. <i>Bmi1</i> -CPC y su relación con el endotelio cardíaco37
4. El nicho, esencial para la función de las células madre38
4.1. Concepto de nicho en células madre38
4.2. Mecanismos implicados en la relación entre progenitores adultos y su nicho vascular39
OBJETIVOS44
MÉTODOS48
1. Modelos animales48
1.1. Descripción de los modelos animales48
1.2. Procedimientos <i>in-vivo</i> aplicados49
2. Extracción de células primarias50
2.1. Progenitores cardíacos <i>Bmi1</i> ⁺ (<i>Bmi1</i> -CPC)50
2.2. Células Endoteliales Cardíacas52

3. Cultivo líneas celulares53
3.1. Bmi1-CPC53
3.2. pCEC54
3.3. 1g1154
3.4. MEFs54
3.5. HL-155
4. Generación de una línea celular inmortalizada y reversible de progenitores cardíacos Bmi1⁺55
4.1. Inmortalización: Transducción de las Bmi1-CPC con vector lentiviral LoxP- SV40 T-Large – TK- LoxP55
4.2. Des-inmortalización: Infección de las Bmi1-CPC ^{Inm} con vector adenoviral Cre y selección mediante Ganciclovir56
4.3. Monitorización del estado del inserto con PCR57
4.4. Evaluación de mejoras en las condiciones de cultivo57
4.4.1. Optimización del medio de cultivo para Bmi1-CPC-YFP ^{Inm-Rev}57
4.4.2. Inhibidores de rutas de senescencia implicadas en fenotipo secretor asociado a senescencia59
5. Análisis de la expresión de marcadores de membrana mediante citometría de flujo59
6. Evaluación del estado proliferativo60
6.1. Evaluación de la progresión de la tasa de duplicación poblacional de las líneas celulares inmortalizadas60
6.2. Evaluación del estado proliferativo celular mediante incorporación de EdU60
7. Análisis de la senescencia celular mediante marcaje por β-galactosidasa61
8. Ensayos de respuesta frente a proteínas recombinantes61
9. Identificación de factores de angiogénesis en el medio condicionado de las Bmi1-CPC61
10. Ensayos de migración en <i>transwell</i>62
11. Ensayos de angiogénesis en <i>Matrigel</i>62
12. Co-cultivos Directos63
12.1. Análisis de los efectos del co-cultivo sobre la expresión génica.63
12.2. Cuantificación de la muerte celular inducida por daño63

	oxidativo con Paraquat	
13.	Extracción de RNA total y reacción de PCR-transcriptasa reversa y RT-qPCR64
14.	Western Blot65
15.	Análisis estadístico65
	RESULTADOS68
	CAPÍTULO 1	
	Generación de una línea inmortalizada de forma reversible a partir de las células Bmi1-CPC	
1.1	La transducción con vectores lentivirales T-SV40/ TK permite la inmortalización de la población Bmi1-CPC68
1.2	La transducción con vectores adenovirales Cre permite revertir la inmortalización de las células Bmi1-CPC-YFP ^{Inm}73
1.3	La des-inmortalización de las células Bmi1-CPC-YFP ^{Inm} induce un bloqueo proliferativo y promueve la entrada en senescencia76
1.4	Optimización de las condiciones de cultivo empleadas para el mantenimiento de la línea Bmi1-CPC-YFP ^{Inm-Rev}77
1.4.1	Los medios de cultivo alternativos testados para las Bmi1-CPC-YFP ^{Inm} no mejoraron su capacidad proliferativa78
1.4.2	La aplicación de inhibidores de rutas de señalización potencialmente implicadas en el SASP no redujo significativamente la entrada en senescencia de las células Bmi1-CPC-YFP ^{Inm-Rev}79
	CAPÍTULO 2	
	Validación de las características propias de la línea inmortalizada Bmi1-CPC-YFP^{Inm}	
2.1	La línea celular Bmi1-CPC-YFP ^{Inm} mantiene las características que definen a la población Bmi1-CPC82
2.2	La línea celular Bmi1-CPC-YFP ^{Inm} presenta un porcentaje de alteraciones cromosómicas83
2.3	La línea celular Bmi1-CPC-YFP ^{Inm} reproduce la respuesta frente a estímulos definidos para la población Bmi1-CPC84
2.4	Las células Bmi1-CPC y Bmi1-CPC-YFP ^{Inm} presentan una respuesta similar frente a daño oxidativo severo85
	CAPÍTULO 3	
	Aplicación del modelo Bmi1-CPC-YFP^{Inm} para definir los mecanismos moleculares implicados en la relación entre Bmi1-CPC y su nicho endotelial	
3.1	En condiciones de homeostasis el secretoma de las Bmi1-CPC-Tomato y Bmi1-CPC-YFP ^{Inm} presenta una88

	composición similar rica en factores de angiogénesis	
3.2	En condiciones de daño oxidativo severo el secretoma de las Bmi1-CPC-Tomato y Bmi1-CPC-YFP ^{Inm} presenta ciertas alteraciones90
3.3	Los factores secretados por las Bmi1-CPC favorecen la migración endotelial92
3.4	Los factores secretados por las Bmi1-CPC favorecen la angiogénesis en condiciones de homeostasis94
3.5	El co-cultivo con células endoteliales favorece la supervivencia de las células Bmi1-CPC-YFP ^{Inm} frente a daño oxidativo inducido por Paraquat96
3.6	El contacto directo con células endoteliales activa la ruta de Notch en las células Bmi1-CPC101
3.7	El contacto directo con células endoteliales afectaría a la actividad metabólica en las células Bmi1-CPC104

DISCUSIÓN

	Inmortalización efectiva de la línea Bmi1-CPC-YFP y limitaciones asociadas a la pérdida de un alelo de Bmi1 en el modelo Bmi1-CPC-GFP108
	La des-inmortalización de la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm} mediante inducción transitoria de la recombinasa Cre no es viable109
	La pérdida de T-SV40 tras la des-inmortalización provoca una bajada repentina en la proliferación y la entrada en senescencia109
	Los efectos adversos en la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm} asociados al proceso de des-inmortalización no pudieron ser revertidos eficazmente.110
	La línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm} puede ser empleada como un modelo para el estudio de la población Bmi1-CPC111
	La línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm} mantiene las principales características de la población Bmi1-CPC111
	La línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm} presenta una capacidad de respuesta a daño oxidativo similar a la población Bmi1-CPC112
	Identificación de los mecanismos implicados en la relación de tipo <i>cross-talk</i> entre las células Bmi1-CPC y su nicho vascular113
	El secretoma de las células Bmi1-CPC contiene factores relacionados con la angiogénesis y se ve afectado por la inducción de daño oxidativo severo114
	Las células Bmi1-CPC inducen la migración endotelial y la angiogénesis mediante señales paracrinas116

Índice

Las células endoteliales protegen a las Bmi1-CPC frente al daño oxidativo118
Las células endoteliales modulan el comportamiento de las Bmi1-CPC mediante contacto directo119
Mecanismos conservados están implicados en el nicho de las Bmi1-CPC121
Observaciones globales122
CONCLUSIONES126
BIBLIOGRAFÍA130
AGRADECIMIENTOS148
ANEXOS152

RESUMEN

El corazón, a diferencia de la mayoría de órganos, no presenta una única población aceptada de células progenitoras adultas. Existe cierta controversia en el campo de las células progenitoras cardíacas, ya que varios autores han definido poblaciones con capacidades progenitoras que presentan características diferenciales. Nuestro grupo ha identificado una población de progenitores cardíacos adultos caracterizada por la expresión de niveles altos de *Bmi1* (Bmi1-CPC). Esta población contribuye al recambio de los principales linajes celulares cardíacos en homeostasis, incrementando su aportación tras daño oxidativo. De hecho, la población Bmi1-CPC es esencial en la regeneración/reparación cardíaca tras infarto agudo de miocardio (IAM), desempeñando un papel fundamental en el proceso de revascularización. Se ha establecido que las células Bmi1-CPC residen preferentemente en regiones perivasculares, postulándose una relación de tipo nicho entre ellas y el endotelio cardíaco.

Hasta la fecha, el estudio de la población Bmi1-CPC se ha centrado en el análisis de modelos *in-vivo* y cultivos primarios derivados de ellos. Sin embargo, el trabajo con estos modelos supone importantes limitaciones experimentales. Por esta razón, hemos desarrollado un modelo *in-vitro* inmortalizado derivado de las células Bmi1-CPC que nos permitiera profundizar en el estudio de esta población. Basamos la estrategia de inmortalización en la inducción de la expresión estable del gen del *antígeno grande del poliomavirus S40 de simios* (T-SV40). Este modelo, denominado Bmi1-CPC-YFP^{inm}, mantiene las características definitorias de la población Bmi1-CPC y ha resultado una herramienta eficaz para el estudio de la relación entre estas células y el endotelio cardíaco.

Utilizando este modelo *in-vitro* hemos podido definir que el secretoma de las Bmi1-CPC contiene factores que están directamente implicados en la regulación del endotelio. Mediante los factores secretados al espacio extracelular, las Bmi1-CPC inducen la migración de las células endoteliales en su proximidad. Este efecto se hace más intenso en condiciones de daño oxidativo y está directamente regulado por la quimioquina CXCL12. Además, hemos demostrado que la población Bmi1-CPC tiene capacidad de inducir angiogénesis en condiciones de homeostasis, efecto que se reprime en condiciones de daño oxidativo. De forma adicional, hemos constatado que las células endoteliales influyen sobre las células Bmi1-CPC, generando sobre ellas un efecto protector frente a daño oxidativo. El contacto directo entre ambos tipos celulares reduce, a su vez, la proliferación y los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares en las células Bmi1-CPC. Postulamos que estos efectos podrían deberse a una activación de la ruta de *Notch*, implicada en la regulación de la proliferación celular, y a modificaciones del flujo autofágico y la actividad metabólica, mecanismos directamente implicados en la producción de ROS.

Los datos obtenidos permiten proponer una relación de tipo *cross-talk* entre las Bmi1-CPC y la vasculatura cardíaca. Estos resultados definirían un mecanismo presente en progenitores residentes en otros órganos para una población de progenitores responsables del mantenimiento y regeneración del tejido cardíaco. Hasta la fecha no hay constancia de la descripción de un mecanismo similar dentro del corazón, lo que podría suponer una aportación relevante dentro del estudio de las poblaciones de progenitores cardíacos adultos.

The heart, unlike other organs, does not show a unique adult progenitor cell population. Some questions still remain open in the study of cardiac progenitor cells, as several authors have defined different cardiac cell populations with progenitor abilities and distinguishing features. Our research group has identified an adult cardiac progenitor population defined for high levels of Bmi1 expression (Bmi1-CPC). In homeostasis, this population participates in the turn-over of the main cardiac cell lineages, increasing its contribution under oxidative damage conditions. In fact, the Bmi1-CPC population is essential in cardiac regeneration/repair after acute myocardial infarct (AMI), playing a capital role in the revascularization process. Previous studies showed that Bmi1-CPC are preferentially located in the perivascular regions, allowing to propose a niche-type relationship between Bmi1-CPC and the cardiac endothelium.

So far, the study of the Bmi1-CPC population has been focused in the analysis of *in-vivo* models and primary cultures derived from them. However, the work with these models is associated to important experimental limitations. Trying to go further in the study of Bmi1-CPC, we developed an immortalized *in-vitro* model derived from this population. We proposed an immortalization strategy based on the transgenic expression of the *large antigen of the polyoma Simian Virus S40* (T-SV40). This model, referred as Bmi1-CPC-YFP^{Inm}, maintains the main features of Bmi1-CPC population and has been proven as a useful tool for the study of the relationship between these cells and the cardiac endothelium.

Using the Bmi1-CPC-YFP^{Inm}, we have been able to define that the Bmi1-CPC secretome includes several factors related to endothelial regulation. By secreting different factors to the extracellular compartment, the Bmi1-CPC are able to induce the endothelial migration close to their proximity. This effect is stronger under oxidative damage conditions and directly induced by chemokine CXCL12. Besides, we confirmed that Bmi1-CPC secretome can induce angiogenesis in homeostatic conditions; effect that is hampered after oxidative damage induction. Additionally, we observed that endothelial cells also affect Bmi1-CPC inducing a protective effect after oxidative damage induction. Direct contact between both cells also reduces proliferation and intracellular ROS levels in the Bmi1-CPC. We proposed that these effects depend on Notch signaling pathway, involved in cell proliferation, and on modifications of the autophagic flux and metabolic activity; directly involved in ROS production.

Our data allow us to propose a cross-talk relationship between Bmi1-CPC and cardiac vasculature. These results would define a mechanism which has been previously identified in other organs for a progenitor population involved in cardiac turn-over and regeneration. So far, it has not been proposed such mechanism in the heart; this would mean a relevant contribution to the definition of adult cardiac progenitor populations and their regulation.

ABREVIATURAS

Abreviaturas

Abcg2: ATP Binding Cassette Subfamily G Member 2	EGF: Factor de Crecimiento Endotelial
Atg5: Autophagy Related 5	EphB4: EPH Receptor B4
Atg7: Autophagy Related 7	FACS: Separación Celular por Fluorescencia
Atg9: Autophagy Related 9	FBS: Suero Fetal Bovino
Atg12: Autophagy Related 12	FGF: Factor de Crecimiento Fibroblástico
Atg13: Autophagy Related 13	GCV: Ganciclovir
Atp5j: ATP synthase peripheral stalk subunit f6	GFP: Proteína Fluorescente Verde
Bcl2: BCL2 Apoptosis Regulator	Gpx1: Glutation Peroxidasa 1
Beclin: Beclin 1	Hey1: Hes related family bHLH transcription factor with YRPW motif 1
Bmi1: B lymphoma Mo-MLV insertion región 1 homolog	Hes1: Hes family bHLH transcription factor 1
Bmi1-CPC: Células Progenitoras Cardíacas Bmi1 ⁺	Hey2: Hes related family bHLH transcription factor with YRPW motif 2
BMP4: Bone Morphogenic Protein 4	HeyL: Hes related family bHLH transcription factor with YRPW motif like
Bnip3: BCL2 Interacting Protein 3	Hmox1: Heme Oxygenase 1
Bnip3L: BCL2 Interacting Protein 3 - Like	HPRT: Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
BSA: Albúmina de Suero Bovino	HSC: Células Madre Hematopoyéticas
Cat: Catalasa	IAM: Infarto Agudo de Miocardio
cDNA: DNA complementario	IMDM: Iscove's Modified Dulbecco's Medium
CD45: Protein Tyrosine Phosphatase Receptor Type C	Isl1: ISL LIM Homeobox 1
CD31: Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule	Jag1: Jagged Canonical Notch Ligand 1
c-Kit: Mast/ stem cell growth factor receptor	Jag2: Jagged Canonical Notch Ligand 2
CM: Cardiomiocito	Ki67: Marker of Proliferation Ki-67
CPC: Células Progenitoras Cardíacas	LIF: Factor Inhibidor de Leucemia
CSC: Células Madre Cardíacas	Map1lc3a: Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Alpha
Cxcl12: C-X-C Motif Chemokine Ligand 12	Map1lc3B: Microtubule Associated Protein 1 Light Chain 3 Beta
Cxcr4: C-X-C Motif Chemokine Receptor 4	MEFs: Fibroblastos Embrionarios Murinos
Cx43: Gap Junction Protein, Alpha 1, 43kDa	MMP3: Matrix Metallopeptidase 3
DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol	MOI: Numero de Multiplicidad de Infección
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle's Medium	MSC: Mesenchymal Stem Cell
DTA: Toxina Diftérica	MuSC: Células Madre del Músculo Esquelético
Dll4: Delta Like Canonical Notch Ligand 4	Myh6: Myosin Heavy Chain 6
EC: Células Endoteliales	NHEJ: Non-Homologous End Joining
ECGS: Suplemento de Crecimiento para Células Endoteliales	Nkx2.5: NK2 Homeobox 5
EdU: 5-etinil-2'-deoxiuridina	

Abreviaturas

Notch 1: Receptor 1 de Notch	VegfA: Vascular Endothelial Growth Factor A
Notch 2: Receptor 2 de Notch	VegfR1: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1
Notch 3: Receptor 3 de Notch	VegfR3: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 3
Notch 4: Receptor 4 de Notch	YFP: Proteína Fluorescente Amarilla
NSC: Células Madre Neurales	
OPN: Osteopontina	
PBS: Phosphate Buffered Saline	
pCEC: Células Endoteliales Primarias Cardíacas	
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa	
Pdgfra: Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha	
Prdx1: Peroxiredoxina 1	
Prdx4: Peroxiredoxina 4	
PI: Ioduro de Propidio	
PQ: Paraquat (N,N'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride)	
Ppargc1a: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1a	
p21: Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A	
p53: Transformation-Related Protein; 53 KD	
qPCR: PCR cuantitativa	
ROS: Especies Reactivas de Oxígeno	
RT-qPCR: PCR cuantitativa a Tiempo Real	
Sca1: Stem Cell Antigen 1	
SASP: Fenotipo Secretor Asociado a Senescencia	
SD: Desviación Estandar	
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate	
SMC: Células del Músculo Liso	
T-SV40: Antígeno Grande del Virus del Poliomavirus 40 de Simios	
TBS: Tris Buffered Saline	
tdTomato: Proteína Fluorescente Tomato	
TK: Timidina Quinasa	
Tpm1: Tropomiosina 1	
Tx: Tamoxifeno	
Ulk1: Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1	

INTRODUCCIÓN

1. EL CORAZÓN

Existen numerosos indicios de la importancia que diferentes culturas en la antigüedad le otorgaron al corazón, ya sea en sus creencias o como una parte fundamental de la anatomía. Incluso en los registros más antiguos que tenemos de los primeros humanos podemos observar la importancia que siempre se le ha otorgado a este órgano (**Figura 1**).



Figura 1. Pintura rupestre localizada en la Cueva del Pindal, Asturias. Datada en el periodo gravetiense y conocida coloquialmente como el "Mamut Enamorado". Se puede observar en el centro de la imagen la representación del corazón del mamut.

El corazón siempre ha sido considerado como una parte fundamental del cuerpo humano, generando innumerables dudas a su alrededor que han impulsado su estudio. En la actualidad existe un gran conocimiento sobre el funcionamiento de este órgano, pero también muchas cuestiones están todavía por resolver.

1.1 Centro del sistema circulatorio

Los registros de la primera gran revolución evolutiva, que podrían definirse como los inicios de la vida animal, se encuentran en depósitos del periodo cámbrico tardío; generados durante la llamada "explosión cámbrica". El oxígeno atmosférico en el periodo cámbrico reflejaba niveles de entre 5 y 10%, lejos del actual 21%, alcanzado en el ocaso del periodo carbonífero y tras la conquista de las primeras plantas terrestres. En este punto de enormes presiones selectivas, cualquier sistema de captación y difusión de oxígeno supondría una enorme ventaja evolutiva¹.

En este contexto evolutivo se produce, según ciertas clasificaciones taxonómicas, una gran división dentro del reino *Animalia*. Hace aproximadamente 600 millones de años, aparece una nueva estrategia de disposición corporal; los organismos triblásticos. Estos poseen un sistema circulatorio cerrado interno, por el que circula un fluido de forma extracelular que llega a las distintas cavidades corporales para recoger los productos de desecho y difundir los nutrientes. Los animales superiores han desarrollado un sistema vascular que consiste en una red de espacios conductores de sangre a través del tejido conectivo que hace llegar este fluido a todos los tejidos del cuerpo. En concreto, los vertebrados han desarrollado un linaje celular secundario, el endotelio, que forma esta red. La circulación de la sangre se consigue a través de la contracción de células mesoteliales especializadas (células mioepiteliales) y de una

bomba muscular que genera la principal fuerza hidráulica y es el centro del sistema circulatorio, el corazón. Dentro de esta organización, común en todos los vertebrados, existen variaciones en función del ambiente en el que viven los organismos. Los peces, por ejemplo, tienen un sistema circulatorio simple, con un corazón compuesto por una aurícula y un ventrículo únicos, que bombea la sangre hacia las branquias para su oxigenación. Los anfibios y reptiles presentan una gran variedad de sistemas intermedios de separación entre el sistema circulatorio y el respiratorio. Finalmente, aves y mamíferos presentan un sistema de circulación doble, con un corazón formado por dos aurículas y dos ventrículos² (**Figura 2**).

1.2 Estructura y funcionamiento del corazón

El corazón es uno de los órganos más complejos estructural y funcionalmente dentro de la anatomía de los mamíferos. Debido a las crecientes necesidades metabólicas del embrión en desarrollo, el sistema circulatorio y, en concreto, el corazón, es el primer órgano que comienza a diferenciarse. El desarrollo embrionario del corazón sigue un proceso de formación complejo y muy regulado, hasta alcanzar su estructura final³.

Los mamíferos presentan un sistema circulatorio doble y, consecuentemente, su corazón está compartimentado en dos aurículas y dos ventrículos. La aurícula derecha recibe la sangre desoxigenada y la pasa a través de la válvula tricúspide al ventrículo derecho, que la bombea a los pulmones, donde se realiza el intercambio gaseoso (circulación menor). Una vez oxigenada, la sangre llega a la aurícula izquierda y pasa a través de la válvula mitral al ventrículo izquierdo, que la bombea de nuevo para que llegue al conjunto del organismo (circulación mayor) (**Figura 2**). Este movimiento coordinado de aurículas y ventrículos debe realizarse de forma constante durante toda la vida del organismo⁴. Para que este complejo mecanismo funcione correctamente, el corazón está compuesto de diferentes tipos de tejidos que actúan de forma coordinada. La mayoría del volumen del corazón lo constituye el tejido muscular, que genera la fuerza hidráulica necesaria para el bombeo de la sangre. No obstante, la musculatura cardíaca actúa apoyada en otros tipos celulares. Entre ellos, el corazón cuenta con una compleja red vascular que permite la circulación coronaria y el constante aporte de oxígeno y nutrientes necesario para mantener el funcionamiento exigente e ininterrumpido de este órgano. Adicionalmente, existen numerosas terminaciones nerviosas para coordinar la contracción de cada una de las partes del corazón y adecuarla a los diferentes estímulos externos. Finalmente, el corazón presenta un tejido conectivo diverso que desarrolla un papel fundamental, por ejemplo, en la respuesta frente a daño cardíaco⁵.

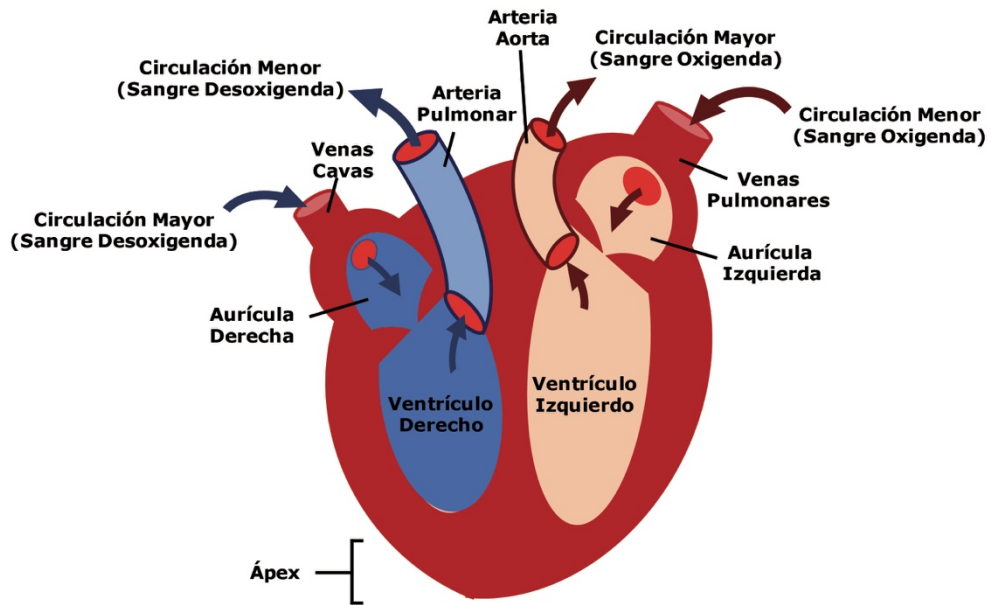


Figura 2. Esquema representativo del corazón de aves y mamíferos, y su participación en el sistema circulatorio doble.

1.3 Tipos celulares que componen el corazón

Las células que componen los diferentes tejidos que forman el corazón se pueden separar en dos grandes grupos: células miocíticas o cardiomiocitos y células no miocíticas.

La mayoría del volumen del corazón está formado por músculo estriado, encargado de la contracción de aurículas y ventrículos y, por lo tanto, del bombeo de la sangre. Este músculo está compuesto por un tipo celular específico, los cardiomiocitos (CM). Los CM son células de gran tamaño que presentan una gran cantidad de miofibrillas que se organizan en forma de sarcómeros, permitiendo su contracción individual y espontánea⁶. Debido a su ininterrumpida actividad, los CM requieren de un constante aporte energético, por lo que presentan una gran cantidad de mitocondrias⁷. Además, se ha podido observar que un porcentaje significativo de CM se encuentran polinucleados⁸. Por su gran tamaño, aunque los CM suponen el 35% de las células del corazón, pueden llegar a ocupar el 80% de su volumen; por lo tanto, los CM se pueden considerar el tipo celular principal del corazón⁵ (**Figura 3**). Se caracterizan por la expresión de proteínas como actina sarcomérica α ($S\alpha A$) o conexina 43 ($CX43$)⁹.

No obstante, para el correcto funcionamiento de la matriz cardíaca son necesarios otros tipos celulares que actúan de forma conjunta con los CM; las células no miocíticas. Dentro de las células no miocíticas encontramos células endoteliales (EC; del inglés *Endothelial Cell*), células del músculo liso (SMC; del inglés *Smooth Muscle Cell*), fibroblastos o miofibroblastos, células nerviosas, células derivadas de la médula ósea y las poblaciones de progenitores propias del corazón (**Figura 3**).

Introducción

Debido a su constante actividad, el corazón es el segundo órgano del cuerpo con mayor consumo medio de glucosa, después del cerebro¹⁰. Por lo tanto, para su correcto funcionamiento, necesita una compleja red vascular que permita un aporte constante de oxígeno y nutrientes. De hecho, las EC, aunque de menor tamaño que los CM, son el tipo celular más abundante en el corazón; representando aproximadamente un 40% del número total de células⁵. Las EC se caracterizan por la expresión de proteínas como CDH5 o CD31¹¹. Parte de esta vasculatura coronaria se diferencia a arterias y se asocia a pericitos (PDGFR β y NG2 positivos¹²) y células del músculo liso (α SMA y SM-MHC positivas¹³). Estas células colaboran para facilitar el correcto funcionamiento de la vasculatura cardíaca y su desarrollo¹⁴. La vasculatura cardíaca está sujeta a una constante renovación y desempeña un papel fundamental en la respuesta frente a daño cardíaco. El proceso de revascularización que tiene lugar en las zonas afectadas por un infarto agudo de miocardio (IAM) es esencial para la remodelación cardíaca producida tras este daño¹⁵.

Los fibroblastos son los principales integrantes del tejido conectivo y los responsables de generar la mayor parte de la matriz extracelular del corazón, que sirve como soporte de su estructura y permite la transmisión de señales intercelulares. Suponen aproximadamente un 15% de las células del corazón⁵ y se componen de un grupo heterogéneo de células que pueden expresar proteínas como CD90, PDGFR α y FSP1¹⁶. Además, los fibroblastos desempeñan una función vital en la respuesta temprana frente a daño cardíaco, activándose y dando lugar a los miofibroblastos. Ambos tipos celulares participan en la formación de una cicatriz cardíaca como parte del proceso de remodelación en la zona afectada tras IAM¹⁷.

En menor proporción dentro del corazón, se encuentran las células nerviosas y las células derivadas de la médula. Las células nerviosas se caracterizan por la expresión de α -Tubulina acetilada¹⁸. El corazón presenta un complejo sistema de conducción nervioso que coordina el ritmo de contracción/relajación de cada una de sus partes. Las células nerviosas se agrupan en fibras nerviosas simpáticas y parasimpáticas que mediante impulsos nerviosos acompañan la frecuencia e intensidad de la contracción del corazón en respuesta a las diferentes situaciones fisiológicas (reposo, ejercicio, temperatura...) o frente a estímulos eventualmente perniciosos (estrés, miedo...)¹⁹. Además, diferentes estudios han definido un papel de estas fibras nerviosas en la regeneración cardíaca, coordinando la respuesta inmune y aportando diferentes factores de crecimiento¹⁸. Adicionalmente, en el corazón residen varios tipos celulares residentes derivadas de la médula, caracterizadas por la expresión de la proteína de membrana CD45²⁰. Entre los diferentes tipos celulares hematopoyéticos que residen en el corazón, destaca la presencia de linfocitos B y macrófagos, que participan directamente en la coordinación de la respuesta frente al daño cardíaco²¹.

Finalmente, nos encontramos con una pequeña población sobre la que existe cierta controversia en cuanto a las células que la componen y su función específica; las células progenitoras cardíacas (CPC). Existen varias poblaciones celulares en el corazón a las que diversos autores les han atribuido características progenitoras, con diferentes matices en

cuanto a su función específica y los tipos celulares a los que son capaces de diferenciarse preferentemente. Estas poblaciones han sido definidas en base a la expresión de proteínas de superficie como MYH6²², SCA-1²³, PDGFR α ²⁴ o CD31²⁵. Por otro lado, también se han definido otras poblaciones en base a la expresión de varios factores de transcripción como NKX2.5²⁶, ISL1²⁷ o BMI1²⁸. La diversidad de poblaciones definidas como progenitoras en un órgano que presenta una tasa de renovación tan reducida como el corazón resulta sorprendente y pone de manifiesto la controversia existente en el estudio de las CPC.

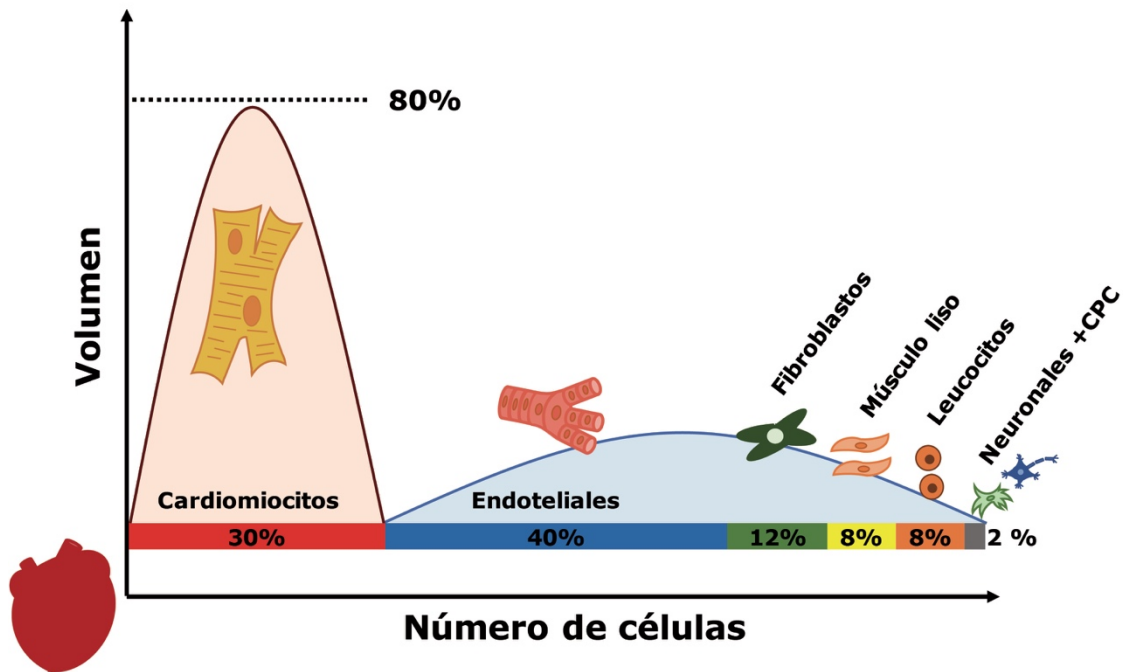


Figura 3. Representación de los principales tipos celulares que componen el corazón adulto.

2. REGENERACIÓN CELULAR EN EL CORAZÓN

En la gran mayoría de organismos estudiados existe una constante renovación celular desde el momento de su concepción. No obstante, la capacidad de renovación celular varía enormemente dependiendo del tipo de organismo, la edad de dicho organismo, o los estímulos a los que se someta como, por ejemplo, un daño externo. De hecho, incluso existe una gran diferencia en cuanto a la capacidad de renovación celular dentro de los diferentes tejidos y órganos que componen a cada individuo. Los mecanismos implicados en la renovación celular adquieren especial importancia en caso de daño, ya que marcarán en gran medida la capacidad de recuperación de cada tejido.

2.1 Capacidad de renovación celular en el corazón

Numerosos estudios se han centrado en definir la capacidad de renovación celular dentro de los diferentes tejidos. Se han podido identificar varios órganos que presentan una elevada tasa de renovación celular como la piel, el intestino, el epitelio estomacal²⁹ o la médula ósea³⁰; de la misma manera se han definido otros órganos que presentan una capacidad

significativamente menor, como puede ser el músculo esquelético³¹ o el cerebro³². Sin embargo, el corazón ha sido considerado durante mucho tiempo como un órgano completamente post-mitótico, es decir, que no presentaba renovación celular de ningún tipo; concepto aplicado de forma más estricta a la renovación de los CM.

No fue hasta el año 2009 cuando se confirmó la existencia de renovación celular en el corazón humano. Durante la Guerra Fría, muchas personas se vieron afectadas por las pruebas para el desarrollo de bombas nucleares. Mediante la medición de isótopos de C¹⁴ incorporados por estas personas, se pudo demostrar, de forma incuestionada, que existía cierta proliferación celular en los diferentes linajes que componen el corazón; incluidos los CM³³. No obstante, esta tasa de renovación celular fluctúa considerablemente entre los diferentes tipos celulares. Las EC son las que presentan una mayor tasa de renovación; aproximadamente el 17% de estas células se recambian anualmente. En las células mesenquimales esta tasa se reduce significativamente, llegando a un 4% anual. Por último, los CM, a pesar de ser uno de los tipos celulares más abundantes en el corazón y el que supone el mayor volumen, presenta la menor tasa de renovación; menos de un 1% anual en humanos³⁴. De hecho, se ha observado que esta tasa se reduce progresivamente con la edad, efecto que se ha confirmado también en modelos murinos³⁵. La baja renovación celular en el corazón se asocia a la mínima proliferación observada en su tipo celular principal, los CM. Además, diferentes estudios han establecido una relación directa entre la tasa de renovación celular de un tejido y la actividad de las poblaciones de progenitores residentes²⁹. Estas peculiaridades del tejido cardíaco influyen directamente en la limitada capacidad de recuperación frente a un daño severo en comparación con otros órganos.

2.2 Capacidad de regeneración cardíaca frente a daño

En los últimos años, el estudio de la capacidad regenerativa de los diferentes órganos ha suscitado un gran interés científico debido a las importantes implicaciones terapéuticas de los mecanismos asociados a estos procesos. Los diferentes estudios realizados analizan los mecanismos presentes en diferentes modelos que presentan una gran capacidad de regeneración. Si nos centramos en los estudios realizados en corazón, se ha podido observar que, tanto el ajolote mejicano (*Ambystoma mexicanum*) como el pez cebra (*Danio rerio*), son capaces de recuperarse eficazmente de un daño cardíaco severo^{36,37}. El pez cebra es uno de los modelos animales más utilizados en el estudio de la regeneración cardíaca debido a su robusta capacidad de regeneración frente a diferentes tipos de daño. Este animal es capaz de recuperarse de una depleción quirúrgica de hasta un 20% del volumen de su ventrículo sin la formación de ningún tipo de cicatriz³⁸ o de recuperar más del 60% de sus CM en tres meses tras su ablación genética³⁹. Sin embargo, esta capacidad de regeneración cardíaca se reduce muy significativamente en mamíferos, siendo éstos incapaces de recuperar completamente la funcionalidad del corazón tras un daño severo⁴⁰.

Se han realizado amplios estudios en ratón para definir los factores que limitan la capacidad regenerativa del corazón en mamíferos y se ha podido confirmar que este marco

varía significativamente en función de la edad de los individuos (**Figura 4**). Durante el desarrollo embrionario, los modelos murinos presentan una capacidad regenerativa comparable con la del pez cebra, siendo capaces de recuperar hasta el 60% de sus CM tras ablación genética sin observarse secuelas morfológicas o funcionales⁴¹. Esta capacidad se mantiene parcialmente durante los primeros días de su etapa postnatal. Inicialmente, se creía que entre los días 1 y 7 tras su nacimiento, los animales son capaces de recuperarse completamente de una resección quirúrgica de la zona del ápex⁴². No obstante, estudios adicionales han confirmado que esta capacidad se reduce sustancialmente tras el día 1 postnatal⁴³ y que este tipo de daño podría suponer secuelas posteriores, observándose cierta fibrosis cardíaca y un adelgazamiento de la pared ventricular⁴⁴. En ratones adultos, la capacidad de regeneración cardíaca se pierde casi completamente. Tras IAM, los animales son incapaces de recuperar la mayoría de los CM perdidos, provocando deficiencias funcionales que son arrastradas durante el resto de la vida del individuo^{45,15}.

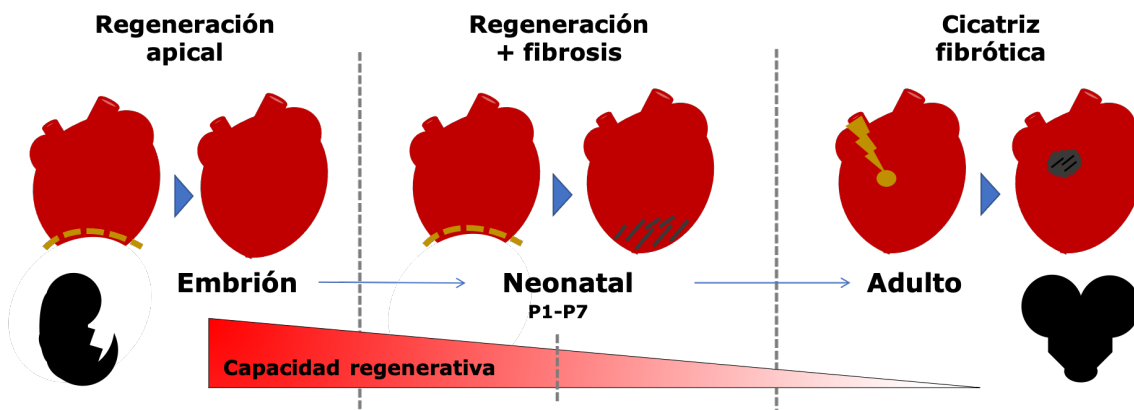


Figura 4. Representación de la evolución de la capacidad regenerativa frente a daño cardíaco en ratón.

Existen varias características propias del tejido cardíaco que se asocian con su limitada capacidad de regeneración. La escasa capacidad proliferativa de los CM parece suponer la mayor limitación. Diferentes estudios apuntan a que el principal freno para la proliferación de los CM es su alto porcentaje de poliploidización o polinucleación, fenómenos que aumentan significativamente tras el nacimiento del individuo⁸. Se ha podido confirmar en diferentes modelos murinos que aquellos animales que presentan un menor índice de poliploidización en sus CM son más competentes a la hora de recuperarse de un daño cardíaco severo⁴⁶. Igualmente, la reducción de la poliploidización en el modelo de pez cebra mejora directamente la capacidad de regeneración del tejido cardíaco⁴⁷.

Otro factor que parece influir directamente sobre la regeneración del corazón es el microambiente asociado al tejido cardíaco. En estudios centrados en analizar la habilidad de regeneración neonatal se ha podido confirmar que la alteración del microambiente cardíaco tras el día 1 postnatal afecta negativamente a esta capacidad⁴³. El paso del ambiente hipóxico en el que se desarrolla el embrión a la normoxia postnatal supone un aumento drástico de las especies reactivas de oxígeno (del inglés, ROS) a las que se expone el organismo. El

incremento del estrés oxidativo al que está sometido el tejido cardíaco, especialmente los CM, supone un aumento del daño en el ADN que favorece su polinucleación y, por lo tanto, la restricción de su capacidad de proliferación y diferenciación terminal⁴⁸.

Además, varios estudios en mamíferos parecen indicar que las diferencias entre la capacidad de regeneración en estado fetal frente al estado adulto podrían estar influenciadas por la respuesta inmune frente a daño, vital para el desarrollo del proceso de regeneración. Se ha podido ver que la polarización de los macrófagos M2 (anti-inflamatorios) a M1 (pro-inflamatorios) está directamente implicada en el proceso de regeneración del corazón en ratones. Al comparar la respuesta inmune en ratones en el día 1 postnatal (alta capacidad regenerativa) y día 14 (pérdida de capacidad regenerativa) se observó que en el primer caso predominaba la presencia de macrófagos M2; al contrario que en el día 14, cuando la capacidad de recuperación es limitada²¹.

No obstante, en diferentes tejidos se ha confirmado que la actividad de las poblaciones de progenitores adultos residentes actúa como el principal factor limitante para la capacidad regenerativa, al tratarse de la principal fuente de generación de células *de novo*^{29,49,50}. En el corazón se han identificado diferentes poblaciones de progenitores, aunque presentan una capacidad regenerativa limitada comparada con otros órganos.

2.3 Orígenes de la renovación celular en el corazón

La generación de células nuevas en el corazón *in-vivo* se debe principalmente a tres mecanismos; la reversión de células diferenciadas hacia estados progenitores proliferantes (des-diferenciación), la conversión de un tipo celular a otro (plasticidad celular) y la activación de las poblaciones de células madre o progenitoras⁵¹. Todos estos mecanismos participan en la renovación celular que se observa en el corazón de los mamíferos adultos. Aunque este órgano presenta una capacidad limitada comparada con otros modelos animales u otros órganos, estos mecanismos de renovación celular contribuyen a todos los linajes cardíacos y presenta un papel fundamental tanto en homeostasis como en la respuesta regenerativa frente a daño cardíaco.

2.3.1 Des-diferenciación, plasticidad y competición celular

En el corazón humano, se ha definido una población de CM que presenta cierta capacidad para des-diferenciarse y proliferar; aunque se trata de un porcentaje muy reducido (entre un 0,0006% y 1% de tasa de recambio anual, constante durante la vida del individuo)⁵². Diferentes estudios mostraron que este fenómeno también se observaba en el corazón de ratones adultos, definiendo una población de CM mantenidos en hipoxia como la principal responsable del fenómeno de des-diferenciación-proliferación⁵³. De hecho, animales mantenidos en condiciones de bajo oxígeno presentaron un moderado incremento en su capacidad de regeneración⁵⁴. Esta condición podría ser una de las razones de la reducida capacidad de regeneración cardíaca observada en mamíferos, cuyo corazón está sometido a

un mayor estrés oxidativo que en el modelo del pez cebra, donde este fenómeno es más abundante³⁸. El proceso de des-diferenciación se ha definido de forma similar en EC, donde células diferenciadas son capaces de reactivar su proliferación generando nuevas estructuras vasculares como respuesta tras IAM⁵⁴. Igualmente, se ha observado una reactivación en la proliferación de células diferenciadas en fibroblastos⁵⁵ y de las células hematopoyéticas residentes en el corazón⁵⁶.

Otra parte de las células generadas *de novo* en el corazón derivan del proceso denominado como plasticidad celular. Este mecanismo se ha identificado en modelos con mayor capacidad de regeneración⁴⁰, donde ciertas células son capaces de dar lugar a otro tipo celular, con características funcionales y fisiológicas diferentes. En el corazón, al igual que en otros órganos, se ha podido observar que el proceso de plasticidad celular es más abundante en condiciones de daño⁵⁷. Tras daño cardíaco, las EC presentan una especial plasticidad; dando lugar a CM²⁵, pericitos o células del músculo liso⁵⁸ y fibroblastos⁵⁹. Adicionalmente, se ha descrito que el fenómeno de competición celular participa en la generación de nuevas células en el corazón adulto. Se ha podido definir que los CM dañados compiten y son eliminados por células sanas más eficientes. Este mecanismo es especialmente importante en el desarrollo, pero también tiene un papel relevante en la homeostasis y renovación de CM en la etapa adulta⁶⁰.

2.3.2 Células Progenitoras Cardíacas

Dado que la base de la renovación celular y la regeneración se sostiene sobre la presencia de una fuente que aporte nuevas células, en la mayoría de los tejidos de organismos adultos, las poblaciones de células madre y progenitoras se consideran como el principal origen de ambos procesos. Una población de células progenitoras adultas se diferencia de las células madre embrionarias (ESC, del inglés *Embryonic Stem Cells*) en que su capacidad de diferenciación está limitada a ciertos tipos celulares que componen el tejido en el que residen. En órganos como el intestino²⁹, el músculo esquelético⁴⁹ o la médula ósea⁵⁰, existe un amplio consenso sobre la existencia de una población de células progenitoras adultas claramente definida. Todas las poblaciones celulares definidas como progenitoras adultas deben cumplir una serie de características definidas por la comunidad científica: ser poblaciones celulares no completamente diferenciadas, tener capacidad de autorenovación, capacidad clonogénica y ser capaces de diferenciarse a los linajes celulares principales del tejido donde residen⁶¹. En base a estos estándares, varios autores han sido capaces de definir diferentes poblaciones celulares que se sitúan dentro del marco de las CSC (del inglés, *Cardiac Stem Cells*) /CPC (del inglés, *Cardiac Progenitor Cells*). Sin embargo, existe cierta controversia en el campo debido a la limitada renovación celular presente en el corazón y a la diversidad de poblaciones celulares definidas como progenitoras.

Los primeros trabajos que propusieron la existencia de poblaciones progenitoras en el corazón adulto definieron una población celular caracterizada por la expresión de la proteína de superficie c-KIT, expresada también por las células madre hematopoyéticas, y que era

capaz de regenerar la población de CM y EC tras IAM^{62,63}. Sin embargo, estudios posteriores de trazado de linaje utilizando el promotor del gen c-Kit han creado cierta controversia en torno a esta población de progenitores^{64, 65}; mostrando una limitada capacidad cardiogénica en el corazón adulto⁶⁶. A pesar de que estos estudios han generado un intenso debate en el campo de las CPC, abrieron la puerta a la identificación de varias poblaciones de progenitores adultos, definidas por la expresión de diferentes marcadores de membrana y por su capacidad de diferenciación hacia varios linajes celulares cardíacos (**Figura 5**).

Entre los diferentes marcadores de membrana empleados para definir las poblaciones de CPC quizás el más aceptado es *Stem Cell Antigen-1* (SCA-1), expresado también en otras poblaciones de progenitores adultos^{67,68}. Estudios de trazado de linaje han demostrado que la población de células cardíacas SCA-1⁺ es capaz de diferenciarse hacia todos los linajes celulares que componen el corazón²³. No obstante, la población SCA-1⁺ es altamente heterogénea y dentro de ella se han definido otras poblaciones que, en algunos casos, pueden ser solapantes. Estas subpoblaciones se diferencian unas de otras en sus capacidades de diferenciación y en los marcadores de membrana que las definen; como, por ejemplo, las poblaciones SCA1⁺CD31⁺⁶⁹; SCA1⁺ ABCG2⁺⁷⁰ o la población SCA1⁺ PDGFR α ⁺²⁴.

Por otro lado, también se han definido otras poblaciones en base a la expresión de factores de transcripción como NKX2.5²⁶, ISL1²⁷ o BMI1²⁸. El presente proyecto se centrará en el estudio de una subpoblación de las SCA1⁺-CPC, definidas en trabajos publicados por nuestro grupo y que se caracterizan por su alta expresión del gen *Bmi1* (Bmi1-CPC)²⁸.

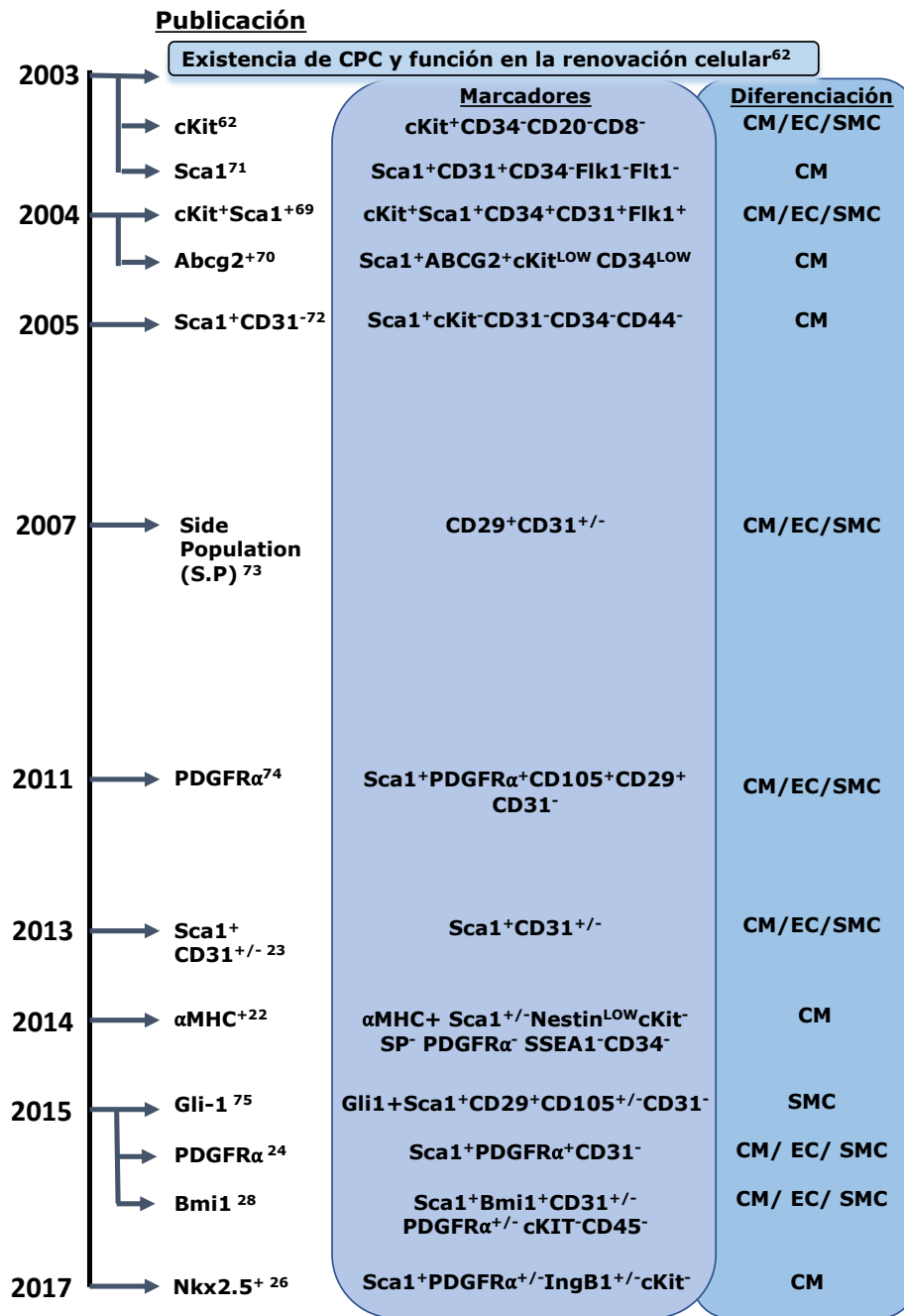


Figura 5. Línea temporal indicando las diferentes poblaciones de CPC (62,71,69,70,72,73, 74,23,22,75,24,28,26) descritas junto a los marcadores empleados para su aislamiento y caracterización, así como su capacidad de diferenciación a los diferentes linajes cardíacos: cardiomiocitos (CM), células endoteliales (EC) y células de músculo liso (SMC).

3. PROGENITORES CARDÍACOS BMI1⁺

3.1 Papel del complejo Policomb y *Bmi1*

Bmi1 recibe su nombre de *B-cell-specific Moloney murine leukemia virus integration site*, ya que este gen fue identificado inicialmente como la principal diana de inserción del virus Moloney, que provocaba tumores linfoides de tipo B. Estudios posteriores han definido a BMI1 como uno de los principales componentes, junto con MEL18 y las subunidades RING1A y RING1B, del complejo *Polycomb Repressive Complex 1* (PRC1)⁷⁶. El PRC1, es uno de los

complejos más importantes de la familia *Polycomb*, actuando como uno de los principales complejos de regulación epigenética relacionados con el silenciamiento génico. PRC1 está sujeto a una regulación muy compleja⁷⁷, teniendo como función principal la mono-ubiquitinación de la lisina 119 de la histona H2A (H2AK119ub)⁷⁶.

Las modificaciones epigenéticas regulan de forma reversible o transitoria la expresión de diferentes genes mediante metilación del DNA o modificación de histonas⁷⁸. Estos mecanismos se han definido en los últimos años como uno de los principales reguladores de la diferenciación celular durante el desarrollo embrionario y en la etapa adulta^{79,80}. Por esta razón, la función de BMI1 como represor transcripcional dentro del PRC1 se ha caracterizado ampliamente en la regulación de células progenitoras^{81,82,83}. Se ha demostrado que BMI1 presenta un papel fundamental en el desarrollo hematopoyético y neuronal⁸⁴. Su depleción genera deficiencias en la proliferación celular, impidiendo la progresión de la fase S del ciclo celular e induciendo la entrada prematura en senescencia; fundamentalmente debido al papel de BMI1 como represor transcripcional del locus *Ink4a/Arf*⁸⁵. El papel de BMI1 en la regulación de la proliferación celular y en el mantenimiento de las capacidades progenitoras también se ha podido observar en células madre mesenquimales (MSC; del inglés *Mesenchymal Stem Cell*), donde inhibe la expresión de quimioquinas relacionadas con el fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP)⁸⁶. En el contexto cardíaco, se ha definido que BMI1 actúa como represor de genes relacionados con cardiomiogénesis, actuando como un represor de la reprogramación de fibroblastos hacia CM⁸⁷. BMI1 también se ha visto relacionado con la regulación de los niveles de ROS intracelular, principalmente mitocondrial⁸⁸. Además, se ha podido caracterizar la implicación de BMI1 en la regulación conjunta de ambos procesos, afectando a la proliferación de las células progenitoras en función de los niveles de estrés oxidativo⁸⁹. En diferentes estudios se ha confirmado el papel de BMI1 en la regeneración del músculo esquelético tras daño⁹⁰ o en la resistencia frente a estrés oxidativo en células hematopoyéticas⁷⁸. Nuevamente, en el contexto cardíaco, la expresión de BMI1 se ha relacionado directamente con la reparación de daño cardíaco reumático mediado por células progenitoras⁹¹.

3.2 Células progenitoras cardíacas *Bmi1*⁺

La expresión de *Bmi1* ha sido descrita en numerosas poblaciones de progenitores adultos⁹². Diferentes estudios han relacionado la expresión de *Bmi1* directamente con el mantenimiento de estas poblaciones de progenitores adultos⁹³, reprimiendo su diferenciación⁹⁴ y evitando la entrada prematura en senescencia⁸⁶. En animales deficientes de *Bmi1* (*knock-out*), se han observado deficiencias en la proliferación celular que afectan directamente a la población de células madre hematopoyéticas⁹³. Por otro lado, se han realizado estudios de trazado de linaje en animales transgénicos (*knock-in*) modificados para incluir en un alelo de *Bmi1* la expresión de la enzima recombinasa Cre inducible por tamoxifeno (CreERT); estos estudios permitieron identificar poblaciones de progenitores *Bmi1*⁺ presentes en las criptas intestinales⁹⁵. Además de los estudios mencionados anteriormente, la expresión de *Bmi1* se ha demostrado fundamental para el mantenimiento de otras poblaciones progenitoras

presentes en muchos otros tejidos; como por ejemplo, células madre neurales⁹⁶, células madre de la próstata⁹⁷, células madre bronqueoalveolares⁹⁸, células madre de los incisivos de ratón⁹⁴, células madre germinales⁹² y en las células pancreáticas acinares⁹⁹. En base a estos resultados previos, nuestro grupo fue capaz de identificar una población de células progenitoras cardíacas $Bmi1^+$ (Bmi1-CPC) con funciones clave para la homeostasis del corazón y en la respuesta a daño cardíaco.

3.2.1 Bmi1-CPC en el contexto de homeostasis cardíaca

Para definir la población Bmi1-CPC los estudios realizados en nuestro laboratorio se valieron principalmente de tres modelos murinos: $Bmi1^{GFP/+}$ (Figura 6A) $Bmi1^{CreERT/+} Rosa26^{YFP/+}$ (Figura 6B) y $Bmi1^{CreERT/+} Rosa26^{Tomato/+}$ (Figura 6C); empleados igualmente en el presente proyecto.

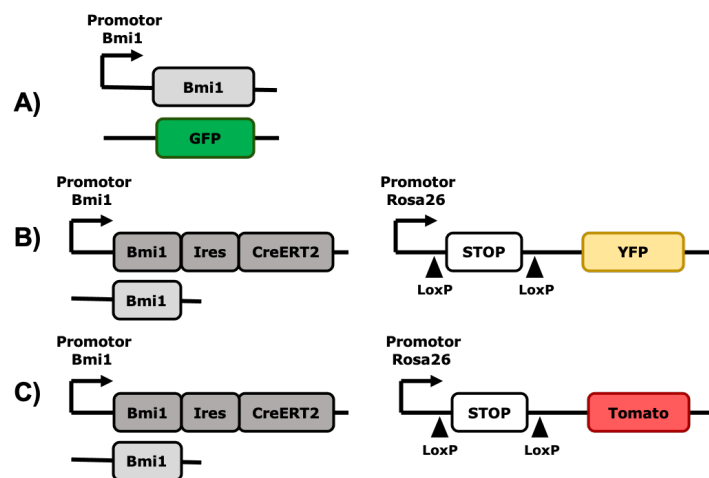


Figura 6. Representación esquemática de los modelos de ratón empleados para el estudio de la población Bmi1-CPC. A) Representación esquemática del modelo animal $Bmi1^{GFP/+}$, B) $Bmi1^{CreERT/+} Rosa26^{YFP/+}$ y C) $Bmi1^{CreERT/+} Rosa26^{Tomato/+}$

Por un lado, se empleó el modelo transgénico $Bmi1^{GFP/+}$, generado en el laboratorio del Dr. I Weissman¹⁰⁰. En este modelo, las células que expresen $Bmi1$ serían marcadas por GFP. Por otro lado, se utilizó el modelo transgénico $Bmi1^{CreERT}$ generado por el grupo del Dr. M Capecchi⁹⁵. Empleando este modelo se pudieron generar los ratones doble transgénicos $Bmi1^{CreERT} Rosa26^{YFP/+}$ y $Bmi1^{CreERT/+} Rosa26^{Tomato/+}$. La inducción mediante Tamoxifeno (Tx) activa la expresión del gen reportero de la proteína amarilla fluorescente (YFP; *Yellow Fluorescent Protein* o tdTomato; *Tomato Fluorescent Protein*) en las células $Bmi1^+$ y en las derivadas de esta población, aunque pierdan a expresión de $Bmi1$.

Estos modelos permitieron definir la población Bmi1-CPC, caracterizada según sus proteínas de membrana por ser negativa para c-KIT y CD45 (<0,5%) y positiva para SCA1 (>95%); presentándose como una población mixta compuesta por poblaciones $CD31^+$ (85%) y $PDGFR\alpha^+$ (12%)^{28,101}. Además, se pudo validar la identidad de las Bmi1-CPC como una población definida de progenitores cardíacos; no derivan de células hematopoyéticas ni de la

población cKIT⁺ y, aunque presentan una relación directa con el endotelio, se confirmó que no se trataba de una población de células endoteliales inmaduras¹⁰¹. Adicionalmente, se realizaron estudios de depleción de la población Bmi1-CPC empleando ratones modificados para inducir la expresión de la toxina diftérica (DTA) en las células que expresaran *Bmi1*. Estos estudios permitieron confirmar la capacidad de auto-renovación de la población Bmi1-CPC, siendo capaz de regenerarse parcialmente tras ser deplecionada en homeostasis¹⁰¹. En base a estudios de trazado de linaje, se confirmó que la población Bmi1-CPC participaba activamente en la homeostasis del corazón. Esta población es capaz de diferenciarse hacia los tres tipos celulares principales del corazón: CM, SMC y EC, dando lugar a hasta un 6% de los CM del ratón adulto tras un año post-tratamiento con Tx²⁸(**Figura 7A**). Estudios posteriores realizados por el grupo del Dr. Y Xie confirmaron la existencia de una población de CPC caracterizada por una alta expresión de *Bmi1* (Bmi1^{High}); esta población presentaba capacidad de diferenciarse a CM y SMC¹⁰².

3.2.2 Bmi1-CPC en el contexto de daño cardíaco

Adicionalmente, se ha definido que la población Bmi1-CPC desempeña un papel fundamental en la regeneración tras daño cardíaco severo causado por IAM. Estudios previos han descrito que las variaciones en los niveles de ROS modulan directamente la actividad de BMI1, favoreciendo la diferenciación de la población Bmi1-CPC hacia los diferentes linajes celulares cardíacos¹⁰³. Estos mecanismos permiten a la población Bmi1-CPC responder activamente a variaciones en los niveles de estrés oxidativo, como los experimentados tras un episodio de IAM¹⁰⁴. Estudios de trazado de linaje realizados sobre modelos de ratón sometidos a daño cardíaco severo, han demostrado un aumento significativo en la actividad de las Bmi1-CPC; participando activamente en la generación de células *de novo* como parte de la respuesta regenerativa desarrollada tras IAM¹⁰⁵ (**Figura 7A**). Estos efectos fueron de nuevo confirmados en los estudios realizados por el grupo del Dr. Y Xie, donde la población de CPC Bmi1^{High} aumentaba su aporte a los diferentes linajes cardíacos tras infarto¹⁰². Se ha podido observar que la contribución de la población Bmi1-CPC es especialmente importante dentro del linaje endotelial. De hecho, en los modelos deficientes de la población Bmi1-CPC tras la expresión de DTA, se han observado importantes alteraciones en la revascularización de la zona afectada tras IAM (**Figura 7B**). Estos defectos en la revascularización generaron un fenotipo similar a la cardiomiopatía isquémica dilatada, reduciendo directamente la supervivencia de los animales y confirmando el papel fundamental de la población Bmi1-CPC en la recuperación tras IAM¹⁰¹.

3.2.3 Bmi1-CPC y su relación con el endotelio cardíaco

Por último, se trató de definir un concepto clave para el mantenimiento de otras poblaciones de progenitores adultos, el nicho en el que residen. Publicaciones previas habían propuesto la existencia de un nicho hipóxico en el epicardio, donde residirían poblaciones de progenitores definidas por mantener preferencialmente un metabolismo glucolítico¹⁰⁶. Los trabajos desarrollados en nuestro grupo demuestran una localización preferente de las Bmi1-CPC en las zonas de bajo ROS generadas en la proximidad de la vasculatura cardíaca. Esta

relación se hace más notoria en animales geriátricos y modula de forma directa el estado proliferativo de la población Bmi1-CPC; así como otros parámetros celulares, como los niveles de ROS o la expresión de *Bmi1*¹⁰⁷ (Figura 7C). Estos resultados postularon la existencia de un nicho vascular para la población Bmi1-CPC, aunque se abrieron nuevas preguntas importantes sobre los mecanismos moleculares que podrían mediar en esta interacción.

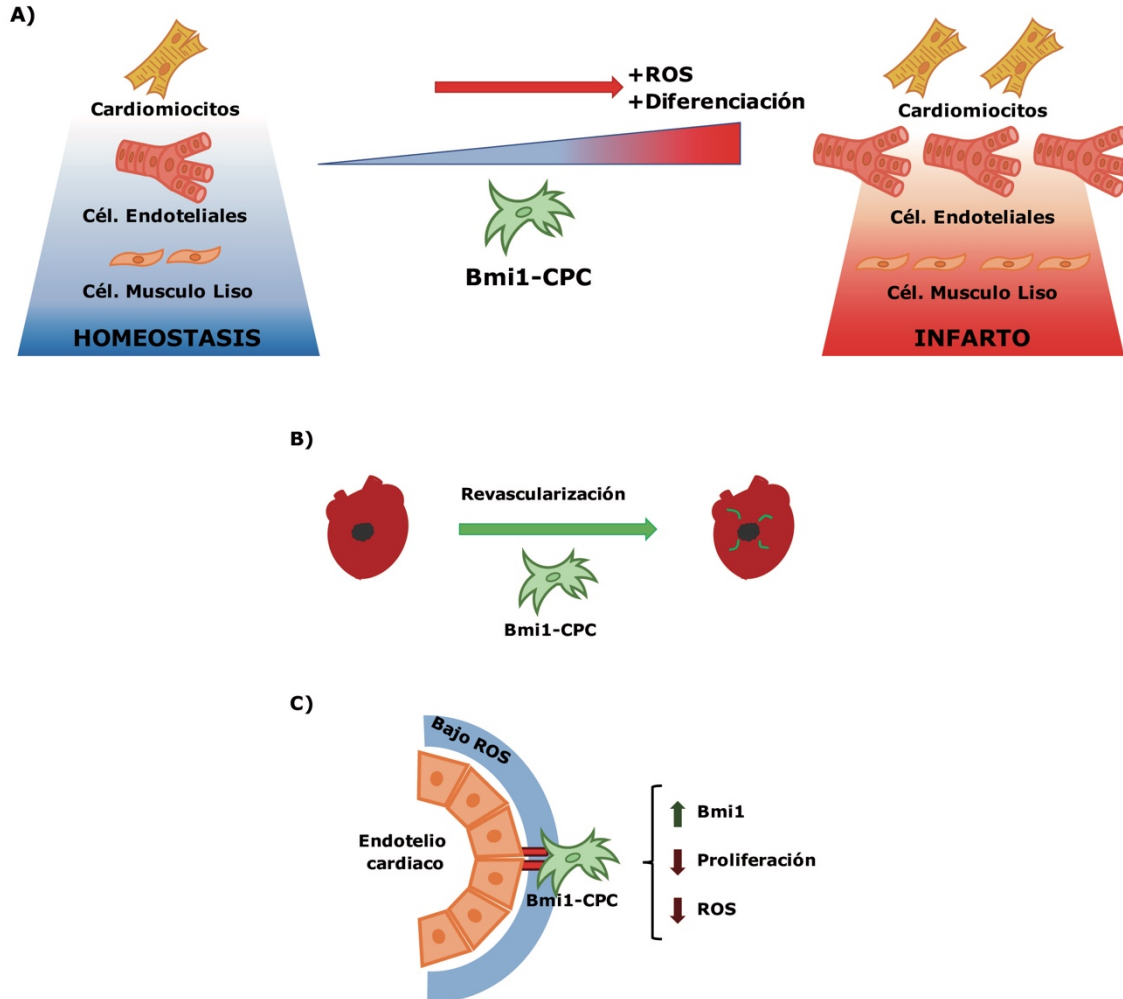


Figura 7. Representación de las principales características definidas para la población Bmi1-CPC. A) Son capaces de diferenciarse a los tres linajes celulares cardíacos principales, aumentando su aportación tras un IAM; **B)** tienen un papel fundamental en la revascularización de la zona dañada tras IAM; y **C)** mantienen una relación con el endotelio cardíaco que modula directamente su dinámica celular.

4. EL NICHU, ESENCIAL PARA LA FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS MADRE

4.1 Concepto de nicho en células madre

Las células progenitoras adultas se suelen mantener en localizaciones determinadas dentro de los diferentes tejidos, en microambientes concretos en los que reciben señales extrínsecas que regulan directamente su comportamiento. Estos microambientes se denominan nichos celulares¹⁰⁸. En general, las poblaciones de células progenitoras adultas suelen localizarse en estado de quiescencia en nichos celulares que mantienen su identidad progenitora y dirigen su respuesta frente a diferentes estímulos externos^{109,110}. El estudio del

nicho en el que residen las células progenitoras ha sido fundamental para su caracterización, así como en el desarrollo de terapias celulares derivadas de ellas.

De hecho, algunas de las poblaciones de progenitores adultos más ampliamente estudiadas se caracterizan por presentar un nicho claramente definido. Las células madre intestinales han sido localizadas en la parte inferior de las criptas del intestino¹¹¹. Las células madre hematopoyéticas (HSC; del inglés *Hematopoietic Stem Cells*) se sitúan en la médula ósea manteniendo una compleja relación con varios tipos celulares que componen el nicho hematopoyético y mostrando una preferencia por localizarse próximas a dos estructuras: el periostio y la vasculatura de la médula¹¹². Las células madre del músculo esquelético (MuSC; del inglés *Muscle Stem Cells*), o células satélite, se sitúan en contacto directo con las fibras musculares, entre su membrana plasmática y la matriz extracelular de su lámina basal; mostrando nuevamente una predisposición a localizarse en la proximidad de los capilares asociados a las fibras musculares¹¹³. Las células madre neurales (NSC; del inglés *Neural Stem Cells*) se encuentran localizadas en áreas concretas del cerebro conocidas como nichos neurogénicos. Estos nichos neurogénicos están compuestos de diferentes tipos celulares pero, en todos los casos, la vasculatura del cerebro desempeña un papel fundamental^{114,115}. El estudio de diferentes tejidos revela que el endotelio, aunque no es un componente excluyente, juega un papel fundamental en la conformación del nicho de varias poblaciones de progenitores adultos.

4.2 Mecanismos implicados en la relación entre progenitores adultos y su nicho vascular

Como se ha resumido anteriormente, varias poblaciones de progenitores adultos se han localizado de forma preferente en posiciones perivasculares^{116, 117, 107}. Numerosos estudios han descrito varias características asociadas al endotelio que regulan diversos mecanismos moleculares en poblaciones de progenitores, favoreciendo su mantenimiento y, por lo tanto, comportándose como su nicho vascular¹¹⁸.

En las EC se ha confirmado la expresión de diferentes moléculas de señalización intercelular yuxtacrina. Estas moléculas permiten la señalización célula-célula entre el endotelio y las células progenitoras que presentan un contacto directo, activando diferentes rutas de señalización. Entre las diferentes moléculas de señalización descritas en las EC, cabría destacar los diferentes ligandos transmembrana (Jag1, Jag2, Dll1, Dll3 y Dll4) y receptores de Notch (Notch1-4)¹¹⁹; así como otras moléculas (EphrinB2/ EphB4) que, además de otras rutas de señalización, también están implicadas en la regulación de la vía de Notch¹²⁰. La relevancia de la ruta de *Notch* es especialmente destacada en la regulación de varios procesos celulares claves en la interacción entre las poblaciones de progenitores adultos y su nicho endotelial¹⁰⁸. Por ejemplo, mediante la activación de la ruta de *Notch*, el nicho endotelial regula directamente los procesos de diferenciación¹²¹ o controla el estado proliferativo las células progenitoras¹²²; manteniéndolas en un estado quiescente que previene la entrada prematura en senescencia.

Se ha confirmado la implicación de la modulación de la ruta de *Notch* por parte del nicho vascular en la regulación de HSC¹²³, MuSC¹²⁴ o NSC¹²⁵.

Por otro lado, la regulación de los niveles de ROS se ha propuesto como un mecanismo determinante del estado de las poblaciones de progenitores, entre ellas las Bmi1-CPC¹⁰³. Se ha podido confirmar que en las zonas próximas a la vasculatura se generan zonas con baja tensión de oxígeno que favorecen el mantenimiento de diferentes progenitores^{126,107}. Las variaciones en los niveles de ROS pueden generar alteraciones en la dinámica celular de las poblaciones de progenitores, desencadenando un agotamiento de la población que entra en un estado de senescencia incompatible con su actividad progenitora¹²⁷. Se ha descrito que las condiciones de bajo estrés oxidativo generadas por el nicho vascular permiten a las células progenitoras mantenerse en quiescencia, controlando sus niveles de estrés oxidativo endógeno y evitando la entrada prematura en senescencia^{128, 129}.

No obstante, al igual que el endotelio es capaz de modular el comportamiento de las células progenitoras y variar su efecto en condiciones de estrés, también se ha descrito el fenómeno inverso. Diferentes poblaciones de progenitores destacan por su actividad paracrina, siendo capaces de liberar numerosos factores que pueden afectar a diversos tipos celulares del tejido en el que residen, entre ellos las EC. Entre estos factores se ha podido destacar el papel de VEGF-A, debido a su acción directa sobre el endotelio. Se ha visto que MuSC o NSC, son capaces de secretar VEGF-A para inducir el crecimiento de la vasculatura en su proximidad y, de esta forma, favorecer la relación de tipo nicho entre ambos tipos celulares^{122,130,131}. La actividad paracrina de las células progenitoras desempeña un papel especialmente importante en condiciones de daño, regulando directamente los procesos de regeneración^{132,133}. En este contexto, cabría destacar el papel de CXCL12, como una quimioquina con una enorme actividad sobre el endotelio¹³⁴ y que presenta un papel especialmente importante en los procesos de revascularización tras daño^{135,136}. Por lo tanto, se ha podido definir en varios modelos que las relaciones entre células progenitoras y su nicho vascular son dinámicas. Las poblaciones de progenitores son capaces de liberar diversos factores que afectan a su nicho endotelial, modulando su comportamiento en función de si existe un estado de homeostasis o algún estrés externo. Estableciéndose, por tanto, una relación bi-direccional (*cross-talk*) que afecta por igual a las células progenitoras y al nicho vascular en el que residen^{122,130}.

Los trabajos previos realizados en nuestro laboratorio por el *Dr. D Herrero et al* postulan una relación de tipo nicho entre las Bmi1-CPC y el endotelio cardíaco. Mostraron que las células Bmi1-CPC presentan una predisposición a localizarse en posiciones perivasculares con bajos niveles de ROS. Además, se pudo demostrar la existencia de una señalización por contacto directo entre las Bmi1-CPC y el endotelio. Esta interacción afecta directamente al comportamiento de las Bmi1-CPC, aumentando la expresión de *Bmi1*, gen definitorio de esta población, y reduciendo su proliferación y sus niveles de ROS intracelular (**Figura 8**). En estudios anteriores se pudo comprobar que la regulación de los niveles de ROS y del estado proliferativo es fundamental para el correcto mantenimiento de las poblaciones de progenitores adultos¹⁰³.

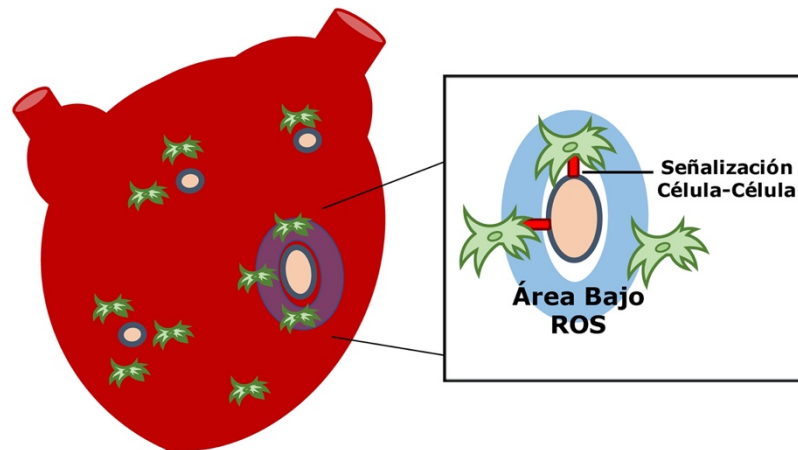


Figura 8. Representación de los antecedentes indicativos de la relación de tipo nicho entre la población Bmi1-CPC y el endotelio cardíaco.

Los resultados previos apuntarían hacia una relación directa entre la población de progenitores Bmi1-CPC y la vasculatura cardíaca. Sin embargo, no se han definido los mecanismos moleculares que participan en esta interacción y si siguen el comportamiento observado en otras poblaciones de progenitores. Durante la presente tesis doctoral trataremos de discernir los principales elementos que median en esta posible interacción.

OBJETIVOS

1. Generación de una línea celular inmortalizada a partir de la población de progenitores cardíacos Bmi1⁺

- 1.1.** Confirmar la eficiencia del protocolo de inmortalización mediante transducción con vectores lentivirales SV40/ TK.
- 1.2.** Confirmar la eficiencia del protocolo de des-inmortalización mediante transducción con vectores adenovirales Cre.

2. Validar las características de la línea inmortalizada de progenitores cardíacos Bmi1⁺

- 2.1.** Confirmar el mantenimiento de las características propias de la población de progenitores cardíacos Bmi1⁺ en la línea inmortalizada derivada.
- 2.2.** Analizar comparativamente la capacidad de respuesta frente a daño oxidativo en la línea inmortalizada de progenitores cardíacos Bmi1⁺.

3. Análisis de los principales mecanismos moleculares implicados en la relación de tipo nicho entre los progenitores cardíacos Bmi1⁺ y el endotelio cardíaco.

- 3.1.** Estudiar los efectos de las células progenitoras cardíacas Bmi1⁺ sobre las células endoteliales.
- 3.2.** Estudiar los mecanismos moleculares implicados en la relación existente entre células endoteliales y células progenitoras cardíacas Bmi1⁺.

MÉTODOS

1. Modelos animales

1.1. Descripción de los modelos animales

Los modelos animales genéticamente modificados utilizados en este trabajo fueron *Bmi1*^{CreERT/+ 95}, *Bmi1*^{GFP/+ 100}, *Rosa26*^{YFP/+} y *Rosa26*^{Tomato/+} (procedentes de Laboratorios Jackson). Todas estas líneas transgénicas fueron establecidas con fondo genético C57BL/6J. A partir de estos modelos se generaron cada una de las líneas transgénicas empleadas en la presente tesis doctoral. La descripción completa de cada una de las líneas y sus aplicaciones dentro de este estudio se especifican en la **Tabla 1**.

Tabla 1: Descripción de los modelos animales empleados y su aplicación experimental.

Genotipo	Descripción	Aplicación Experimental
<i>Bmi1</i>^{GFP/+}	Modelo genéticamente modificado para sustituir un alelo del gen <i>Bmi1</i> por un alelo del gen de la proteína verde fluorescente (GFP; <i>Green Fluorescent Protein</i>). Es utilizado en heterocigosis.	Aislamiento y seguimiento de progenitores cardíacos <i>Bmi1</i> ⁺ haploinsuficientes en base a la expresión de GFP bajo el control de las secuencias reguladoras de <i>Bmi1</i> .
<i>Bmi1</i>^{CreERT/+}	Modelo genéticamente modificado para asociar la expresión de la enzima recombinasa Cre a la expresión del gen <i>Bmi1</i> . Utilizamos la versión de la enzima Cre (CreERT2) que permite controlar su actividad mediante inducción por Tx. El casete se ha insertado en la región 3' no codificante (<i>Knock-In</i>), por lo que la expresión de <i>Bmi1</i> no se ve alterada. Es utilizado en heterocigosis en todos los modelos derivados de él.	Permite la generación de modelos inducibles con Tx dependientes de la expresión del gen <i>Bmi1</i> .
<i>Rosa26</i>^{YFP/+}	Modelo que presenta la expresión de la proteína fluorescente amarilla (YFP; <i>Yellow Fluorescent Protein</i>) bajo el control del promotor constitutivo <i>Rosa26</i> . Presenta un casete STOP que bloquea la expresión de la proteína y que se encuentra flanqueado por las secuencias diana de Cre (LoxP), en repetición directa. En esta conformación, la actividad de Cre elimina las secuencias flanqueadas por sitios LoxP (floxed).	Permite la generación de modelos inducibles con expresión condicional de YFP dependientes de la acción de la recombinasa Cre.

<p><i>Bmi1</i>^{CreERT/+} <i>Rosa26</i>^{YFP/+}</p>	<p>Tras la inducción mediante Tx, la enzima recombinasa Cre presente en las células que expresen <i>Bmi1</i> es activada. La acción de la Cre escinde el casete STOP que bloquea la expresión de la proteína YFP; induciendo la expresión de esta proteína en las células que expresen <i>Bmi1</i> en el momento del tratamiento con Tx y en su descendencia. La expresión de <i>Bmi1</i> endógena no se ve alterada en este modelo.</p>	<p>Aislamiento de progenitores cardíacos <i>Bmi1</i>⁺ y trazado de linaje.</p>
<p><i>Rosa26</i>^{Tomato/+}</p>	<p>Modelo que presenta la expresión de la proteína fluorescente Tomato (tdTomato; <i>Tomato Fluorescent Protein</i>) bajo el control del promotor constitutivo <i>Rosa26</i>. Presenta un casete STOP que bloquea la expresión de la proteína y que se encuentra flanqueado por las secuencias diana de Cre (LoxP), en repetición directa. En esta conformación, la actividad de Cre elimina las secuencias flanqueadas por sitios LoxP (floxed).</p>	<p>Permite la generación de modelos inducibles con expresión condicional de tdTomato dependientes de la acción de la recombinasa Cre.</p>
<p><i>Bmi1</i>^{CreERT/+} <i>Rosa26</i>^{Tomato/+}</p>	<p>Tras la inducción mediante Tx, la enzima recombinasa Cre presente en las células que expresen <i>Bmi1</i> es activada. La acción de la Cre escinde el casete STOP que bloquea la expresión de la proteína tdTomato; induciendo la expresión de esta proteína en las células que expresen <i>Bmi1</i> en el momento del tratamiento con Tx y en su descendencia. La expresión endógena de <i>Bmi1</i> no se ve alterada en este modelo.</p>	<p>Aislamiento de progenitores cardíacos <i>Bmi1</i>⁺ y trazado de linaje. Identificación de células <i>Bmi1</i>⁺ y su progenie dentro del tejido cardíaco mediante el marcaje con la proteína reportera tdTomato</p>

Todos los animales empleados fueron ratones adultos de 3-6 meses de edad. Estudios previos demostraron que no existían diferencias entre animales machos y hembras para los tipos de experimentos realizados, por lo que se emplearon equitativamente, tal como recomienda el *US National Institutes of Health*¹³⁷. Los animales fueron estabulados en las instalaciones del CNB-CSIC con agua y comida *ad-libitum*. Todos los procedimientos realizados a los animales fueron aprobados por el Comité de Ética del CNB-CSIC y la División de Protección Animal de la Comunidad de Madrid (PA 56/11, PROEX 048/16 y PROEX 250.5/20). Cada uno de los procedimientos realizados fueron planteados en base a la Directiva de la EU 2010/63UE y la Recomendación 2007/526/EC para la protección de animales empleados para experimentación y otros propósitos científicos, recogidos en el Real Decreto 1201/2005.

1.2. Procedimientos *in-vivo* aplicados

Para la inducción de la actividad de la recombinasa Cre en las líneas que fuera pertinente se empleó Tx (*Sigma*; Ref. T5648) disuelto en aceite de maíz (*Sigma*; Ref. C8267). Los animales recibieron una dosis intraperitoneal (IP) de 225 µg de Tamoxifen/ g de peso

corporal cada 24 horas durante 3 días. Los animales fueron empleados, fundamentalmente, para los diferentes experimentos 5 días tras finalizar la inducción.

2. Extracción de células primarias

2.1 Progenitores cardíacos $Bmi1^+$ ($Bmi1$ -CPC)

Las $Bmi1$ -CPC fueron extraídas a partir de corazones de ratones de adultos (3-6 meses) de las líneas $Bmi1^{GFP/+}$, $Bmi1^{CreERT/+}Rosa26^{YFP/+}$ y $Bmi1^{CreERT/+}Rosa26^{Tomato/+}$ (**Figura 6; Introducción**).

Para poder aislar las células progenitoras a partir del corazón de dichos animales, se procedió a su perfusión y digestión mediante el método Lagendorff ²⁸ (**Figura 9**). Todo el procedimiento fue realizado bajo las máximas condiciones de esterilidad para evitar posibles contaminaciones.

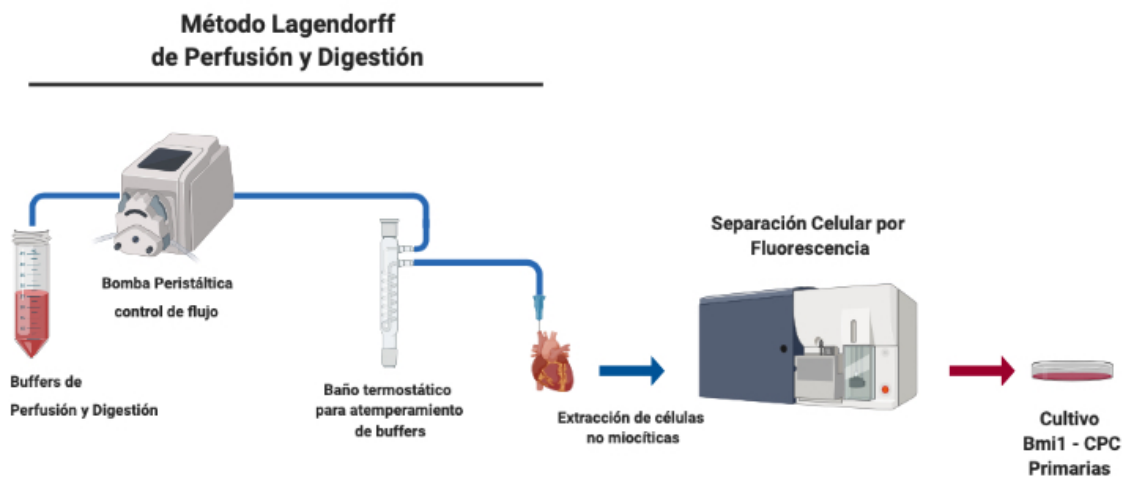


Figura 9. Representación del procedimiento seguido para la obtención de la población $Bmi1$ -CPC en corazones adultos. Se empleó el método Lagendorff de digestión seguido del aislamiento de las $Bmi1$ -CPC marcadas fluorescentemente mediante Separación Celular por Fluorescencia (FACS).

En primer lugar, tras eutanasiar a los animales mediante sobredosis de anestesia (ketamina+xilacina), el corazón fue canulado a través de la arteria aorta, se extrajo y se conectó inmediatamente a un circuito de perfusión asociado a una bomba peristáltica que permite controlar el flujo continuo de líquido para su perfusión y digestión. El circuito de perfusión fue conectado a un baño térmico de flujo constante, de forma que todos los buffers empleados durante el proceso se mantenían atemperados a 37°C, temperatura óptima de acción para las enzimas empleadas.

Tras conectar el corazón al circuito se perfundieron a través de la matriz cardíaca los diferentes *buffers* empleados. Primero se hicieron pasar 7,5 ml del *buffer de perfusión* a una velocidad de flujo de 0,4 ml/ minuto. A continuación, se conectó el *buffer de digestión* a una velocidad de flujo de 0,3 ml/ minuto, durante 10 minutos. En este punto se comprobó que el

corazón se había digerido correctamente observando que su consistencia fuera blanda y gelatinosa. En caso contrario, debemos ampliar el tiempo de digestión hasta que comprobemos que el corazón se encuentra correctamente digerido. Finalmente, retiramos el corazón del circuito de digestión. A partir de este punto todos los procedimientos se realizaron en condiciones de esterilidad dentro de una campana de flujo laminar.

Tras haber completado el proceso de perfusión y digestión enzimática del corazón, se procedió a su disgregación mecánica. El tejido cardíaco fue disgregado mecánicamente haciendo pasar la digestión suavemente a través pipetas de diámetro decreciente (2, 1'5, 1 mm) hasta reducir los fragmentos de tejido al menor tamaño posible. Seguidamente, la digestión resultante se filtró mediante una malla con poros de 0,4 μm , de forma que se eliminaron los fragmentos más grandes del corazón sin digerir. Esta digestión filtrada se mantuvo en un tubo Falcon de 50 ml y se le añadieron 20 ml de *stopping buffer 1*, que permite inhibir la acción de las enzimas de digestión. A continuación, se dejó sedimentar la solución durante 45 minutos. Tras este tiempo, los CM que componen el tejido cardíaco, debido a su gran tamaño, sedimentan en el fondo del tubo. Seguidamente, se retiró el sobrenadante donde se encuentra la fracción no cardiomiocítica del corazón y se reservó a 4°C protegido de la luz. Debido al gran tamaño de los CM, en el primer sedimento se encuentra también una parte significativa de las células de la fracción no cardiomiocítica que han podido ser co-sedimentadas; para recuperar estas células se realiza una segunda sedimentación. El pellet resultante de la primera sedimentación fue resuspendido en 10 ml de *stopping buffer 2* y se dejó sedimentar, de nuevo, durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se recogió el sobrenadante generado y se añadió a la fracción no miocítica recuperada en la primera sedimentación. La composición de los diferentes buffers empleados queda detallada en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Composición de los buffers empleados en el proceso de extracción de las células Bmi1-CPC.

Buffer	Composición
Buffer de perfusión	Disolución en agua destilada de: <ul style="list-style-type: none"> • 113 mM NaCl • 4,7 mM KCl • 1,2 mM MgSO₄ • 5,5 mM glucosa • 0,6 mM KH₂PO₄ • 0,6 mM Na₂HPO₄ • 12 mM NaHCO₃ • 10 mM KHCO₃ • 0,32 mM fenol • 10 mM Hepes • 30 mM de Taurina • 10 mM 2,3 – Butanodiona monóxido • 5,5 mM glucosa monohidrato (*Reactivos procedentes de <i>Sigma-Merck</i>)

Buffer de digestión	<p>Buffer de perfusión suplementado con:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 0'2 mg/ml de Liberasa Blendzime (Roche, Ref. 05401127001) • 0'14 mg/ml de Tripsina (Invitrogen, Ref. 15090046) • 12'5 μM CaCl₂
Stopping Buffer 1	<p>Buffer de perfusión suplementado con:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 10% FBS (Fetal Bovine Serum, TicoEurope; FBSEU500) • 12'5 μM CaCl₂
Stopping Buffer 2	<p>Buffer de perfusión suplementado con:</p> <ul style="list-style-type: none"> • 5% FBS • 12'5 μM CaCl₂

Una vez obtenida la fracción no cardiomiocítica total del corazón, se centrifugó a 450 g durante 5 minutos. Seguidamente, se realizó un lavado para eliminar los restos de los buffers empleados, con *buffer de lavado* (PBS (*Phosphate Buffered Saline*), 5% FBS, 100 UI/ml de Penicilina, 100 μ g/ml de Estreptomina (*Biowest; L0022*)). A continuación, se hizo pasar la suspensión celular obtenida por un filtro de 30 μ m. De esta forma, se eliminaron los posibles agregados celulares que pudieran interferir en la técnica de Separación Celular por Fluorescencia (FACS) que se realizó posteriormente. Esta suspensión celular contenía tanto las Bmi1-CPC, como el resto de células que forman la fracción no cardiomiocítica del corazón.

Se empleó la técnica del FACS para separar nuestra población de progenitores ya que esta técnica nos permite aislar la población de progenitores cardíacos Bmi1⁺ y su linaje celular gracias a la expresión de las diferentes proteínas fluorescentes (GFP, YFP o Tomato) asociadas a la expresión de *Bmi1* en los modelos animales utilizados. Una vez aislada la población Bmi1-CPC, se procedió a su cultivo *in-vitro* según las indicaciones especificadas en el **apartado 3.1**.

2.2 Células Endoteliales Cardíacas

Para la extracción de células endoteliales cardíacas primarias (pCEC) se emplearon ratones silvestres (WT) que no incluyeran ninguna modificación genética. En primer lugar, tras eutanasiar a los animales, los corazones fueron perfundidos con PBS a través de la vena cava para eliminar las células hematopoyéticas circulantes en las cámaras del corazón y que pudieran interferir en el proceso de extracción posterior. A continuación, se extrajo el corazón y se continuó con su digestión.

Para la digestión del corazón, en primer lugar, se disgregó mecánicamente con la ayuda de un bisturí. Una vez el corazón fue disgregado en fragmentos del menor tamaño posible, procedimos con la digestión enzimática. Como medio de digestión para un corazón se empleó 15 ml de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, *Biowest; Ref. L0101*) suplementado con Colagenasa (*Sigma; Ref. C5138*) y Dispasa II (*Roche; Ref. 04 942 076*)

001); ambas a una concentración de 1mg/ ml. Incubamos la digestión del corazón a 37°C durante 45 min en agitación. Tras este periodo de digestión enzimática, homogeneizamos la solución resultante haciéndola pasar por una aguja estéril de 18G. A continuación, se hizo pasar la digestión por un filtro estéril de 70 µm (*Falcon; Ref. 352350*) para eliminar los posibles fragmentos de gran tamaño no digeridos correctamente. Seguidamente, añadimos 15 ml de *medio de aislamiento* (DMEM + 20% FBS + 100 U/ml de penicilina/ 100 µg/ml de Estreptomicina). La suspensión celular resultante fue centrifugada a 400g durante 5 min. Lavamos el pellet celular resultante con *medio de lavado* (PBS + 0,5% BSA (*Bovine Serum Albumin, Sigma; Ref. A7906*)) y recuperamos, de nuevo, las células mediante centrifugación a 300g durante 10 min. Las células obtenidas componen el total de la digestión del corazón a partir de las cuales se procedió al aislamiento de la población endotelial cardíaca.

Una vez obtenida la suspensión celular del corazón, procedimos a la separación de las pCEC mediante separación magnética empleando el kit *MACS Neonatal Cardiac Endothelial Cell Isolation Kit (MACS Miltenyi Biotec; Ref. 130-104-183)* y siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. La población de pCEC, se cultivó *in-vitro* según las indicaciones especificadas en el **apartado 3.2**.

3. Cultivo líneas celulares

A continuación, se relacionan todos los modelos celulares empleados en la presente tesis y las condiciones de cultivo *in-vitro* para cada uno de ellos.

3.1 Bmi1-CPC. Todas las variantes de líneas celulares obtenidas a partir de las Bmi1-CPC de los diferentes modelos animales empleados fueron cultivadas en las mismas condiciones. Estas líneas incluyen:

- **Bmi1-CPC-GFP:** Bmi1-CPC que presentan expresión de la proteína GFP asociada a la expresión de *Bmi1*. Proviene del modelo animal *Bmi1^{GFP/+}* por lo que presentan la sustitución (*Knock-In*) de un alelo del gen *Bmi1*. Al tratarse de cultivos primarios estas células fueron mantenidas hasta un máximo de 9 pases.
- **Bmi1-CPC-YFP:** Bmi1-CPC que presentan expresión de la proteína YFP asociada a la expresión de *Bmi1* y a todas las células de su linaje. Proviene del modelo animal *Bmi1^{CreERT/+}Rosa26^{YFP/+}*. Al tratarse de cultivos primarios estas células fueron mantenidas hasta un máximo de 9 pases.
- **Bmi1-CPC-Tomato:** Bmi1-CPC que presentan expresión de la proteína tdTomato asociada a la expresión de *Bmi1* y a todas las células de su linaje. Proviene del modelo animal *Bmi1^{CreERT/+}Rosa26^{Tomato/+}*. Al tratarse de cultivos primarios estas células fueron mantenidas hasta un máximo de 9 pases.

- **Bmi1-CPC-GFP^{Inm}**: Bmi1-CPC-GFP immortalizadas mediante la transducción de esta línea de progenitores con un vector lentiviral inductor de la expresión del gen de immortalización del *antígeno grande de SV40* (T-SV40).
- **Bmi1-CPC-YFP^{Inm}**: Bmi1-CPC-YFP immortalizadas mediante la transducción de esta línea de progenitores con un vector lentiviral inductor de la expresión del gen de immortalización T-SV40.

Las líneas celulares citadas anteriormente fueron siempre cultivadas en condiciones de cultivo en bajo oxígeno (5% de CO₂, 3% de O₂, 37°C). Estas células fueron sembradas sobre superficies de cultivo que presentan un recubrimiento de Gelatina (*Sigma*; Ref. G1860) 0'1% en PBS. El medio de cultivo celular empleado fue IMDM (*Iscove's Modified Dulbecco's Medium: Gibco*; Ref. 12440-053) suplementado con: 10% FBS, 100 UI/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin, 20 ng/ml FGF (*Fibroblast Growth Factor: Peprotech*; Ref. 100-18B), 10 ng/ml EFG (*Epidermal Growth Factor: Peprotech*; Ref. AF-100-15), 10³ U/ml ESGRO-LIF (*Millipore*; Ref. ESG1107) y 100 µg/ml Normocin (*InvivoGen*; Ref. ant-nr-1).

3.2 pCEC. Estas células fueron cultivadas en condiciones de normoxia (5% de CO₂, 21% de O₂, 37°C) sobre superficies previamente tratadas con gelatina 1% diluida en PBS y suplementada con 100 µg/ mL de fibronectina (*Sigma*; Ref. F1141). El medio de cultivo celular empleado fue *Vasculife® VEGF Endothelial Medium Complete Kit (LiveLine Cell Technology*; Ref. LL003). Estas células pudieron ser mantenidas hasta un máximo de 4 pases al tratarse de cultivos primarios especialmente sensibles.

3.3 1g11. Línea celular murina establecida procedente de células endoteliales pulmonares (línea cedida por el grupo del Dr. Santos Mañez; CNB). Estas células fueron cultivadas en condiciones de normoxia (5% de CO₂, 21% de O₂, 37°C) sobre superficies previamente tratadas con gelatina 1% diluida en PBS. El medio de cultivo celular empleado para su mantenimiento fue DMEM suplementado con: 20% FBS, 100 U/ml penicilina, 100 µg/ml estreptomycin, 2mM L-Glutamina (*Biowest*; Ref. X0550) y 0,1 mg/mL de ECGS (*Endothelial Cell Growth Supplement, Sigma*; Ref. E2759) y heparina (*Sigma*; Ref. H3393). Siempre que dichas células fueron empleadas en un experimento se retiró del medio de cultivo el suplemento con ECGS y heparina.

3.4 MEFs. Poblaciones de fibroblastos embrionarios murinos immortalizados (cedida por el grupo del Prof. Carlos Martínez-A, CNB). Fueron cultivadas en condiciones de normoxia (5% de CO₂, 21% de O₂, 37°C) de forma adherente, en superficies de cultivos no tapizadas a-posteriori. El medio de cultivo celular empleado fue DMEM suplementado con: 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomycin y 2mM de L-Glutamina.

3.5 HL-1. Línea celular murina establecida procedente de CM (línea cedida por el grupo del Dr. Santos Mañez). Fueron cultivadas en condiciones de normoxia (5% de CO₂, 21% de O₂, 37°C) en superficies de cultivos previamente tratadas con Gelatina 0,1% diluida en PBS y suplementada con 1 mg/ml de fibronectina. El medio de cultivo celular empleado fue medio Claycomb (*Sigma, Ref. 51800C*), suplementado con: 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de Estreptomicina y 2mM de L-Glutamina.

4. Generación de una línea celular inmortalizada y reversible de progenitores cardíacos Bmi1⁺

Para generar las líneas inmortalizadas de progenitores cardíacos Bmi1⁺ con las que trabajamos, Bmi1-CPC-YFP^{Inm} y Bmi1-CPC-GFP^{Inm}, se emplearon los modelos animales *Bmi1*^{GFP/+} y *Bmi1*^{CreERT/+} *Rosa26*^{YFP/+}, respectivamente, para obtener los cultivos primarios que fueron transducidos con el vector viral de inmortalización.

4.1. Inmortalización: Transducción de las Bmi1-CPC con vector lentiviral LoxP-SV40 T-Large – TK- LoxP

Para llevar a acabo la **inmortalización** celular, las Bmi1-CPC fueron transducidas con un vector lentiviral de 3ª generación (LoxP- SV40 T-Large-Ires – TK- LoxP) que expresa tanto el gen de inmortalización T-SV40 como el gen de selección negativa Timidina Quinasa (TK). Los lotes de vectores lentivirales se obtuvieron a partir del plásmido pLOX-Ttag-iresTK¹³⁸ (Addgene #12246) por el servicio de vectores lentivirales del *Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC)*. Se emplearon células HEK 293T para obtener lotes de vectores lentivirales, pseudotipados con la proteína de la envuelta de VSV-G (proteína “G” del virus de estomatitis vesicular (VSV)) y con alto título, siguiendo el método de co-transfección de alta seguridad (vector pLOX-Ttag-iresTK + vector VSV-G (pMD2.G; *Addgene #12259*) + vector Pax2 (psPax2; *Addgene #12260*)) (Lipofectamina 3000; *Invitrogen, Ref. L3000*). La concentración de los lotes lentivirales fue titulada mediante PCR cuantitativa (qPCR) (siguiendo el método de curva estándar sobre los genomas virales).

Antes de la infección con el vector lentiviral de inmortalización, expandimos los cultivos primarios de Bmi1-CPC durante 5 pases. En este punto, pudimos disponer de células en un estado y número adecuado para poder testar las diferentes condiciones de inmortalización planteadas. Antes de proceder a la transducción, sembramos los Bmi1-CPC en placas de 6 pocillos a una confluencia del 80% (7000 células/cm²). Esperamos 24 horas a que las células se adhirieran correctamente y procedimos a la transducción con diferentes concentraciones del vector lentiviral. Teniendo en cuenta las células sembradas, calculamos los números de multiplicidad de infección (MOI) con los que tratamos las Bmi1-CPC. Testamos diferentes condiciones de transducción que incluyeron un MOI del vector lentiviral de 1, 2, 5 y 10 partículas infectivas por cada célula en cultivo. Esta transducción se realizó en medio OPTIMEM (*Gibco, Ref. 31985-070*), al cual se le añadió polibreno (*Sigma, Ref. TR-1003*) 8 µM y el

volumen del preparado lentiviral necesario para alcanzar los diferentes MOIs a testar en cada una de las condiciones. Las células fueron mantenidas en las condiciones anteriormente expuestas para Bmi1-CPC durante 24 horas con el medio de transducción. Posteriormente, se retiró dicho medio y se sustituyó por medio de cultivo estandar durante 24 horas adicionales para permitir la recuperación de las células. Finalmente, las células se mantuvieron en cultivo en condiciones estándar, mediante pases consecutivos cada 3 días antes de llegar a la confluencia. El procedimiento seguido para la infección lentiviral de los cultivos primarios de Bmi1-CPC se representa en la **Figura 11 (Resultados, 1.1)**. Tras su transducción con el vector lentiviral las células Bmi1-CPC inmortalizadas se denominaron Bmi1-CPC-YFP^{Inm}/GFP^{Inm}.

4.2. Des-inmortalización: Infección de las Bmi1-CPC^{Inm} con vector adenoviral Cre y selección mediante Ganciclovir

Para evaluar la estrategia de **des-inmortalización** planteada se empleó un vector adenoviral inductor de la expresión transitoria de la recombinasa Cre. Dicho vector fue facilitado por el servicio de vectores lentivirales del CNIC. Para su producción se emplearon, de nuevo, células HEK293T y los vectores obtenidos fueron purificados con el kit de *Adeno X-Purification Kit* (Clontech; Ref. 632249). La concentración de los vectores virales fue titulada utilizando el kit *Adeno X-TM-rapid titer Kit* (Clontech; Ref. 632250).

Transdujimos las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} con un vector adenoviral que indujo la expresión de la enzima recombinasa Cre, delecionando la secuencia de los genes T-SV40/TK, flanqueadas por secuencias LoxP. Las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} manipuladas tras la expresión de Cre se denominaron Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev}. Antes de proceder a la transducción con los vectores adenovirales, sembramos las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} en placas de 6 pocillos a una confluencia del 80% (7000 células/cm²). Esperamos 24 horas para que las células se adhirieran correctamente y procedimos a la transducción con diferentes concentraciones de vector adenoviral. En este caso evaluamos condiciones con un MOI de vector de 100, 200 y 500 partículas infectivas por cada célula en cultivo. Esta transducción se realizó de igual forma que en el caso de los vectores lentivirales, en medio OPTIMEM al cual se le añadió polibreno 8 µM y el volumen del lote de vector adenoviral necesario para alcanzar los diferentes MOIs. Las células fueron incubadas durante 72 horas con este medio de transducción, y tras un lavado, se sustituyó por medio de cultivo estándar para Bmi1-CPC durante 24 horas adicionales de recuperación. A continuación, los cultivos tratados con los vectores adenovirales se resebraron a 7000 células/cm². Después de 24 horas en las que las células se adhirieron a la superficie de cultivo, se procedió a la selección negativa de las células que no habían perdido el inserto de inmortalización. Asociada a la secuencia del SV40 se encuentra la expresión del gen de selección de la *Timidina Quinasa (TK)*. La expresión de esta enzima permite la selección negativa mediante tratamiento con *Ganciclovir (GCV)* (*InvivoGen*; Ref. SUD-GCV) 1 µM sobre el medio de cultivo de las Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} durante 7 días. El proceso que se siguió para la reversión de la inmortalización y la posterior selección se representa en la **Figura 17 (Resultados, 1.2)**.

4.3 Monitorización del estado del inserto con PCR

Analizamos la presencia del casete de inmortalización en el DNA genómico de las Bmi1 CPC-GFP^{Inm} como parte del proceso de validación de la transducción lentiviral. Para ello, extrajimos el DNA total de las células mediante el kit de extracción *NucleoSpin Tissue* (Macherey-Nagel; Ref. 740952). Realizamos una reacción de PCR sobre el DNA genómico de las células inmortalizadas para la detección del gen de inmortalización SV40. Para la amplificación, utilizamos los mismos *primers* empleados en la detección de dicho gen mediante RT-qPCR (**Tabla Suplementaria 1**).

La reacción de PCR se llevó a cabo en un termobloque *Applied Biosystems Veriti 96 well* (*Applied Biosystems*), con el siguiente programa: 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C y 30 segundos a 72°C, y 7 minutos finales a 72°C. Para el análisis de los resultados, visualizamos la amplificación cargando el resultado de la PCR en un gel de agarosa (*Condalab*; Ref. 8010.22) al 1,5% teñido con Bromuro de Etidio (*Sigma*, Ref. E1610). Las bandas diagnóstico fueron confirmadas mediante marcadores de tamaño adecuados (1Kb DNA Plus Ladder; *ThermoFisher*, Ref. 10787018).

4.4 Evaluación de mejoras en las condiciones de cultivo

Tratamos de mejorar la supervivencia y la capacidad de proliferación de las Bmi1 CPC-YFP^{Inm-Rev} tras el proceso de reversión de la inmortalización mediante dos estrategias, la optimización del medio de cultivo y la inhibición de rutas de senescencia celular.

4.4.1 Optimización del medio de cultivo para Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev}

Además de los factores ya empleados en el medio de cultivo establecido para las Bmi1 CPC, se emplearon varios factores adicionales para la optimización del mismo para las Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev}. Dichos factores e inhibidores y sus dianas de acción se detallan en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Factores para cultivo de células progenitoras empleados en los medios de cultivo testados para mejorar las condiciones de cultivo de las Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev}.

Factores	Actividad	Publicaciones previas	Referencia comercial
CHIR99021	<i>Inhibidor de Gsk3</i>	139, 140, 141	<i>Sigma; SML1046</i>
PD184352	<i>Inhibidor de Mek</i>	141, 142	<i>Sigma; PZ0162</i>
SU5402	<i>Inhibidor de varios receptores asociados a tirosina quinasa. Presenta actividad frente a VEGFR2, FGFR1 y PDGFRβ</i>	140, 142	<i>Sigma; SML0443</i>

BMP4	<i>Activador de receptores BMP (Bone Morphogenic Proteins) heteroméricos tipo I y II</i>	140, 143	<i>Sigma; H4916</i>
Activina A	<i>Activador TGFβRII / ruta señalización SMAD</i>	140, 144	<i>Sigma; SRP6153</i>
N2	<i>Suplemento multiproteico empleado para el mantenimiento de células madre embrionarias en medios de cultivo libres de suero</i>	140, 143	<i>Gibco; 17502-048</i>
B27	<i>Suplemento multiproteico empleado para el mantenimiento de células madre embrionarias en medios de cultivo libres de suero</i>	140, 143	<i>Gibco; 17504-044</i>

Los medios empleados junto con los factores que incluyen y sus concentraciones se recoge en la **Tabla 4**. Las rutas de señalización afectadas por estos inhibidores están representadas en la **Figura 21 (Resultados, 1.4.1)**.

Tabla 4: Composición de los medios de cultivo testados para la optimización de las condiciones de mantenimiento de las Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev}.

Factores	LIF 10 ³ U/mL	FBS	EGF 10 ng/ml	FGF 20 ng/ml	CHIR 99021 3 μ M	PD 184352 3 μ M	SU 5402 2 μ M	BMP4 (5 ng/ml) +ActivinA (10ng/ml) +N2+B27
Medio								
Bmi1CPC	+	+	+	+				
Lalit et al.	+	+			+			
Zhang et al.					+		+	+
2i		+			+	+		
2i + LIF	+	+			+	+		
2ia + LIF	+	+			+		+	

Mantuvimos los cultivos de Bmi1-CPC con los diferentes medios testados durante 72h y evaluamos sus efectos sobre la expresión de *Bmi1*.

4.4.2 Inhibidores de rutas de senescencia implicadas en fenotipo secretor asociado a senescencia

Adicionalmente, testamos el efecto de varios inhibidores de rutas de señalización que participan en la activación del fenotipo secretor asociado a senescencia (SASP; *Senescence-Associate Secretary Phenotype*). Las rutas de señalización afectadas quedan reflejadas en la **Figura 23 (Resultados, 1.4.2)**. Los inhibidores empleados y sus concentraciones de uso se recogen en la **Tabla 5**.

Tabla 5: Inhibidores de rutas de señalización implicadas en la activación del fenotipo SASP.

Inhibidores	Concentración de uso	Diana	Publicaciones previas	Referencia comercial
Rapamicina	20 nM	<i>mTOR</i>	145	<i>Sigma; R0395</i>
Pik75	1 μ M	<i>PI3-Quinasa p110$\alpha\beta$</i>	146, 147	<i>Selleckchem; S1205</i>
TGX221	40 nM	<i>PI3-Quinasa p110β</i>	146, 147	<i>Selleckchem; S1169</i>
SB203580	10 μ M	<i>p38 MAP-Quinasa</i>	148	<i>Selleckchem; Ref. S1076</i>
BIRB796	2,5 μ M	<i>p38 MAP-Quinasa</i>	148	<i>Selleckchem; S1574</i>
JAK 2 Inhibitor	40 μ M	<i>JAK2</i>	149	<i>Cal Biochem, 420132</i>
Y27632	0,02 mM	<i>ROCK1 (p160ROCK)</i>	150	<i>Selleckchem; Ref. S1049</i>

Los tratamientos con los diferentes inhibidores se llevaron a cabo tras realizar el proceso de des-inmortalización; desde el momento que las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} tratadas con el vector adenoviral fueron resembradas para la selección y durante el proceso de selección negativa mediante GCV.

5. Análisis de la expresión de marcadores de membrana mediante citometría de flujo

Como parte de la validación de la línea inmortalizada de Bmi1-CPC-YFP^{Inm}, realizamos mediante citometría de flujo un perfil de expresión para algunos de los marcadores de membrana que caracterizan a la población de Bmi1-CPC²⁸.

Las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} fueron amplificadas en cultivo hasta tener 10⁶ células para cada marcaje realizado. Las células fueron tripsinizadas y se realizaron 2 lavados con PBS. A continuación, se bloquearon las posibles dianas inespecíficas mediante una hora de incubación de las células en suspensión a temperatura ambiente con PBS + 5%BSA. Pasado el tiempo de bloqueo, se incubaron las suspensiones celulares con cada uno de los anticuerpos primarios frente a los marcadores de membrana que deseamos analizar. El marcaje se aplicó durante una hora a temperatura ambiente en rotación suave para evitar la precipitación de las células. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS + 5%BSA y, seguidamente, el marcaje con los anticuerpos secundarios en las mismas condiciones que el marcaje primario. Los anticuerpos conjugados con fluorocromos que fueron empleados únicamente requirieron un paso de marcaje. Los anticuerpos empleados y sus concentraciones de uso están recogidos en la **Tabla Suplementaria 2 (Anexos)**. Por último, se procedió a la detección de las células marcadas fluorescentemente mediante el citómetro de flujo *Gallios Flow Cytometer (Beckmann Coulter)*. Los resultados fueron analizados mediante el software de análisis *Kaluza Analysis Software (Beckmann Coulter)*.

6. Evaluación del estado proliferativo

6.1. Evaluación de la progresión de la tasa de duplicación poblacional de las líneas celulares inmortalizadas

Cuantificamos la tasa de duplicación poblacional en paralelo en todos los tratamientos de inmortalización para las Bmi1-CPC que comparamos. Para ello, todos los cultivos fueron resembrados al mismo tiempo y en cada pase se sembró el mismo número de células. Los pases se realizaron cada 3 días y se resembraron 7000 células/ cm². En caso de que no se alcanzara este número mínimo de células entre un pase y el siguiente, se sembraron el total de las células presentes en cada condición; considerándose ese número de células sembradas para el cálculo de la tasa de duplicación en el siguiente pase. Para calcular el parámetro de la tasa de duplicación poblacional empleamos la siguiente fórmula:

$$\text{Tasa de duplicación poblacional} = \frac{\log(N^{\circ} \text{ de células recuento}) - \log(N^{\circ} \text{ de células sembradas})}{\log 2}$$

Las células fueron mantenidas en cultivo el máximo tiempo posible, dado que las células control y las no inmortalizadas eficazmente entraron en una fase estacionaria en la que existía una mínima o nula proliferación celular.

6.2. Evaluación del estado proliferativo celular mediante incorporación de EdU

Para evaluar el estado proliferativo en diferentes poblaciones celulares empleamos el marcaje mediante EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine). Incubamos las células que deseamos analizar durante 12h en medio de cultivo estandar suplementado con EdU 10μM. Tras el periodo de cultivo, recuperamos las células y se realizó el marcaje para células proliferativas *Click-iT EdU Alexa Fluor 647 Flow Cytometry (Invitrogen; C10424)* siguiendo las instrucciones

del fabricante. Finalmente, se procedió a la detección de las células marcadas fluorescentemente dentro de cada población mediante el citómetro de flujo *Gallios Flow Cytometer* (*Beckmann Coulter*). Los resultados fueron analizados mediante el software de análisis *Kaluza Analysis Software* (*Beckmann Coulter*).

7. Análisis de la senescencia celular mediante marcaje por β -galactosidasa

Para evaluar los efectos de los tratamientos sobre la inducción del fenotipo SASP tras la des-inmortalización, se realizó la tinción frente a células en estado de senescencia basada en la actividad de la β -galactosidasa. Se utilizó el kit comercial *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* (*Cells Signaling Technology, Ref. 98605*), mediante el cual se tiñen de forma específica las células que presenten un estado senescente. Dicha tinción, se llevó a cabo siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Para determinar el número de células senescentes por campo se tomaron imágenes con el microscopio Olympus IX70 (*Olympus*) y se cuantificaron las células marcadas con el software *ImageJ* (*National Institutes of Health, EEUU*).

8. Ensayos de respuesta frente a proteínas recombinantes

Analizamos los efectos de la estimulación de las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} con diferentes proteínas recombinantes en la expresión de *Bmi1*¹⁰⁷. Por un lado, cultivamos las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} en medio de cultivo suplementado con 10 ng/ml de VEGF-A (*R&D Systems, Ref. 493-MV*) durante 12h. Igualmente, cultivamos dichas células durante 12h en superficies de cultivos tapizadas con gelatina 0,1%, suplementada con 5 μ g/ml de EphrinB2-Fc (*R&D Systems; Ref. 496-EB*) o EphB4-Fc (*R&D Systems; Ref. 446-B4*) induciendo de esta forma el contacto directo de nuestras células con estas proteínas recombinantes. Seguidamente, extrajimos el RNA total y analizamos los niveles de expresión de *Bmi1* por RT-qPCR empleando los primers mostrados en la **Tabla Suplementaria 1 (Anexos)**.

9. Identificación de factores de angiogénesis en el medio condicionado de las Bmi1-CPC

Para el análisis del secretoma de la población Bmi1-CPC realizamos un *array* de proteínas centrado en factores de angiogénesis (*Mouse Angiogenesis Array Kit, RyD Systems; Ref. ARY015*). El medio condicionado procedente de diferentes modelos de Bmi1-CPC (Bmi1-CPC-Tomato vs Bmi1-CPC-YFP^{Inm}), en condiciones de homeostasis o daño oxidativo, fue analizado mediante el *array* expuesto anteriormente y siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

Para la generación del medio condicionado de las Bmi1-CPC partimos de una placa de cultivo p100 al 90% de confluencia. Lavamos los posibles factores presentes en el medio de

cultivo con PBS y añadimos 5 ml de medio IMDM simple o en condiciones de daño oxidativo (IMDM + 5 mM de Paraquat (PQ) (*Sigma; Ref. 36541*)). Mantuvimos las células en cultivo sobre dicho medio durante 12 horas para la generación del medio condicionado. Pasado este tiempo, recogimos el medio condicionado y centrifugamos para eliminar los posibles restos celulares. Concentramos el medio obtenido hasta un volumen final de 2 ml usando *Centricon 30000 MWCO* (*Millipore; YM-30*) y procedimos a la realización del *array* siguiendo las indicaciones del fabricante.

10. Ensayos de migración en transwell

Se realizaron ensayos de migración en *transwell* para evaluar la capacidad de los factores liberados por las Bmi1-CPC de inducir la repuesta migratoria sobre células endoteliales 1g11. Se emplearon *transwell* de 8 μm de tamaño de poro (*Transwell® Permeable Supports 8 μm Polycarbonate Membrane, Costar; Ref. 3422*), para permitir la migración de las 1g11 a través de ellos.

En la parte superior de los *transwell*, pre-tratados durante 1h con gelatina 1% en PBS, se sembraron 50000 células el día previo a realizar el ensayo de migración. De esta forma, en el momento de comenzar los ensayos de migración, las células habrían alcanzado un estado de confluencia en monocapa similar a la estructura presente en la vasculatura. Antes de iniciar los ensayos de migración, sembramos en la parte inferior del *transwell* las células cuya capacidad de quimioatracción frente a endotelio queremos testar. Las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} o los MEFs fueron sembradas en medio sin suplementos y cultivadas durante 12h para generar el medio condicionado que contuviera las biomoléculas secretadas por cada tipo celular. Tras generar el medio condicionado, se desplazaron los *transwell* con las células 1g11 en monocapa a los pocillos con el medio condicionado de las diferentes células atrayentes a evaluar. Una vez pasado el tiempo de migración deseado, retiramos los *transwell* y cuantificamos las células que migraron a la parte inferior mediante la tinción con cristal violeta detallada el protocolo empleado por *Justus, R et al*¹⁴². Finalmente, tomamos imágenes de las membranas con un microscopio *Leitz DMRB* (*Leica*) y cuantificamos las células que migraron a través de los *transwell* en cada una de las condiciones.

11. Ensayos de angiogénesis en Matrigel

Adicionalmente, realizamos ensayos de angiogénesis con las células 1g11 sobre *Matrigel®* (*Corning; Ref. 356234*). Estos ensayos se realizaron en placas de 96 pocillos en las que se añadieron 50 μL de *Matrigel®*. Una vez solidificado, sembramos las células 1g11 sobre él a una concentración de 50000 células por cm^2 . Las células se incubaron durante 12 horas en los medios propios de las diferentes condiciones que deseábamos evaluar. Como control negativo se empleó medio IMDM simple. Como control positivo se empleó medio IMDM suplementado con 2% FBS, 3 ng/ml de EGF (*Peprotech; Ref. AF-100-15*) y 5 ng/ml de VEGFA (*R&D Systems, Ref. 493-MV*). Como muestras problema se analizó el efecto del medio condicionado generado tras 12h de cultivo por las Bmi1 CPC-YFP^{Inm}, Bmi1 CPC-Tomato y MEFs

como control celular externo; todas ellas en condiciones de homeostasis y daño oxidativo (IMDM + 5 mM PQ).

Se tomaron imágenes de la evolución del proceso de angiogénesis tras 12h de incubación con los diferentes medios. Los parámetros indicadores fueron evaluados con el software *ImageJ* (*National Institutes of Health*, EEUU) y la herramienta de análisis *Angiogenesis Analyzer For ImageJ* by Giles Carpenter.

12. Co-cultivos directos

Evaluamos los efectos del contacto directo entre las Bmi1-CPC y otros tipos celulares presentes en el corazón mediante co-cultivo directo. Para ello, en primer lugar, tratamos la superficie de cultivo con gelatina (0,1 o 1% dependiendo de la concentración más alta requerida por las células empleadas en el co-cultivo) y suplementada con fibronectina en los co-cultivos con HL-1 (1 mg/ml) y pCEC (100 µg/ml) durante 1h. Posteriormente, sembramos el primer tipo celular (HL-1, MEFs, 1g11 o pCEC) en su medio de cultivo. Tras 8h, comprobamos que estas células se habían adherido correctamente, retiramos su medio de cultivo, realizamos un lavado con PBS y sembramos sobre ellas las Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Mantuvimos los co-cultivos usando el medio específico de las Bmi1-CPC durante 12h adicionales y sobre este tipo de co-cultivos realizamos los siguientes análisis:

12.1. Análisis de los efectos del co-cultivo sobre la expresión génica.

Analizamos la expresión génica en co-cultivos de las células Bmi1-CPC-YFP^{IMM} con pCEC o 1g11. En primer lugar, separamos los distintos tipos celulares presentes en cada co-cultivo. Para ello, tripsinizamos las células y las separamos mediante FACS. Esta técnica nos permitió separar las células Bmi1-CPC-YFP^{IMM} marcadas fluorescentemente (YFP⁺) de las negativas sin ningún tipo de marcaje (1g11 o pCEC). Una vez recuperadas las distintas fracciones, extrajimos el RNA total y analizamos las variaciones de expresión respecto a los cultivos simples de cada tipo celular mediante RT-qPCR.

12.2. Cuantificación de la muerte celular inducida por daño oxidativo con Paraquat

Analizamos el efecto de los co-cultivos sobre la supervivencia de los distintos tipos celulares estudiados frente a la exposición a daño oxidativo severo. En primer lugar, sembramos las células endoteliales, HL-1 o MEFs. A continuación, sembramos sobre ellas las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} marcadas con *Violet Tracer* (*ThermoFisher*; Ref. C34557A) a una concentración de 5µM sobre una dilución de 1 millón de células/ml durante 20 minutos. Los co-cultivos obtenidos se mantuvieron durante 8h en medio de cultivo estándar para Bmi1-CPC, permitiendo que estas células se adhirieran correctamente. A continuación, se reemplazó este medio por IMDM simple suplementado con PQ 5 o 8mM para la inducción de daño oxidativo; manteniéndose en estas condiciones durante 12h. Finalmente, se procedió a la detección de las células apoptóticas marcadas con yoduro de propidio (PI) o DAPI dentro de cada población

(Violet-/ Bmi1-CPC-YFP^{Inm}-Violet+) mediante el citómetro de flujo *Gallios Flow Cytometer* (*Beckmann Coulter*). Los resultados fueron analizados mediante el software de análisis *Kaluza Analysis Software* (*Beckmann Coulter*).

13. Extracción de RNA total, reacción de PCR-transcriptasa reversa y RT-qPCR

Las muestras de partida sobre las que analizamos la expresión génica fueron cultivos celulares alcanzando aproximadamente un 90% de confluencia. Tras realizar los diferentes tratamientos de interés, extrajimos el RNA total y analizamos las variaciones en la expresión de diferentes genes de interés respecto a un control intra-experimental sin tratar.

Después de lavar con PBS y tripsinizar las células, procedimos a la extracción del RNA total. El RNA total fue extraído mediante el kit de extracción *Direct-zolTM RNA Miniprep* (*Zymo Research, Ref. R2052*), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante para la extracción a partir de extractos celulares.

13.1. Reacción de la transcriptasa reversa

Tras realizar la extracción del RNA total, cuantificamos su concentración usando un NanoDrop modelo ND-1000 *spectrophotometer* (*Nanodrop Technologies*) y procedimos a la obtención del cDNA mediante transcripción reversa usando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (*Applied Biosystems, Ref. 4368814*). La reacción de transcripción reversa se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante y se empleó un termociclador *Applied Biosystems Veriti 96 well* (*Applied Biosystems*).

13.2. Análisis de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en Tiempo Real (RT-qPCR)

Para el estudio de las variaciones en la expresión de genes de interés analizamos los niveles de RNA total mediante el método de RT-qPCR, utilizando SYBR Green. Las reacciones de RT-qPCR se realizaron en placas *MicroAmpTM Optical 384-Well Reactions Plate with Barcode* (*Applied Biosystems; Ref. 4309849*). Para la reacción se utilizó *Power SYBR Green PCR Master Mix* (*Applied Biosystems, Ref. 4367659*) y el equipo empleado fue un *QuantStudio5* (*Applied Biosystems*). Las parejas de primers para todos los genes analizados se presentan en la **Tabla Suplementaria 1 (Anexos)**. Las condiciones de la reacción de RT-qPCR fueron: 2 minutos a 50°C, 10 minutos a 95°C, 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 60 segundos a 60°C y un paso final (1 min 95°C, 1 min 60°C) para la curva de disociación.

La cuantificación de la expresión relativa para cada gen fue calculada usando el software *Expression Suite* (*Thermo Fisher Scientific Inc.*). Para esta cuantificación se emplearon los valores de C_T generados por el equipo de RT-qPCR, que captura el incremento de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación. Estos valores fueron relativizados

respecto a un gen de control endógeno incluido en cada muestra (*GusB*) para, de esta forma, calcular los valores de C_T relativos para cada gen; ΔC_T .

14. Western Blot

Las muestras de proteínas fueron extraídas a partir de cultivos celulares mediante buffer de extracción RIPA (1mM EDTA, 0,25% deoxicolato de sodio, 50mM Trizma, 150 mM NaCl y 0,1% Triton-X100 (*Sigma*)) suplementado con inhibidores de proteasas *Complete Tablets Easy Pack* (*Roche*; Ref.04693116001). Tras realizar la extracción, se procedió a la cuantificación de la cantidad de proteínas presentes en cada muestra con el kit *Biorad DC Protein Assay* (*Biorad*; Ref. 500-0113) y empleando un espectrofotómetro *Multiskan Go* (*ThermoFisher Scientific*) para las lecturas de absorbancia.

Una vez conocida la cantidad de proteína presente en las muestras, se procedió a su separación según su peso molecular mediante electroforesis en *SDS-PAGE*. Se emplearon geles formados por una sección de concentración con acrilamida al 3% y una segunda parte de resolución con acrilamida al 10%. Las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF *iBlot® Gel Transfer Stacks PVDF Mini* (*Invitrogen*; IB401002) mediante un equipo de transferencia eléctrica en seco *iBlot®* (*Invitrogen*).

Tras la transferencia, se realizó un lavado con agua destilada y se bloqueó la membrana con leche en polvo al 5% durante una hora a temperatura ambiente. A continuación, se incubó la membrana con los diferentes anticuerpos primarios y secundarios empleados a la dilución indicada en la **Tabla Suplementaria 2 (Anexos)**. Todos los anticuerpos fueron diluidos en PBS con 1% de BSA. Tras las incubaciones con cada anticuerpo la membrana se lavó tres veces con TBS (*Tris Buffered Saline*)-Tween 0'01% para eliminar los posibles restos. Finalmente, se incubó la membrana con líquido revelador HPRT (*Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) (*Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents*; Ref. RPN2209) y se procedió a su revelado.

15. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el software *Prism 7* (*GraphPad*). Para el estudio de datos compuestos por un número de muestras experimentales mayor de 15 ($n > 15$) se analizó la distribución considerándose una distribución normal cuando $p \geq 0.05$. En el análisis de experimentos compuestos por dos condiciones de empleo el test *Mann-Whitney U-Test*. Para experimentos en los que se analizaron múltiples condiciones se empleó el test de *Kruskal-Wallis* seguido de *Dunn's post-test* en el caso de muestras con distribución no paramétricas o el test *One-way ANOVA* seguido de *Bonferroni post-test* en el caso de comparaciones con distribución paramétricas. Se consideraron diferencias significativas en los experimentos que presentaban un *p-valor* menor de 0,05 ($*p < 0,05$, $**p < 0,01$, $***p < 0,001$).

RESULTADOS

CAPÍTULO 1

Generación de una línea inmortalizada de forma reversible a partir de las células Bmi1-CPC

1.1. La transducción con vectores lentivirales T-SV40/TK permite la inmortalización de la población Bmi1-CPC.

El estudio previo de la población Bmi1-CPC y su papel en la homeostasis del corazón y en la respuesta frente a daño cardíaco se ha basado en el trabajo sobre modelos *in-vivo* o en cultivos celulares primarios^{28,105,103,101,107}. Esto supone grandes limitaciones experimentales asociadas a los obstáculos que implica el trabajo con estos modelos. Por esta razón, nos propusimos la generación de una línea celular inmortalizada derivada de la población Bmi1-CPC, con el objetivo de usar esta herramienta para poder avanzar en el estudio de dicha población de progenitores cardíacos. Esta estrategia ha sido empleada previamente en poblaciones similares a la nuestra de forma exitosa, consiguiendo desarrollar líneas celulares estables que han sido de gran ayuda en el estudio de diferentes poblaciones de progenitores adultos^{151,152,153}.

En nuestro caso, tratamos de generar una línea celular mediante **inmortalización reversible** basada en la inducción de la expresión del gen de inmortalización "*large T antigen of Simian Virus 40*" (T-SV40). La estrategia de inmortalización reversible que planteamos se basa en dos tratamientos consecutivos e independientes, de inmortalización y des-inmortalización. En primer lugar, inmortalizamos nuestros cultivos celulares primarios de Bmi1-CPC mediante la inducción de la expresión estable del gen T-SV40. Para ello, generamos un vector lentiviral de 3ª generación (LoxP-T-SV40-Ires-TK-LoxP) que expresa tanto el gen de inmortalización (T-SV40) como el gen de selección negativa de la timidina quinasa (TK). La transducción con dicho vector lentiviral nos permitió insertar el casete diseñado para la inmortalización celular de forma estable en el genoma de nuestras células Bmi1-CPC (Bmi1-CPC^{Inm}). Dicho vector fue generado a partir del plásmido desarrollado y empleado con éxito en la inmortalización de células hepáticas humanas por *P. Salmon et al*¹³⁸. El esquema de la evolución de la secuencia del vector empleado durante el proceso de inmortalización-des-inmortalización se representa en la **Figura 10**.

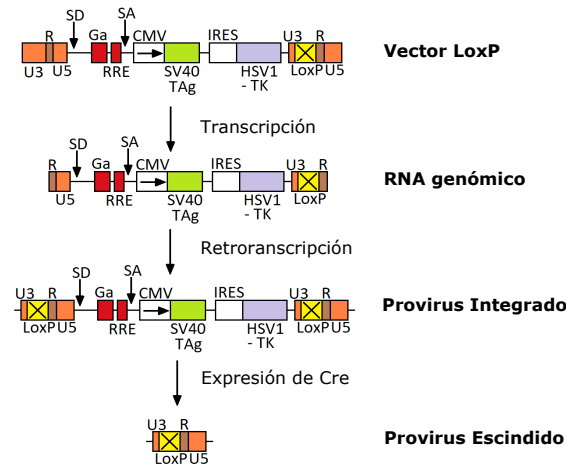


Figura 10: Representación del vector de inmortalización T-SV40/TK empleado en la generación de la línea Bmi1-CPC-YFP^{Imm}. Esquema de la secuencia del vector en las diferentes etapas del proceso de inmortalización reversible; vector lentiviral de inmortalización (Vector LoxP), RNA tras la infección viral (RNA genómico), secuencia integrada en el genoma celular (Provirus integrado) y secuencia tras la reversión de la inmortalización mediante la inducción de la expresión de la recombinasa Cre (Provirus escindido). Modificación del esquema publicado por P. Salmon *et al*; 2000¹³⁸.

El primer paso en la generación de una línea celular establecida a partir de la población Bmi1-CPC fue transducir los cultivos primarios de estos progenitores con el vector lentiviral de inmortalización (LoxP-TSV40-Ires-TK-LoxP). El procedimiento que se siguió para la transducción lentiviral se representa en la **Figura 11**.

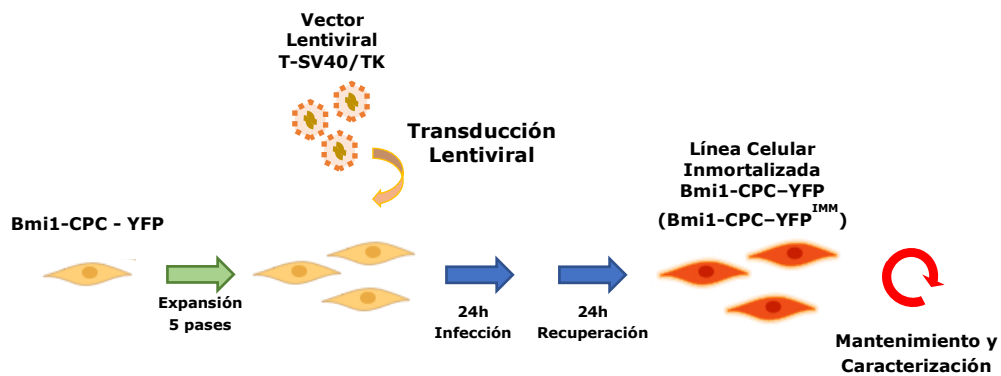


Figura 11: Esquema del procedimiento seguido para la generación de las líneas Bmi1-CPC^{Imm} mediante la transducción del vector lentiviral T-SV40/TK.

Tratamos de generar en paralelo dos líneas inmortalizadas que presentasen expresión diferencial del gen Bmi1, definitorio de nuestra población de progenitores. Para ello, partimos de cultivos primarios derivados de dos modelos animales diferentes. Por un lado, obtuvimos la población Bmi1-CPC del modelo *Bmi1*^{CreERT/+}*Rosa26*^{YFP/+} (**Figura 12A**) para obtener una línea celular sin alteraciones en la expresión de *Bmi1*. Paralelamente, empleamos las células Bmi1-CPC procedentes del modelo *Bmi1*^{GFP/+} (**Figura 13A**) para obtener una línea celular con expresión haploinsuficiente de *Bmi1* (*Bmi1*^{+/-}).

Resultados

Dentro de los parámetros estudiados para confirmar la efectividad del proceso de inmortalización, en primer lugar, analizamos la capacidad de proliferación de los cultivos de Bmi1-CPC en los diferentes tratamientos. Para ello, elaboramos una curva de proliferación en la que representamos la evolución de la tasa de duplicación poblacional acumulada¹⁵⁴ de las dos líneas celulares generadas. De esta forma, representamos la capacidad de proliferación de las poblaciones Bmi1-CPC tras su transducción con los diferentes MOIs de vector lentiviral analizados. Cuantificamos la tasa de duplicación acumulada en paralelo para todos los tratamientos con diferentes MOIs de vector lentiviral (1, 2, 5 y 10 partículas infectivas/ célula) empleados para las dos líneas de células Bmi1-CPC; Bmi1-CPC-YFP y Bmi1-CPC-GFP.

En las células Bmi1-CPC-YFP pudimos observar que, mientras el resto de los tratamientos analizados presentaban una tasa de duplicación lineal, las células tratadas con un MOI10 desarrollaron un crecimiento exponencial; mostrando una proliferación significativamente mayor que el resto de tratamientos y que las células control sin inmortalizar (**Figura 12B**). El aumento en la proliferación celular observado en las células Bmi1-CPC-YFP tratadas con MOI10 se interpretó como el primer indicador de que la inmortalización celular en dichas condiciones había sido efectiva.

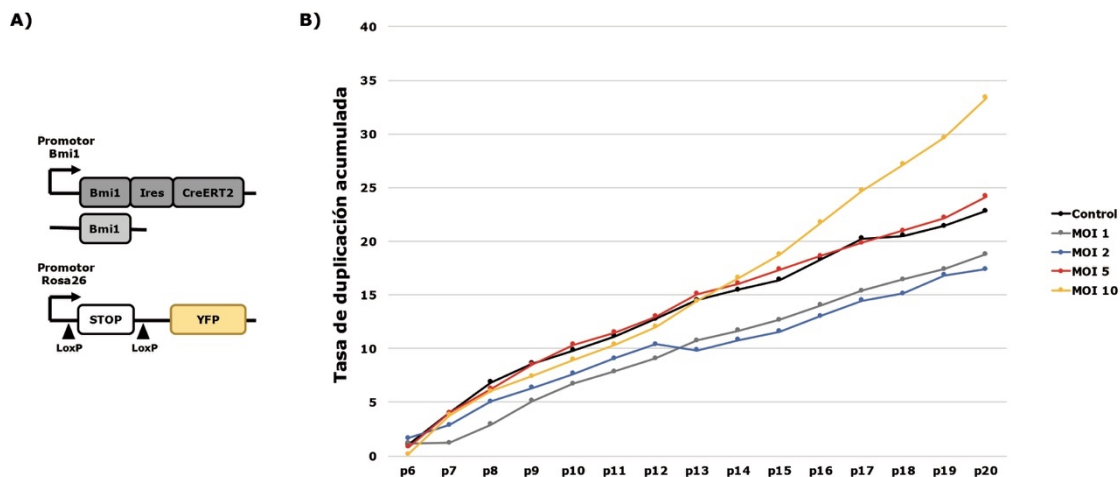


Figura 12: La transducción con el vector lentiviral T-SV40/TK a MOI10 genera un crecimiento exponencial en los cultivos de Bmi1-CPC-YFP. **A)** Representación esquemática del modelo animal $Bmi1^{CreERT2/+} Rosa26^{YFP/+}$ empleado para la extracción de las células Bmi1-CPC-YFP. **B)** Representación de la progresión de la tasa de duplicación poblacional acumulada (Eje Y) tras los sucesivos pases (p; Eje X) por las Bmi1-CPC-YFP tratadas con los diferentes MOIs indicados.

Sin embargo, en ninguno de los tratamientos con diferentes MOIs empleados sobre las células Bmi1-CPC-GFP se pudo observar un aumento en la proliferación celular (**Figura 13B**). La tasa de duplicación lineal observada en todas las condiciones es indicativa de una fase de crecimiento estacionario en los cultivos de Bmi1-CPC-GFP analizados.

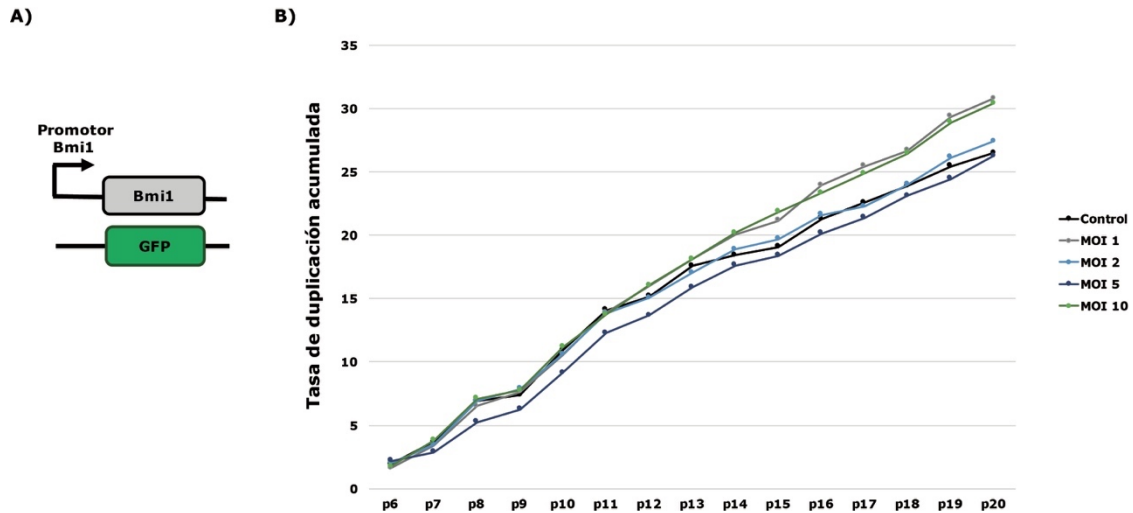


Figura 13: La transducción con vector lentiviral T-SV40/TK no genera un crecimiento exponencial en los cultivos de Bmi1-CPC-GFP. **A)** Representación esquemática del modelo animal *Bmi1*^{GFP/+} empleado para la extracción de las células Bmi1-CPC-GFP **B)** Representación de la progresión de la tasa de duplicación poblacional acumulada (Eje Y) tras los sucesivos pases (p; Eje X) por las Bmi1-CPC-GFP transducidas con los diferentes MOIs indicados.

Para confirmar si el constructo de inmortalización se había insertado efectivamente en las células inmortalizadas, evaluamos la expresión mediante RT-qPCR de los genes presentes en el vector de inmortalización; T-SV40 y TK. Analizamos la expresión de *Bmi1* en los diferentes tratamientos de inmortalización para confirmar que este proceso no estaba afectando a la expresión del gen definitorio de nuestra población de progenitores (**Figura 14**). Pudimos observar que, como era esperado, las células Bmi1-CPC-YFP presentaban aproximadamente el doble de expresión de *Bmi1* que las células Bmi1-CPC-GFP haploinsuficientes (*Bmi1*^{+/-}). La expresión de *Bmi1* no se vio afectada en ninguno de los tratamientos de inmortalización. Sin embargo, pudimos detectar un aumento en la expresión de T-SV40 y TK en las células Bmi1-CPC-YFP transducidas con MOI5 y MOI10 y únicamente en el tratamiento con el MOI10 para el modelo Bmi1-CPC-GFP. No obstante, comparando los tratamientos con MOI10 en ambos modelos celulares, los niveles de expresión de los genes de inmortalización alcanzados por las células Bmi1-CPC-YFP fueron mucho mayores que los observados en las células Bmi1-CPC-GFP.

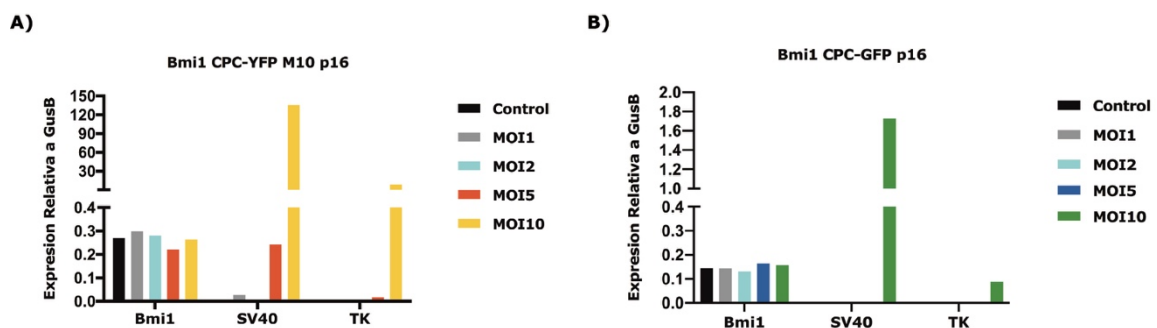


Figura 14: La transducción con el vector lentiviral de inmortalización induce la expresión de SV40 y TK en las células Bmi1-CPC sin afectar a la expresión de *Bmi1*. **A)** RT-qPCR comparativa de la expresión de T-SV40 y TK relativa a *GusB* en las Bmi1-CPC-YFP tratadas con los diferentes MOIs evaluados. **B)** RT-qPCR comparativa de la expresión de T-SV40 y TK relativa a *GusB* en las Bmi1-CPC-GFP tratadas con los diferentes MOIs evaluados.

Resultados

Tratamos de confirmar si el procedimiento de immortalización había sido efectivo evaluando los niveles de expresión de T-SV40 a nivel proteico. En el modelo Bmi1-CPC-YFP pudimos demostrar la expresión de T-SV40 en las células transducidas con MOI5 y MOI10, alcanzándose niveles de expresión mayores en estas últimas (**Figura 15A**). Sin embargo, en las células Bmi1-CPC-GFP únicamente pudimos detectar una baja expresión en las células tratadas con MOI10 (**Figura 15B**). Si comparamos la expresión de T-SV40 en ambos modelos, observamos que los niveles de expresión obtenidos en las células Bmi1-CPC-GFP fueron mínimos (**Figura 15C**).

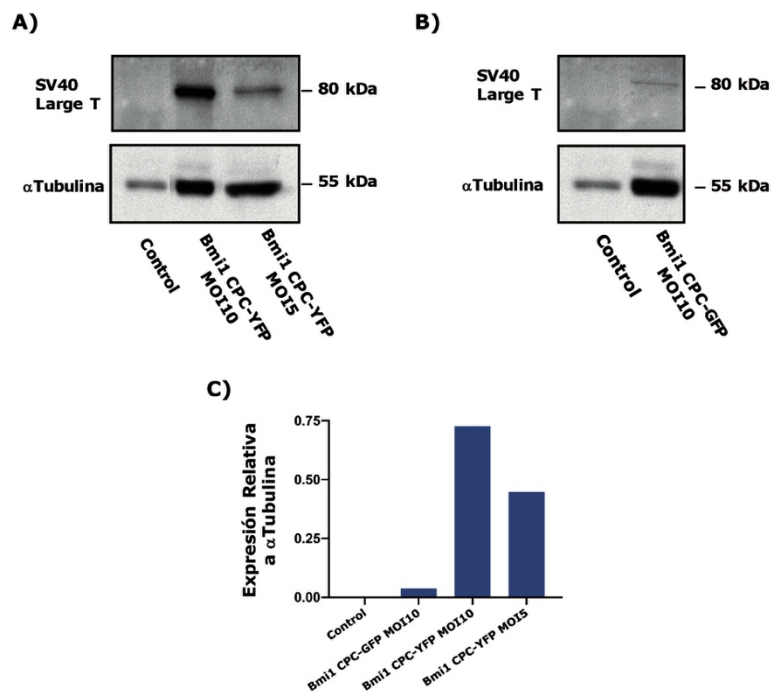


Figura 15: La transducción con el vector lentiviral de immortalización induce una expresión elevada de la proteína T-SV40 únicamente en las Bmi1-CPC-YFP. A) Western Blot representativo de la expresión de la proteína T-SV40 en las Bmi1-CPC-YFP transducidas con MOI 5 y 10. **B)** Western Blot representativo de la expresión de la proteína T-SV40 en las Bmi1-CPC-GFP transducidas con MOI 10. **C)** Representación de los niveles de expresión de la proteína T-SV40 relativos a α Tubulina como control de carga.

Los resultados observados en la línea Bmi1-CPC-YFP transducidas con un MOI10 de vector lentiviral apuntaban a que este modelo había sido immortalizado de forma efectiva. Sin embargo, los resultados obtenidos en el modelo Bmi1-CPC-GFP no se correspondían con una transducción efectiva del vector lentiviral de immortalización.

Para confirmar el efecto de la transducción lentiviral sobre el modelo Bmi1-CPC-GFP, estudiamos la progresión de la expresión de los genes de immortalización durante los sucesivos pases realizados para el mantenimiento de dichas células (**Figura 16**). Nos centramos en las células tratadas con un MOI10 (Bmi1-CPC-GFP MOI10), ya que fueron las únicas en las que se detectó la expresión de T-SV40 a nivel de RNA y proteína. Pudimos observar que las células Bmi1-CPC-GFP MOI10 a pase 13 presentaban unos niveles de expresión de *T-SV40* y *TK* significativamente mayores que los observados en las células Bmi1-CPC-GFP sin transducir. Sin embargo, los niveles de expresión de ambos genes se reducían significativamente y de

forma progresiva tras los sucesivos pases (**Figura 16A**). Adicionalmente, analizamos la presencia del gen T-SV40 en estas células mediante PCR sobre DNA genómico. Observamos que, de igual forma, la cantidad de T-SV40 en el DNA genómico de las Bmi1-CPC-GFP MOI10 se reducía de forma progresiva con los sucesivos pases, hasta no ser detectable en el pase 16 (**Figura 16B**).

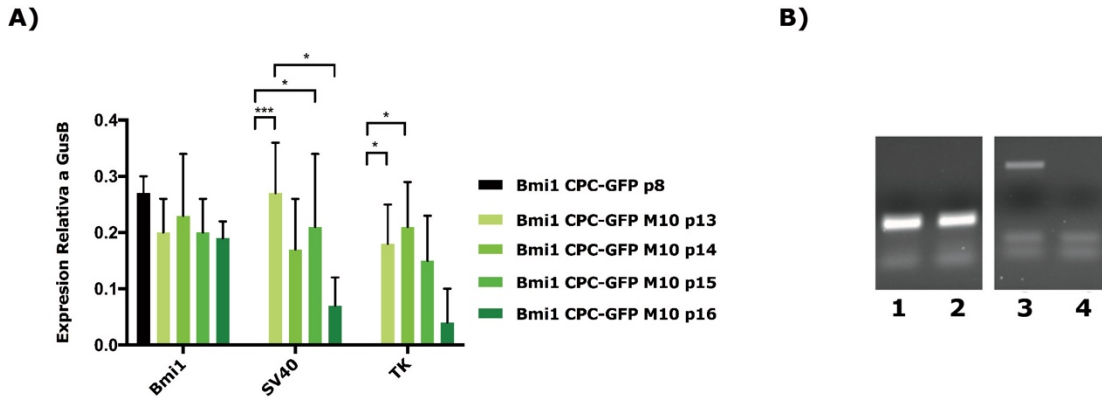


Figura 16: Las células Bmi1-CPC-GFP transducidas con el vector lentiviral de inmortalización a MOI10 pierden de forma progresiva la expresión del vector. A) RT-qPCR comparativa de la expresión de *SV40* y *TK*, relativa a *GusB*, en las Bmi1-CPC-GFP^{Inm} tras sucesivos pases. Las barras de error indican la SD derivada de la media de tres réplicas experimentales del proceso de inmortalización sobre la población Bmi1-CPC-GFP. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$; Two-Way ANOVA Bonferroni post-Test **B)** Imagen representativa del fragmento de DNA genómico amplificado para el gen de T-SV40 en las Bmi1-CPC-GFP^{Inm} de pase 13 (1), 14 (2), 15 (3) y 16 (4, no detectable).

Los resultados obtenidos parecen indicar que el constructo de inmortalización transducido por el vector lentiviral se pierde progresivamente del genoma de las células Bmi1-CPC-GFP, por lo que no fue posible la inmortalización efectiva de este modelo. Sin embargo, el modelo Bmi1-CPC-YFP sí pudo ser inmortalizado con éxito (Bmi1-CPC-YFP^{Inm}). Este modelo será empleado en los siguientes experimentos planteados en la presente tesis doctoral.

1.2. La transducción con vectores adenovirales Cre permite revertir la inmortalización de las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm}.

La estrategia de inmortalización reversible que planteamos para nuestra línea inmortalizada de células Bmi1-CPC se centra en un segundo procedimiento de **des-inmortalización**, independiente de la transducción lentiviral, y basada en la acción de la recombinasa Cre. Para evaluar la estrategia de des-inmortalización planteada se empleó un vector adenoviral que induce la expresión transitoria de la enzima recombinasa Cre. En el vector de inmortalización empleado, el casete inmortalizador queda flanqueado por dos sitios de recombinación LoxP en repetición directa. Por lo tanto, tras la inducción de la expresión de Cre, las células deberían delecionar el inserto de inmortalización, recuperando el contenido genómico de la población inicial. Además, bajo el control del mismo promotor que regula la expresión del T-SV40, y dentro del casete flanqueado por sitios LoxP, se encuentra el gen de selección negativa de la Timidín Kinasa (*TK*). La presencia de este gen nos permitirá la selección negativa mediante Ganciclovir (GCV) de las células que no hayan escindido efectivamente el provirus integrado en su genoma tras el proceso de des-inmortalización. El

GCV es un compuesto antirretroviral análogo a la 2' – Desoxiguanosina trifosfato (dGTP) que por sí solo no es dañino para las células animales. Sin embargo, por la actividad de la TK, el GCV se convierte en una forma bioactiva que ocasiona la parada de la replicación del material genético celular, lo que conlleva la muerte de las células en división. La expresión de la TK únicamente se mantiene en las células que conservan el inserto tras llevarse a cabo la des-inmortalización, seleccionándose las células des-inmortalizadas¹³⁸. El proceso que se siguió para la reversión de la inmortalización y la posterior selección se representa en la **Figura 17**.

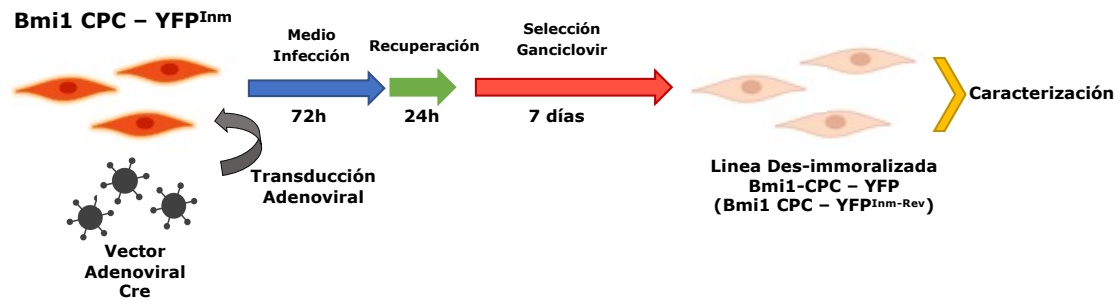


Figura 17: Esquema del procedimiento seguido para des-inmortalización de las líneas Bmi1-CPC^{Inm-Rev} mediante la transducción con un vector adenoviral inductor de la expresión de la recombinasa Cre.

Para confirmar si el casete de inmortalización se había escindido eficazmente del genoma de las células des-inmortalizadas, evaluamos la expresión mediante RT-qPCR y Western Blot de los genes presentes en el vector de inmortalización. Nuevamente, testamos diferentes MOIs de vector adenoviral (100, 200 y 500 partículas infectivas/célula) para tratar de encontrar las condiciones óptimas para el proceso de des-inmortalización. Pudimos observar que la expresión de *Bmi1* se mantenía estable en los distintos tratamientos. Sin embargo, se observaba una disminución progresiva de la expresión de los genes de inmortalización y selección negativa (T-SV40 y TK, respectivamente) según aumentábamos la concentración de vector adenoviral utilizada (**Figura 18A**). Observamos el mismo efecto a nivel proteico (**Figura 18B**), confirmándose una baja expresión de T-SV40 en las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} tratadas con el MOI200, que se volvía indetectable tras el proceso de selección con GCV.

Los resultados anteriores reflejaron una escisión correcta del casete de inmortalización tras el tratamiento con el vector adenoviral Cre y una selección efectiva tras el tratamiento con GCV, por lo que la estrategia de des-inmortalización planteada inicialmente parece ser efectiva. Sin embargo, pudimos observar que la integridad de las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} des-inmortalizadas (Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev}) se veía seriamente afectada tras el proceso de des-inmortalización. Estas células presentaban alteraciones importantes en su morfología y una drástica parada de la proliferación celular (**Figura 18C**), siendo imposible su mantenimiento en cultivo.

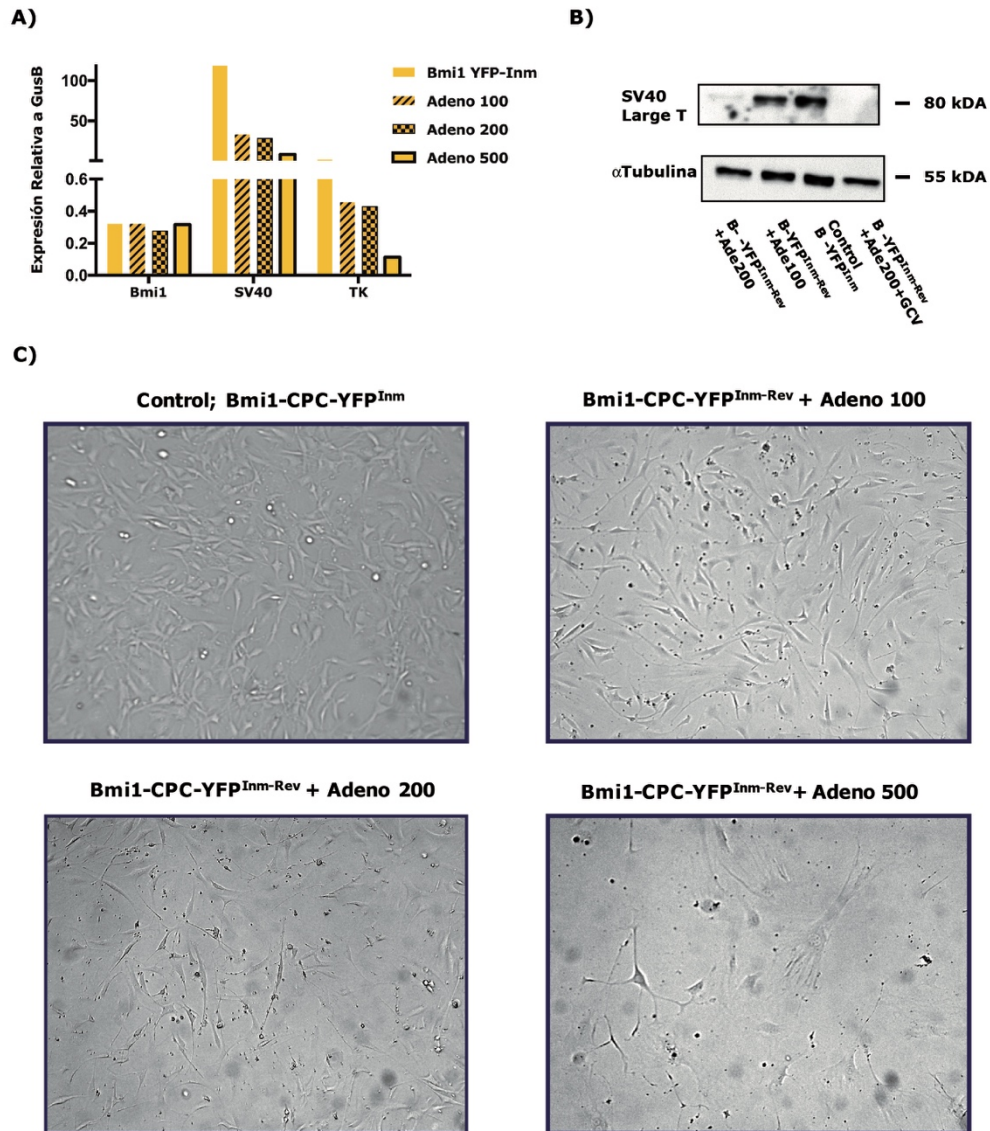


Figura 18: El tratamiento con el vector adenoviral Cre revierte efectivamente la expresión de los genes de immortalización y selección negativa en las Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev}. **A)** RT-qPCR comparativa de la expresión de *T-SV40* y *TK*, relativa a *GusB*, en las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} tratadas en el proceso de des-immortalización con diferentes MOIs de vector adenoviral Cre. **B)** *Western Blot* representativo de la expresión de la proteína T-SV40 en las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} transducidas en el proceso de des-immortalización con diferentes MOIs de vector adenoviral Cre y tras la selección negativa con GCV. **C)** Imágenes representativas de la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} tras el proceso de des-immortalización utilizando diferentes MOIs de vector adenoviral Cre.

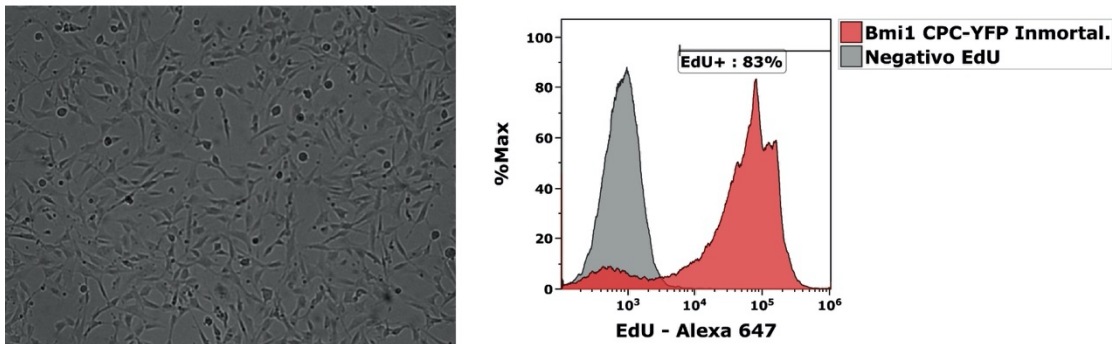
Las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} tratadas con el vector adenoviral Cre con MOI200 presentaban una depleción del constructo de immortalización eficiente generando el menor daño, en base a las alteraciones morfológicas observadas. Por lo tanto, seleccionamos este tratamiento para los siguientes experimentos realizados sobre las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} des-immortalizadas (Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev}).

1.3. La des-inmortalización de las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} induce un bloqueo proliferativo y promueve la entrada senescencia

Analizamos los posibles efectos asociados al procedimiento de des-inmortalización celular que podrían estar afectando a nuestra línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev}, haciendo imposible su mantenimiento.

En primer lugar, analizamos el estado proliferativo de la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} mediante incorporación de EdU durante 12h (**Figura 19**). Comprobamos que, mientras las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} presentaban un alto índice de proliferación (83% de células proliferativas-EdU+) (**Figura 19A**), las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} mostraban una proliferación casi nula (1,5% de células proliferativas-EdU+) (**Figura 19B**).

A)



B)

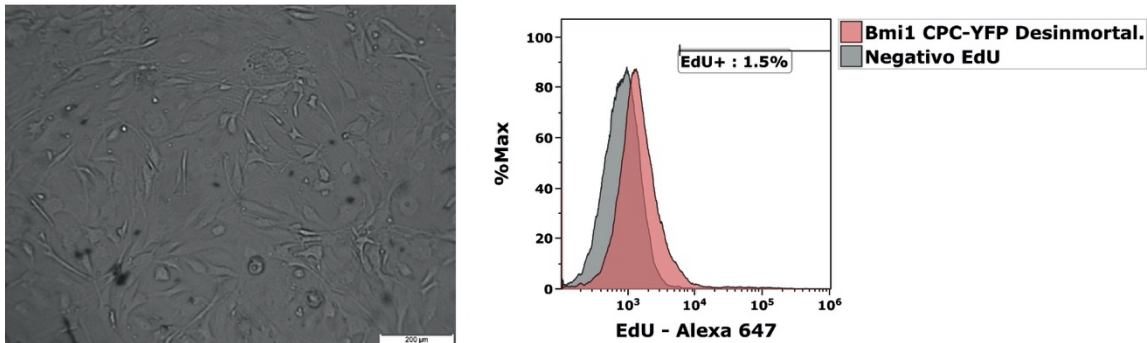


Figura 19: Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} pierden su capacidad proliferativa tras el proceso de des-inmortalización. A) Izquierda; Imagen representativa tomada con campo claro de la línea celular Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. **Derecha;** Cuantificación del porcentaje de células proliferativas en la línea celular Bmi1-CPC-YFP^{Inm} mediante la incorporación de EdU durante 12h. **B) Izquierda;** Imagen representativa tomada con campo claro de la población celular Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev}. **Derecha;** Cuantificación del porcentaje de células proliferativas en la línea celular Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} mediante la incorporación de EdU durante 12h.

Además, la morfología observada en las Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} parecía indicar una entrada repentina en senescencia¹⁵⁵. Realizamos una tinción de β -galactosidasa para células senescentes y, tomando imágenes de los cultivos tras el proceso de des-inmortalización, cuantificamos el porcentaje de células senescentes por campo. Comparamos las células senescentes (β -galactosidasa⁺) presentes en los cultivos de células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} (**Figura**

Resultados

20A; Izquierda) y Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} (**Figura 20A; Derecha**). Pudimos confirmar que, mientras las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} presentaban un porcentaje bajo de células senescentes (2% β -galactosidasa⁺), los cultivos de células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} mostraban un porcentaje mayoritario de células senescentes (69,5% β -galactosidasa⁺) (**Figura 20B**).

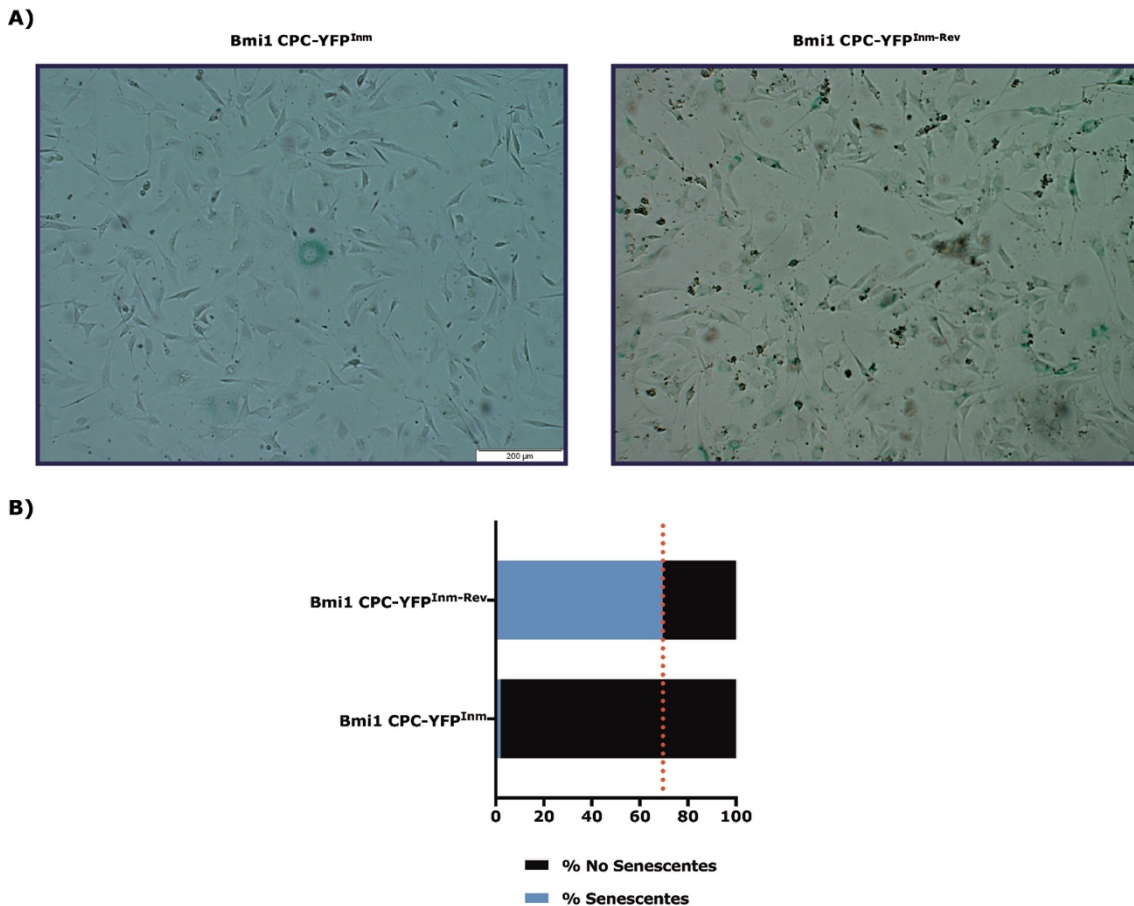


Figura 20: Las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} entran repentinamente en senescencia tras el proceso de des-inmortalización. A) Imágenes representativas de la tinción basada en β -galactosidasa para células senescentes (color azul). *Izquierda*, células Bmi1-CPC-YFP^{Inm}; *Derecha*, células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev}. **B)** Representación del porcentaje de células senescentes observadas por campo en cada uno de los tipos celulares analizados; Bmi1-CPC-YFP^{Inm} y Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev}.

La parada casi total en la proliferación de la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev}, asociada a una entrada generalizada en senescencia, hizo muy difícil el mantenimiento *in-vitro* de estas células. Es por ello que decidimos testar diferentes condiciones de cultivo para tratar de revertir los efectos adversos asociados al proceso de des-inmortalización y mejorar la viabilidad de esta línea celular.

1.4. Optimización de las condiciones de cultivo empleadas para el mantenimiento de la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev}

Los efectos adversos sobre la proliferación y la entrada en senescencia asociados a la reversión de la inmortalización de líneas celulares se han descrito previamente en otros modelos^{151,156}. Sin embargo, existen diferentes técnicas aplicadas con éxito para mejorar las condiciones de mantenimiento de cultivos celulares similares a nuestro modelo¹⁵⁷. Tratamos

de mejorar la capacidad de proliferación y la supervivencia de la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} mediante dos estrategias.

1.4.1. Los medios de cultivo alternativos testados para las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} no mejoraron su capacidad proliferativa

Para que las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} fueran capaces de tolerar el estrés que supone el proceso de des-inmortalización, tratamos de mejorar las condiciones del medio de cultivo empleado en su mantenimiento. Se testaron varios inhibidores o activadores de diferentes rutas de señalización empleados con éxito en la mejora de las condiciones de mantenimiento de otros modelos de células progenitoras^{139,140,141}. La composición de los medios de cultivos evaluados se indica en la **Tabla 4 (Materiales y Métodos, 4.4.1)**. Los factores empleados en estos medios y las rutas de señalización a las que afectan se representan en la **Figura 21**.

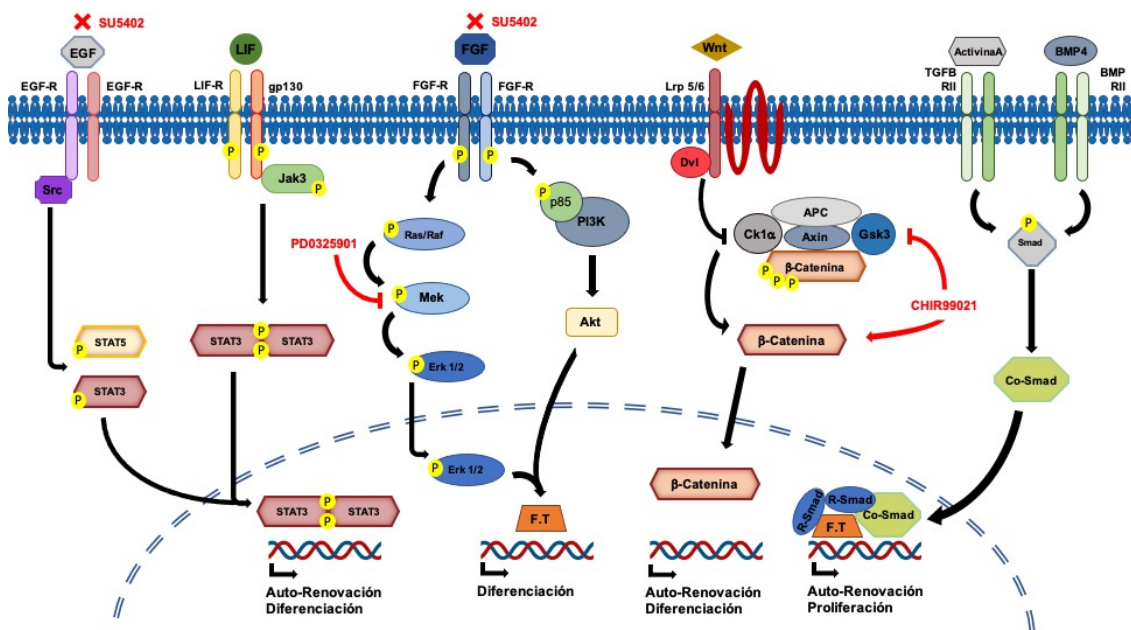


Figura 21: Esquema de las rutas de señalización en las que intervienen los factores testados en los medios de cultivo alternativos para la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Modificación del esquema publicado en por X. Zhou et al.¹⁵⁸.

Como aproximación inicial para evaluar los efectos de los diferentes medios de cultivos testados sobre las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm}, estudiamos las variaciones en los niveles de expresión de *Bmi1* tras mantener nuestras células en cultivo con estos medios durante 72h. Empleamos los niveles de expresión de *Bmi1* como indicador del estado de nuestros cultivos celulares, al ser el gen cuya expresión caracteriza a la población Bmi1-CPC y se ha relacionado directamente con el mantenimiento de estas células en un estado proliferativo y no diferenciado¹⁰³.

Comprobamos que ninguno de los medios de cultivo analizados indujo un aumento significativo en los niveles de expresión de *Bmi1* (**Figura 22A**). Las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm}

podieron ser mantenidas en dichos medios durante un máximo de 72h, ya que tras ese periodo detenían su proliferación, adquiriendo una morfología similar a la observada en los cultivos de células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} (*Imágenes no mostradas*; células no viables). Analizamos el estado proliferativo de las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} cultivadas durante 72 horas en el medio LIF+2i (**Figura 22B**), ya que presentaban el mayor aumento en *Bmi1* observado entre los diferentes medios testados. El marcaje con EdU durante 12h reveló que la fracción de células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} proliferativas (EdU⁺) era mínimo (1,92%), reduciéndose de forma drástica al modificarse las condiciones de cultivo estándar empleadas en el mantenimiento de las Bmi1-CPC-YFP^{Inm}.

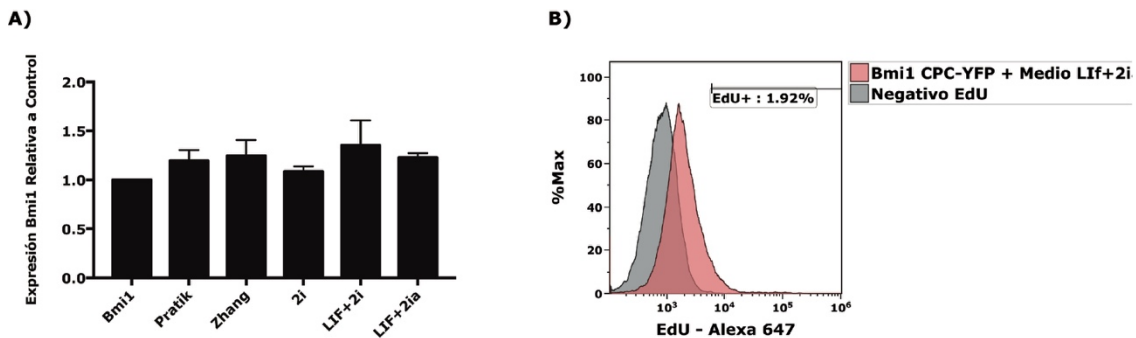


Figura 22: Los medios de cultivo alternativos testados no suponen una mejora significativa para las condiciones de cultivo de las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. **A)** Representación de la expresión de *Bmi1* relativa al control en células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} mantenidas en condiciones estándar tras su cultivo en los diferentes medios testados. Las barras de error indican la SD derivada de la media de tres réplicas experimentales. **B)** Histograma indicativo de las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} proliferativas/ EdU-Alexa647+ tras el mantenimiento durante 72h con el medio LIF+2i.

Todos los medios de cultivo testados como candidatos para la optimización de las condiciones de mantenimiento de las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} promovieron un bloqueo en la proliferación celular. Por lo tanto, descartamos esta aproximación para mejorar las condiciones del proceso de des-inmortalización.

1.4.2. La aplicación de inhibidores de rutas de señalización potencialmente implicadas en el SASP no redujo significativamente la entrada en senescencia de las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev}

La entrada generalizada en senescencia de una población celular es un mecanismo definido como respuesta frente a diferentes tipos de estrés, como en nuestro caso, el proceso de des-inmortalización¹⁵⁷. Este fenómeno se asocia a la activación del SASP, que supone la entrada en senescencia de las células y la liberación de citoquinas que extienden este efecto en las células próximas. Para mejorar los resultados del proceso de des-inmortalización, planteamos la inhibición de varias rutas de señalización implicadas en SASP¹⁵⁹. Los inhibidores empleados y sus dianas se indican en la **Tabla 5 (Materiales y Métodos, 4.4.2)**. Las rutas de señalización afectadas por dichos inhibidores se representan en la **Figura 23**.

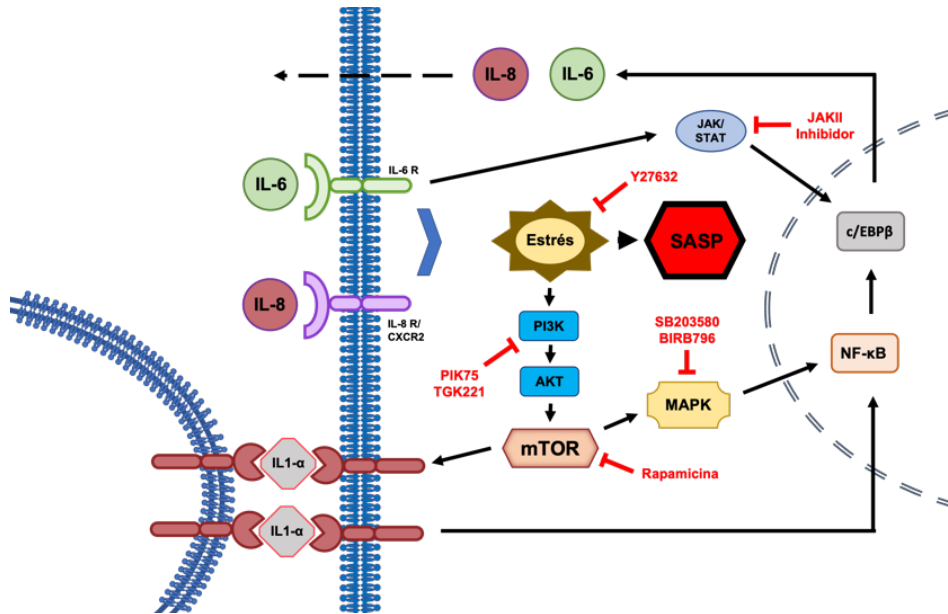


Figura 23: Esquema de las dianas de los inhibidores usados para modificar las diferentes rutas de señalización implicadas en la activación del SASP. Modificación del esquema publicado por A. Soto-Gamez et al¹⁵⁹.

Tratamos las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} con los diferentes inhibidores de rutas implicadas en el SASP tras la transducción con el vector adenoviral Cre (MOI200) y mantuvimos el tratamiento durante el proceso de selección con GCV. Cuantificamos los efectos de estos tratamientos mediante la tinción de senescencia por β -galactosidasa, capturamos imágenes de cada condición y cuantificamos del porcentaje de células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} senescentes (β -galactosidasa⁺) en cada campo. Como control usamos las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} sin ningún tratamiento con inhibidores de senescencia adicional. Finalmente pudimos observar que únicamente el tratamiento con Rapamicina (inhibidor de mTOR) generó una disminución significativa en el porcentaje de células senescentes (**Figura 24A**). No obstante, en los diferentes tratamientos se generó de nuevo una drástica restricción en la proliferación celular representada por el número de células por campo presente en cada imagen analizada (**Figura 24B**), similares a valores observados en las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} sin tratamiento (Control); el tratamiento con Rapamicina incluso redujo el número de células por campo. Por otro lado, el tratamiento con Y27632 (inhibidor de ROCK1), aumentó el número de células por campo, aunque no provocó efectos significativos sobre el porcentaje de células senescentes.

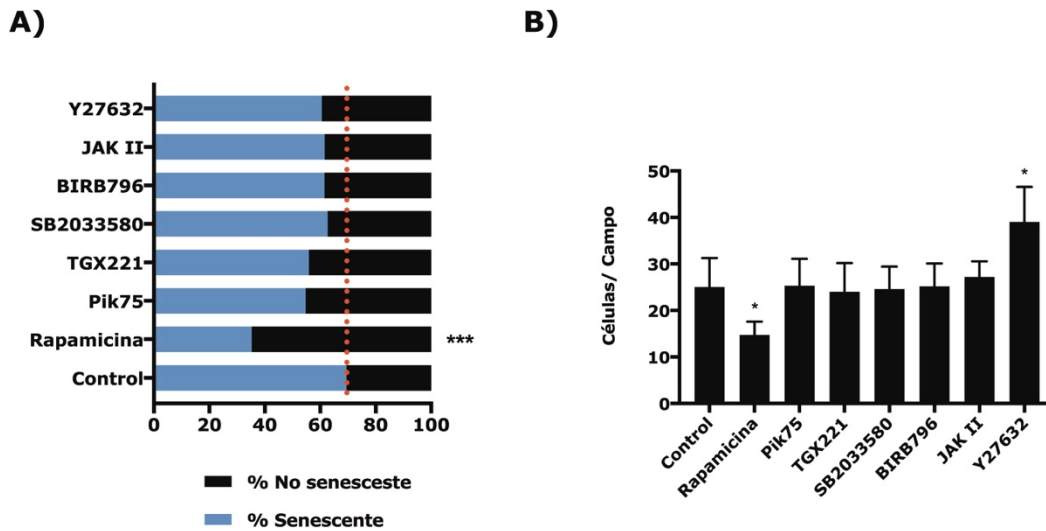


Figura 24: La utilización de inhibidores de rutas de señalización implicadas en el SASP no reducen eficazmente la entrada en senescencia de las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev}. **A)** Representación del porcentaje de células senescentes (β -galactosidasa⁺) observadas por campo en las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} tratadas durante el proceso de des-inmortalización con cada uno de los inhibidores de SASP. Se consideró como control las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} des-inmortalizadas sin ningún tratamiento con inhibidores de senescencia adicional. *** $p < 0,001$; *One-Way ANOVA Bonferroni post-Test*. **B)** Representación del número total de células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} observadas por campo en las imágenes analizadas para la tinción de senescencia realizada con cada uno de los inhibidores testados. Se consideraron como control las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev} des-inmortalizadas sin ningún tratamiento con inhibidores de senescencia adicional. Las barras de error indican la SD derivada de la media de tres réplicas experimentales. * $p < 0,05$; *One-Way ANOVA Bonferroni post-Test*.

Aunque el tratamiento con Rapamicina redujo de forma notable el porcentaje de células senescentes, presentó efectos negativos paralelos sobre la tasa de proliferación celular, provocando una disminución en la densidad celular de los cultivos. A pesar de los intentos de optimización de las condiciones de cultivo empleadas para el mantenimiento de las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev}, no fue posible mejorar el estado de los cultivos de este tipo celular. Por lo tanto, descartamos la aplicación de dicho modelo y nos centramos en el modelo de células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} para los siguientes experimentos realizados durante este proyecto.

Validación de las características propias de la línea inmortalizada Bmi1-CPC-YFP^{Inm}

2.1 La línea celular Bmi1-CPC-YFP^{Inm} mantiene las características que definen a la población Bmi1-CPC

Antes de poder emplear la línea celular Bmi1-CPC-YFP^{Inm} para el estudio de la población Bmi1-CPC, evaluamos si dicha línea celular mantenía las características propias que definen a esta población y, por lo tanto, era un modelo válido.

En primer lugar, analizamos mediante RT-qPCR los niveles de expresión de un panel de genes clave que definen a la población de progenitores cardíacos Bmi1⁺ 28 (Figura 25). Observamos, en la mayoría de estos genes, que las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} mantienen los niveles de expresión que presentan las células primarias Bmi1-CPC-YFP a pases tempranos tras su extracción (p6). Únicamente se encontraron diferencias moderadas en la expresión de *VegfA*, reducida en las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} respecto a las poblaciones las células Bmi1-CPC-YFP; y en *Pdgfra*, aumentada en la población Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Las diferencias observadas fueron más significativas al comparar las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} con las Bmi1-CPC-YFP no inmortalizadas mantenidas durante el proceso de inmortalización.

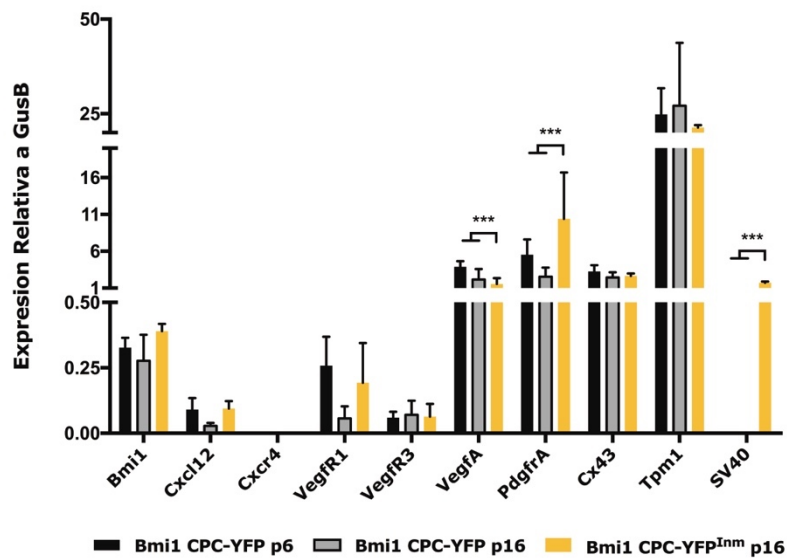


Figura 25: La línea celular Bmi1-CPC-YFP^{Inm} mantiene la expresión de los principales genes caracterizados para la población de progenitores cardíacos Bmi1⁺. La gráfica muestra los resultados de RT-qPCR evaluando la expresión relativa al control endógeno *GusB* de genes definitorios de la población Bmi1-CPC²⁸. Evaluamos la expresión en Bmi1-CPC-YFP primarias de pase temprano (p6), Bmi1-CPC-YFP control mantenidas durante el proceso de inmortalización (p16) y Bmi1-CPC-YFP^{Inm} (p16). Se evaluó la expresión de *T-SV40* como confirmación de la naturaleza inmortalizada. Las barras de error indican la SD derivada de la media de tres réplicas experimentales. *** $p < 0,001$; One-Way ANOVA Bonferroni post-Test

Seguidamente, estudiamos la expresión de diferentes marcadores de membrana cuya expresión se ha validado previamente en las células Bmi1-CPC²⁸ y que definen a esta población. Al igual que en la población de progenitores cardíacos Bmi1⁺, la línea inmortalizada Bmi1-CPC-YFP^{Inm} no presenta expresión del marcador de linaje hematopoyético CD45²⁰ o de cKit⁶², molécula de membrana que define ciertas poblaciones de progenitores cardíacos adultos. Por el contrario, presenta expresión de SCA1, molécula identificada previamente en la población Bmi1-CPC²⁸. De igual forma, la población Bmi1-CPC ha sido definida previamente como una población mixta compuesta por células PDGFR α ⁺ y CD31⁺ ¹⁰¹. En la línea inmortalizada Bmi1-CPC-YFP^{Inm} se pudo identificar un alto porcentaje (85,5%) de células PDGFR α ⁺, mientras que no se detectó la expresión de CD31 (**Figura 26**).

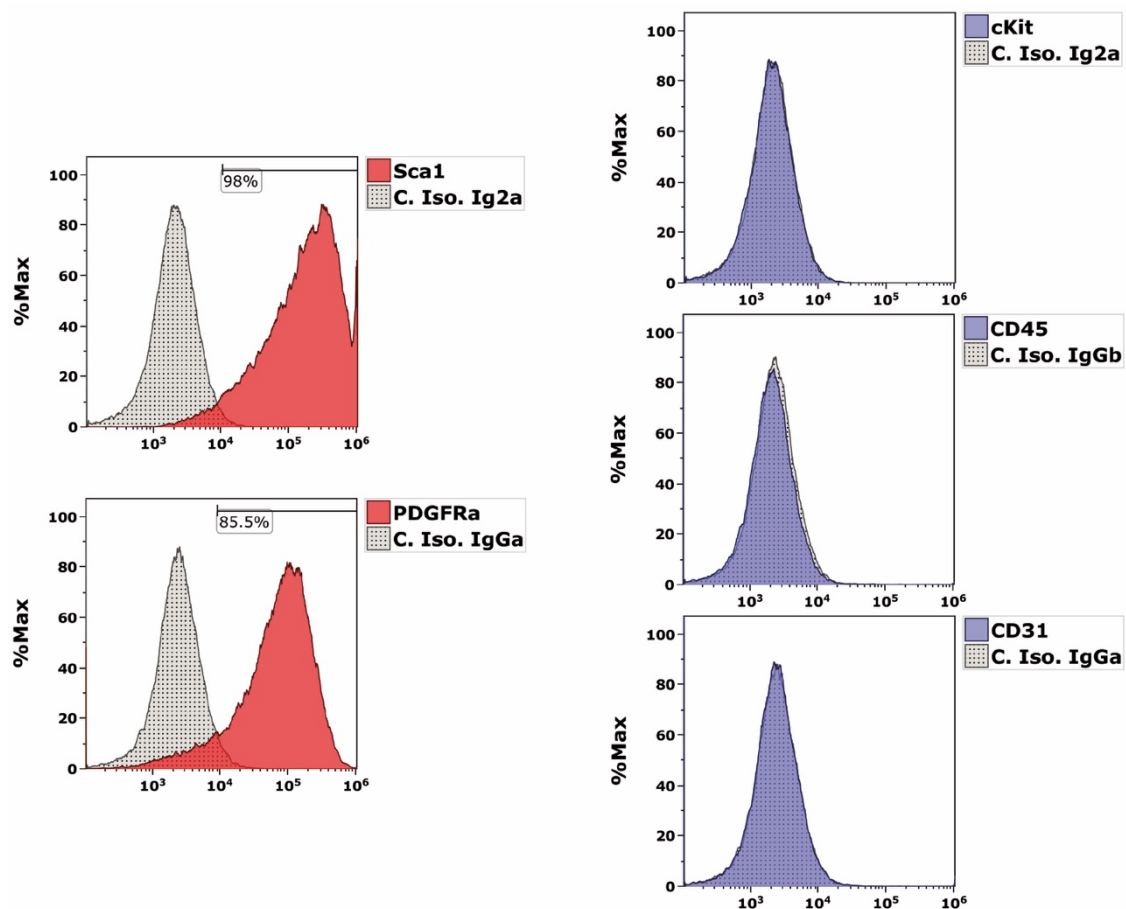


Figura 26: La línea celular Bmi1-CPC-YFP^{Inm} mantiene la expresión de los principales marcadores de membrana caracterizados para la población de progenitores cardíacos Bmi1⁺. Evaluación mediante citometría de flujo de la expresión de diferentes marcadores de membrana caracterizados en la población Bmi1-CPC, en la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm}.

2.2 La línea celular Bmi1-CPC-YFP^{Inm} presenta un porcentaje de alteraciones cromosómicas

Previamente, se ha definido en otros tipos celulares que el proceso de inmortalización necesario para generar una línea celular estable puede producir diferentes alteraciones cromosómicas en dichos modelos^{160, 161}. Consecuentemente, como parte de la validación de las características que presenta nuestro modelo de Bmi1-CPC-YFP^{Inm}, realizamos un estudio citogenético (cariotipado) de dicha línea celular. Para ello colaboramos con la *Unidad de Citogenética* del *Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)*. Estudiamos el

cariotipo de las células *Bmi1-CPC-YFP^{Inm}* mediante tinción de bandas GTG (**Figura 27**). Analizando 30 metafases se pudieron observar 15 metafases diploides (2n) y 15 metafases tetraploides (4n), por lo que nuestro modelo de células *Bmi1-CPC-YFP^{Inm}* está compuesto por una combinación homogénea (50%/50%) de clones 2n y 4n. En todas las metafases analizadas no se observó ningún evento de otro tipo de aberraciones cromosómicas.



Figura 27: La línea celular *Bmi1-CPC-YFP^{Inm}* es una población heterogénea compuesta por clones diploides y tetraploides. La evaluación del cariotipo de la población *Bmi1-CPC-YFP^{Inm}* tras 20 pases en cultivo mediante tinción de bandas GTG muestra que se trata de una población mixta compuesta por un 50% de células diploides (2n) y un 50% de células tetraploides (4n).

2.3 La línea celular *Bmi1-CPC-YFP^{Inm}* reproduce la respuesta frente a estímulos definidos para la población *Bmi1-CPC*

Como parte de la caracterización de la línea *Bmi1-CPC-YFP^{Inm}*, estudiamos la capacidad de respuesta de las dichas células frente a diferentes estímulos. En trabajos anteriores, se definió que las células *Bmi1-CPC* responden frente a diferentes estímulos procedentes de las EC presentes en el corazón mediante un aumento en la expresión de *Bmi1*¹⁰⁷. Reproducimos dichos experimentos, estimulando de igual forma las células *Bmi1-CPC-YFP^{Inm}* con diferentes proteínas recombinantes (VEGF-A, EPHRINB2 Y EPHB4) y analizamos sus efectos sobre la expresión de *Bmi1* (**Figura 28**). Observamos un aumento significativo en los niveles de expresión de *Bmi1* en las células *Bmi1-CPC-YFP^{Inm}* tratadas con EPHRINB2 y EPHB4, reproduciéndose la respuesta experimentada por las células *Bmi1-CPC*. Igualmente, observamos un aumento moderado en los niveles de expresión de *Bmi1* tras los tratamientos con VEGF-A.

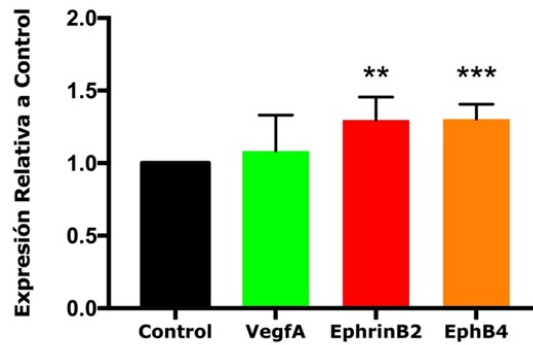


Figura 28: La línea celular Bmi1-CPC-YFP^{Inm} reproduce la respuesta propia de la población Bmi1-CPC frente a moléculas de señalización célula-célula presentes en el endotelio. Evaluación mediante RT-qPCR de la expresión de *Bmi1* como consecuencia de la estimulación de la población Bmi1-CPC-YFP^{Inm} con diferentes proteínas recombinantes (VEGFA, EPHRINB2, EPHB4). Expresión representada como valores relativos a control de células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} no tratadas. Las barras de error indican la SD derivada de la media de seis réplicas experimentales. ** $p < 0,01$; *One-Way ANOVA Bonferroni post-Test*.

Estos resultados mostraron que la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm} mantiene la capacidad de respuesta frente a estímulos concretos procedentes del endotelio que ha sido definida previamente para la población Bmi1-CPC.

2.4 Las células Bmi1-CPC y Bmi1-CPC-YFP^{Inm} presentan una respuesta similar frente a daño oxidativo severo

Una parte importante del presente proyecto se centra en el estudio de los mecanismos moleculares implicados en la respuesta que presentan las células Bmi1-CPC frente a la exposición a daño oxidativo severo^{105,103,101}. Para saber si el modelo de células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} es aplicable en este tipo de estudios, analizamos principalmente la respuesta frente a daño oxidativo *in-vitro* inducido con Paraquat (*N,N'*-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride) (PQ). El PQ es un potente agente pro-oxidante que genera especies reactivas de oxígeno (ROS) mitocondriales derivadas de la cadena de transporte electrónico¹⁶². Comparamos los efectos de la exposición a PQ en cultivos primarios de células Bmi1-CPC extraídas del modelo animal *Bmi1*^{CreERT/+}*Rosa26*^{Tomato/+} (Bmi1-CPC-Tomato) con los observados en las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm}.

En primer lugar, comparamos la severidad del daño generado por concentraciones crecientes de PQ en los cultivos de Bmi1-CPC-Tomato y Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Expusimos las células a los diferentes tratamientos inductores de daño durante 12h y evaluamos su eficiencia cuantificando el porcentaje de células muertas identificadas en cada caso; DAPI+ en los cultivos de Bmi1-CPC-Tomato (**Figura 29A**) y yoduro de propidio (PI)+ en Bmi1-CPC-YFP^{Inm} (**Figura 29B**). No se observaron diferencias relevantes entre la respuesta frente a daño oxidativo por PQ en ambos tipos celulares. En los dos casos se observó una progresión similar en el porcentaje de células muertas que se corresponde con el aumento de la concentración de PQ aplicada en cada tratamiento.

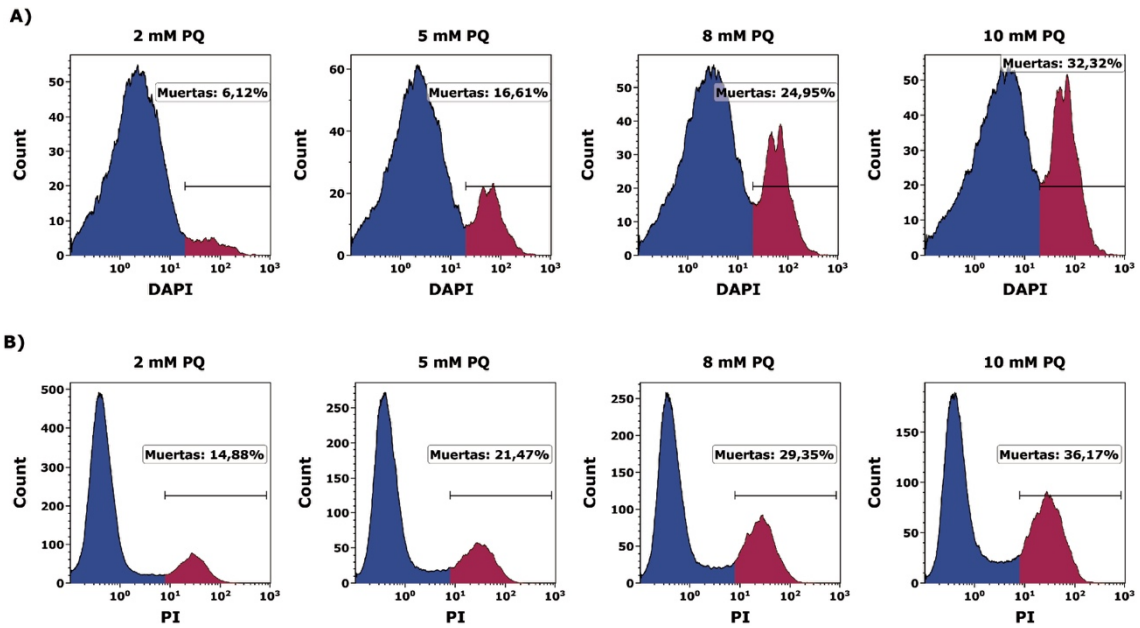


Figura 29: Bmi1-CPC-Tomato y Bmi1-CPC-YFP^{Inm} presentan una sensibilidad similar al daño oxidativo inducido con PQ. Evaluación mediante citometría de flujo de la inducción de muerte celular causada por el tratamiento con diferentes concentraciones de PQ en, **A)** la línea celular Bmi1-CPC-Tomato (DAPI⁺) y **B)** Bmi1-CPC-YFP^{Inm} (PI⁺). Se emplearon los marcajes de daño celular compatibles con las proteínas fluorescentes expresadas por cada línea.

Además, analizamos por RT-qPCR la expresión de varios genes cuyo aumento en su expresión se ha definido como marcadores de respuesta al daño cardíaco inducido por PQ¹⁶³. Para estos experimentos expusimos a ambos modelos de Bmi1-CPC (Bmi1-CPC-Tomato y Bmi1-CPC-YFP^{Inm}) a un tratamiento de 12h con medio suplementado con PQ 5mM, ya que en estas condiciones observamos un daño moderado en los cultivos, manteniendo su integridad (**Figura 29; 5mM**). Reportamos una respuesta similar a nivel de expresión génica en ambos modelos analizados (**Figura 30**), observándose un aumento significativo de la expresión de los genes: *Cat*, *Gpx1*, *Prdx1* y *Hmox1*. No obstante, para algunos genes se pudo apreciar que el aumento fue mayor en el modelo Bmi1-CPC-YFP^{Inm} (**Figura 30B**); se observa, además, un aumento significativo en la expresión de *Bmi1*.

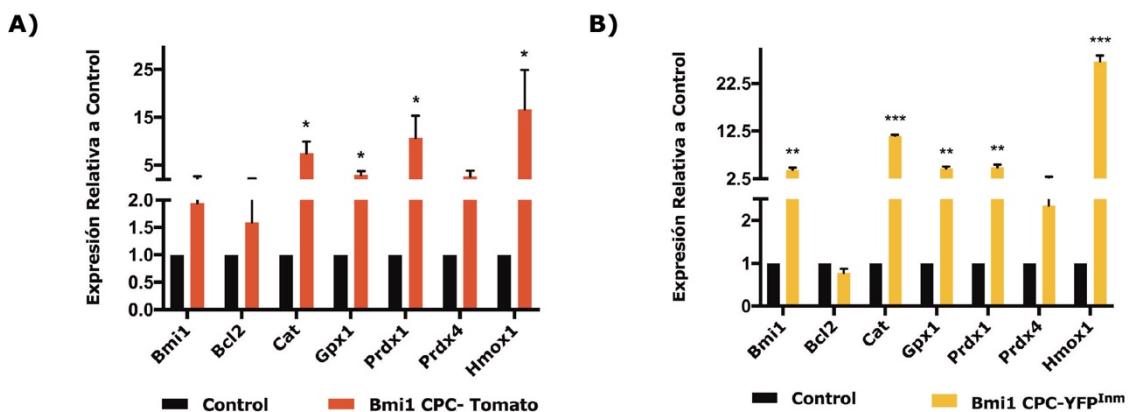


Figura 30: Bmi1-CPC-Tomato y Bmi1-CPC-YFP^{Inm} presentan una respuesta a nivel de expresión génica similar frente al daño oxidativo inducido con PQ. Evaluación mediante RT-qPCR de la expresión de genes marcadores de la respuesta frente a daño oxidativo por tratamiento con PQ 5mM durante 12h sobre **A)** la línea Bmi1-CPC-Tomato y **B)** Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Expresión representada como valores relativos a control de células Bmi1-CPC no tratadas. Las barras de error indican la SD derivada de la media de tres réplicas experimentales. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Mann-Whitney U-Test

Resultados

Estos resultados, junto a los descritos en los apartados anteriores, indican que la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm} reproduce las principales características que definen a la población Bmi1-CPC; por lo que la consideramos como un modelo aplicable al estudio de la población de progenitores cardíacos adultos Bmi1⁺.

Aplicación del modelo Bmi1-CPC-YFP^{Inm} para definir los mecanismos moleculares implicados en la relación entre Bmi1-CPC y su nicho endotelial

3.1 En condiciones de homeostasis el secretoma de las Bmi1-CPC-Tomato y Bmi1-CPC-YFP^{Inm} presentan una composición similar y rica en factores de angiogénesis

Estudios anteriores han postulado una posible relación de tipo nicho entre la población Bmi1-CPC y el endotelio cardíaco^{107,106}. En este proyecto, tratamos de definir los mecanismos moleculares que podrían mediar en esta interacción. En primer lugar, analizamos el secretoma de las células Bmi1-CPC para discernir si presentaban la capacidad de secretar ciertos factores que pudieran participar en su relación con el nicho endotelial.

Para ello, analizamos el medio condicionado generado por las células Bmi1-CPC-Tomato mediante un *array* de proteínas centrado en factores de angiogénesis. En paralelo, estudiamos el secretoma del modelo celular Bmi1-CPC-YFP^{Inm} desarrollado anteriormente. De esta forma, esperábamos confirmar que dicha línea inmortalizada mantenía las principales características que definen a la población Bmi1-CPC y, por lo tanto, podría ser empleada en futuros experimentos para definir el nicho cardíaco de estos progenitores. En el *array* realizado sobre el medio condicionado de las células primarias Bmi1-CPC-Tomato (**Figura 31A**), se detectaron varios factores directamente implicados en procesos de angiogénesis y una posible relación directa con el endotelio cardíaco. El más abundante fue CXCL12; seguido por SERPINA E1, MMP3, Factor de Coagulación III y VEGF-A (**Figura 31B**). En el caso de la línea celular Bmi1-CPC-YFP^{Inm} (**Figura 31C**), CXCL12 fue nuevamente el factor más abundante, seguido por MMP3 y SERPINA E1, observándose una disminución de la expresión relativa de VEGF-A y Factor de Coagulación III, en relación al secretoma de Bmi1-CPC-Tomato, y un aumento en la expresión de algunas proteínas, siendo las más destacadas PIGF-2 y TIM-1 (**Figura 31D**). No obstante, en la comparación de las proteínas detectadas en el medio condicionado de ambas líneas pudimos observar un patrón de expresión bastante similar (**Figura 31E**). Los tres factores más abundantes fueron comunes entre las células Bmi1-CPC-Tomato y Bmi1-CPC-YFP^{Inm}, siendo CXCL12 el primero en ambos casos. Estos resultados, en consonancia con los obtenidos anteriormente, parecen confirmar que la línea celular Bmi1-CPC-YFP^{Inm} mantiene las principales características de los cultivos de Bmi1-CPC-Tomato y, por lo tanto, podría ser un modelo válido para el estudio de la población Bmi1-CPC y su posible relación con el endotelio.

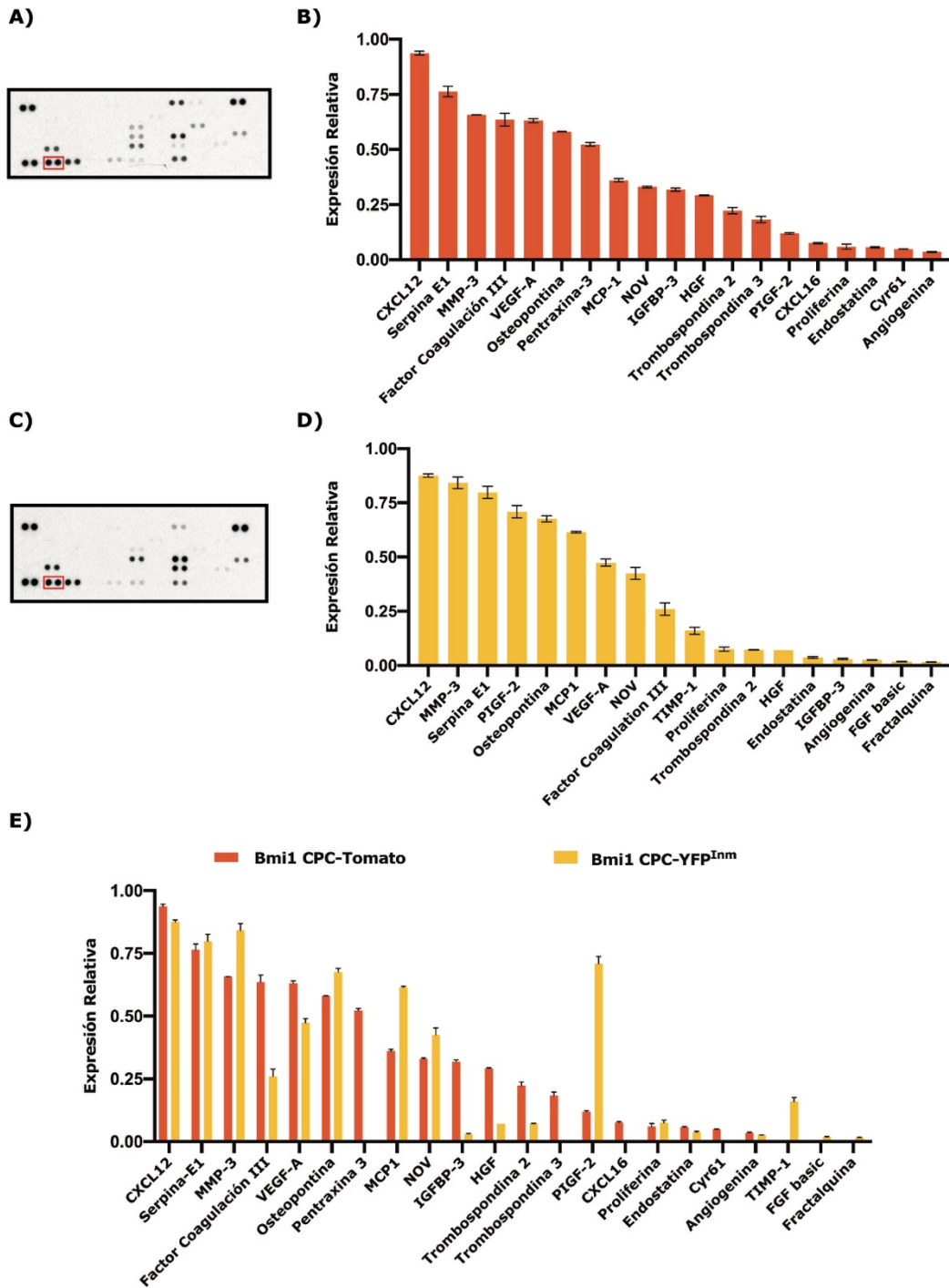


Figura 31: En condiciones de homeostasis las células Bmi1-CPC-Tomato y Bmi1-CPC-YFP^{Inm} secretan factores relacionados con la angiogénesis con un perfil de expresión similar. A) Imagen representativa del *array* de angiogénesis realizado sobre el medio condicionado generado por la línea Bmi1-CPC-Tomato durante 12h. Los puntos marcados corresponden a CXCL12. **B)** Cuantificación relativa a los controles internos de las proteínas identificadas en el medio condicionado generado por la línea Bmi1-CPC-Tomato. **C)** Imagen representativa del *array* de angiogénesis realizado sobre medio condicionado generado por la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm} durante 12h. Los puntos marcados corresponden a CXCL12. **D)** Cuantificación relativa a los controles internos de las proteínas identificadas en el medio condicionado generado por la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. **E)** Representación comparativa de las proteínas detectadas en el medio condicionado generado por ambos modelos, Bmi1-CPC-Tomato y Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Valores representados como media de los valores relativos a controles intra-experimentales. Las barras de error indican la SD derivada de la media de dos réplicas intra-experimentales incluidas en cada *array*.

3.2 En condiciones de daño oxidativo severo el secretoma de las Bmi1-CPC-Tomato y Bmi1-CPC-YFP^{Inm} presenta ciertas alteraciones

Analizamos como varía el secretoma de las células Bmi1-CPC como parte de la caracterización de su respuesta frente a daño oxidativo. Para ello, realizamos nuevamente un *array* centrado en factores de angiogénesis sobre el medio condicionado de las Bmi1-CPC-Tomato y Bmi1-CPC-YFP^{Inm} generado en condiciones de daño oxidativo por PQ (5mM; 12h).

En el medio condicionado generado en condiciones de daño por las células primarias Bmi1-CPC-Tomato (**Figura 32A**) se observó, una disminución generalizada en la expresión relativa de las proteínas detectadas (**Figura 32B**) si comparamos con los valores obtenidos en condiciones de homeostasis (**Figura 31B**). Además, se observaron ciertas diferencias en cuanto al patrón de proteínas identificadas en el medio generado en homeostasis. En condiciones de daño oxidativo, la proteína más abundante fue OSTEOPONTINA, seguida por SERPINA E1, CXCL12 y VEGF-A. Sin embargo, en el caso del medio condicionado generado por las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} en condiciones de daño oxidativo (**Figura 32C**), se pudo observar un aumento generalizado de los valores de expresión relativa (**Figura 32D**) si comparamos con los valores obtenidos en homeostasis (**Figura 31D**). En este caso, la proteína más abundante fue MMP3; seguida por CXCL12, SERPINA E1 y OSTEOPONTINA, siendo VEGF-A el sexto factor más abundante. Al comparar los factores detectados en el medio condicionado de las células las Bmi1-CPC-Tomato y Bmi1-CPC-YFP^{Inm}, ambas en condiciones de daño (**Figura 32E**), observamos diferencias en los niveles de expresión de proteínas clave para su posible relación con el endotelio como CXCL12 o VEGF-A. Estos resultados, sugerirían que la respuesta frente a daño oxidativo en la línea celular Bmi1-CPC-YFP^{Inm} podría presentar ciertas diferencias con los cultivos de Bmi1-CPC-Tomato. La comparativa entre los resultados obtenidos para el secretoma de ambas líneas celulares de Bmi1-CPC, en condiciones de homeostasis o daño oxidativo, queda reflejada en la **Figura Suplementaria 1 (Anexos)**.

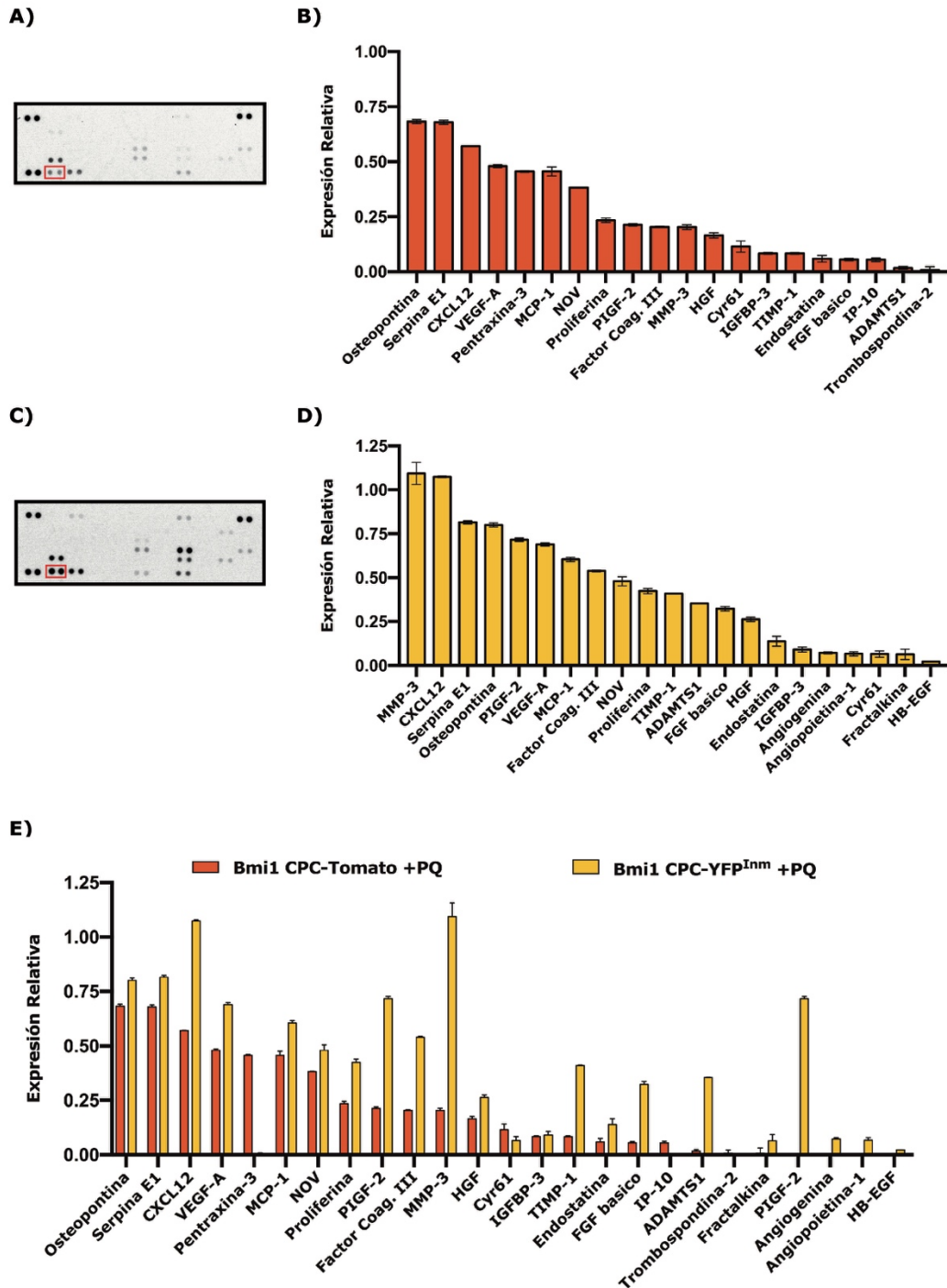


Figura 32: En condiciones de daño oxidativo las células Bmi1-CPC-Tomato y Bmi1-CPC-YFP^{Inm} presentan ciertas variaciones en su secretoma. A) Imagen representativa del *array* de angiogénesis realizado sobre el medio condicionado generado por la línea Bmi1-CPC-Tomato durante 12h en medio suplementado con 5mM de PQ. Los puntos marcados corresponden a CXCL12. **B)** Cuantificación relativa a los controles internos de las proteínas identificadas en el medio condicionado generado por la línea Bmi1-CPC-Tomato en condiciones de daño. **C)** Imagen representativa del *array* de angiogénesis realizado sobre el medio condicionado generado por la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm} durante 12h en medio suplementado con 5mM de PQ. Los puntos marcados corresponden a CXCL12. **D)** Cuantificación relativa a los controles internos de las proteínas identificadas en el medio condicionado generado por la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm} en condiciones de daño. **E)** Representación comparativa de las proteínas detectadas en el medio condicionado generado en condiciones de daño oxidativo por ambos modelos, Bmi1-CPC-Tomato y Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Valores representados como media de los valores relativos a controles intra-experimentales. Las barras de error indican la SD derivada de la media de dos réplicas intra-experimentales incluidas en cada *array*.

3.3 Los factores secretados por las Bmi1-CPC favorecen la migración endotelial

Tras confirmar que las células Bmi1-CPC son capaces de secretar varios factores que podrían afectar directamente a las EC, tratamos de identificar los mecanismos moleculares que podrían participar en la relación entre las Bmi1-CPC con su posible nicho endotelial.

Analizamos si los factores secretados por las Bmi1-CPC eran capaces de favorecer la migración de las EC hacia su proximidad. Para ello, realizamos ensayos de migración en *transwell* sobre las EC que componen la línea celular inmortalizada 1g11. Sembramos las células 1g11 en la parte superior de los *transwell* y cuantificamos su migración hacia la parte inferior al ser expuestas al medio condicionado generado por las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Como control celular externo, comparamos la migración inducida por el medio condicionado generado por poblaciones de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) (Figura 33A). La cuantificación tras 7 o 12h de ensayo mostró que las células 1g11 no presentaban migración de forma espontánea. En el caso de la exposición al medio condicionado generado por los MEFs, sí que indujo un aumento en la migración endotelial. No obstante, este efecto se incrementó significativamente al exponer a las células 1g11 al medio condicionado generado por las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} (Figura 33B).

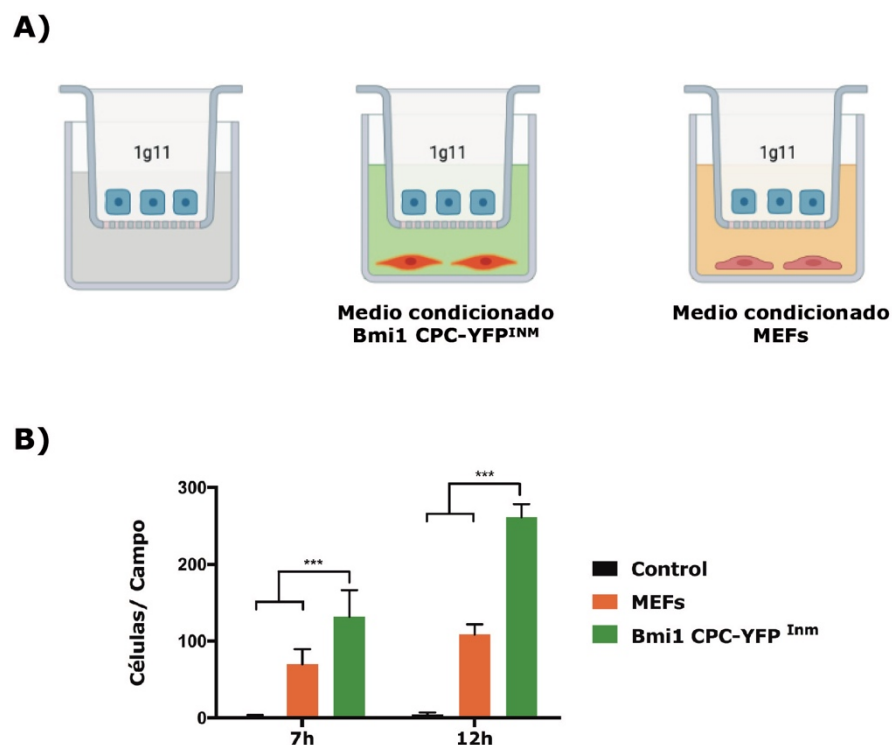


Figura 33: Los factores secretados por las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} favorecen la migración endotelial. **A)** Esquema de los experimentos de migración en *transwell* realizados para evaluar la inducción de la migración endotelial generada en las diferentes condiciones testadas. **B)** Representación del número de células 1g11 identificadas por campo tras 7 o 12h de migración, expuestas al medio condicionado generado por las células MEFs o Bmi1-CPC-YFP^{Inm}; empleándose como control las células 1g11 cultivadas en medio IMDM simple. Las barras de error indican la SD derivada de la media de tres réplicas experimentales. *** $p < 0,001$; One-Way ANOVA Bonferroni post-Test.

Resultados

Los resultados obtenidos reflejan la capacidad de las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} para inducir la migración de EC en su proximidad. Tratando de definir los mecanismos moleculares implicados en este fenómeno, se postuló el efecto de la quimioquina CXCL12 como un posible candidato en la inducción de la migración endotelial, al ser el factor más abundante en el secretoma de las células Bmi1-CPC (**Figura 31**) y en base a resultados publicados previamente^{134,135,136}. Para confirmar esta hipótesis, realizamos de nuevo los experimentos de migración en *transwell* tras tratar las células 1g11 con el inhibidor AMD3100 a 10 μ M (*Selleckchem*; S3013) (cedido por el grupo del Dr. Mario Mellado, CNB); inhibidor de CXCR4, principal receptor de CXCL12. El tratamiento con el inhibidor se inició en las EC 1h antes de realizar el experimento y se prolongó durante todo el periodo de migración. Este tratamiento afectó significativamente a la migración endotelial generada por el medio condicionado de las Bmi1-CPC-YFP^{Inm}, reduciéndola hasta los valores observados en los MEFs (**Figura 34**). Estos resultados confirmarían que CXCL12 desempeña un papel fundamental en la migración endotelial generada por las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm}.

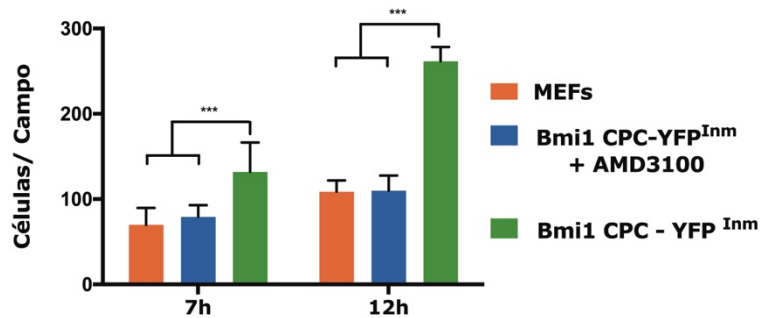


Figura 34: CXCL12 es clave en la inducción de la migración endotelial generada por las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Representación del número de células 1g11 identificadas por campo tras 7 o 12h de migración expuestas al medio condicionado generado por las células MEFs o las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} en condiciones normales y en presencia del inhibidor AMD3100 durante el tiempo de migración. Las barras de error indican la SD derivada de la media de tres réplicas experimentales. *** $p < 0,001$; One-Way ANOVA Bonferroni post-Test.

Siguiendo la misma metodología cuantificamos el efecto del daño oxidativo con PQ sobre la inducción de la migración endotelial inducida por las Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Expusimos a las células 1g11 al medio condicionado generado durante 7h en presencia de 5 y 8mM de PQ, manteniendo las condiciones de daño durante el periodo de migración (**Figura 35**). El tratamiento con 5mM de PQ generó un aumento en la migración endotelial. Sin embargo, este efecto se revirtió al elevar la concentración a 8mM de PQ, observándose una disminución si comparamos con el efecto generado por el medio condicionado de las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} en condiciones de homeostasis (Control). En ambos niveles de daño oxidativo, el tratamiento con el inhibidor AMD3100 generó una reducción significativa de la migración endotelial, confirmando el papel fundamental de CXCL12 en este mecanismo.

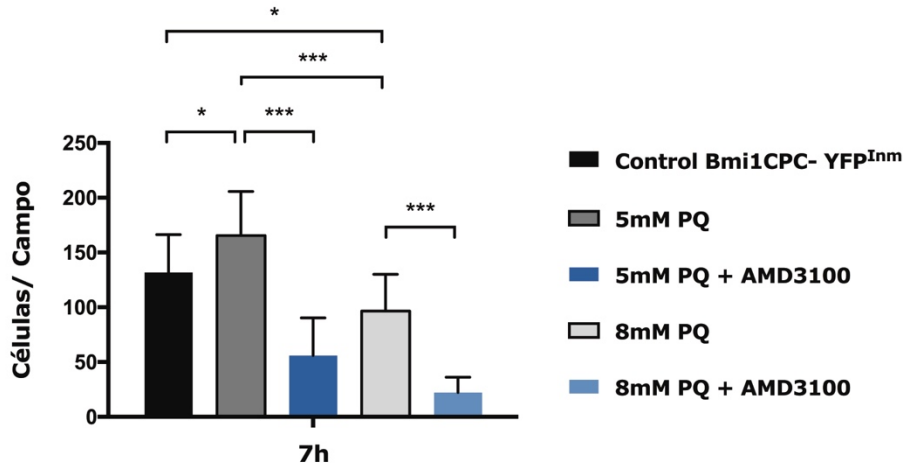


Figura 35: Las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} aumentan su capacidad de favorecer la migración endotelial en condiciones de daño oxidativo moderado. Representación del número de células 1g11 identificadas por campo tras 7h de migración, expuestas al medio condicionado generado por las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} en homeostasis o en condiciones de daño oxidativo generado por PQ (5 o 8mM) y en presencia o ausencia del inhibidor AMD3100 durante el tiempo de migración. Las barras de error indican la SD derivada de la media de tres réplicas experimentales. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; One-Way ANOVA Bonferroni post-Test.

3.4 Los factores secretados por las Bmi1-CPC favorecen la angiogénesis en condiciones de homeostasis

Siguiendo con el análisis de los efectos de los factores secretados por las células Bmi1-CPC sobre EC, realizamos un ensayo de angiogénesis en *Matrigel*[®] usando la línea endotelial 1g11. Tras 12h de exposición frente a diferentes tratamientos, tomamos imágenes de las células 1g11 y cuantificamos diferentes parámetros indicadores de la formación de estructuras vasculares¹⁶⁴ (Figura 36).

En primer lugar, observamos que la línea celular 1g11 es capaz de formar estructuras vasculares complejas al ser estimuladas durante 12h con factores pro-angiogénicos como EGF y VEGF (Figura 36A; **Control Positivo**); mientras que en las células 1g11 cultivadas en medio sin suplementos no se observaron este tipo de estructuras (Figura 36A; **Control Negativo**). Seguidamente, evaluamos la capacidad de los medios condicionados generados por los modelos celulares Bmi1-CPC-YFP^{Inm}, Bmi1-CPC-Tomato y MEFs, de inducir angiogénesis en las células 1g11, tanto en condiciones de homeostasis como de daño oxidativo. Los MEFs presentaron una capacidad limitada para inducir angiogénesis en las células 1g11, sin mostrar diferencias respecto al control positivo ya fuera en condiciones de homeostasis o daño oxidativo inducido con PQ (Figura 36B). Por el contrario, el medio condicionado generado en homeostasis por ambos modelos de células Bmi1-CPC presentó propiedades pro-angiogénicas. No obstante, dichos efectos fueron mayores en las células Bmi1-CPC-Tomato, observándose un aumento significativo en todos los parámetros analizados; con los medios condicionados de las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm}, únicamente se observaron diferencias significativas en la Longitud Total de los segmentos vasculares analizados (Figura 36B). Estos efectos se vieron revertidos en ambos casos en condiciones de daño oxidativo inducido por PQ, postulando que las variaciones en el secretoma de las

Bmi1-CPC observadas en condiciones de daño (**Figura 32**) podrían afectar a su capacidad pro-angiogénica.

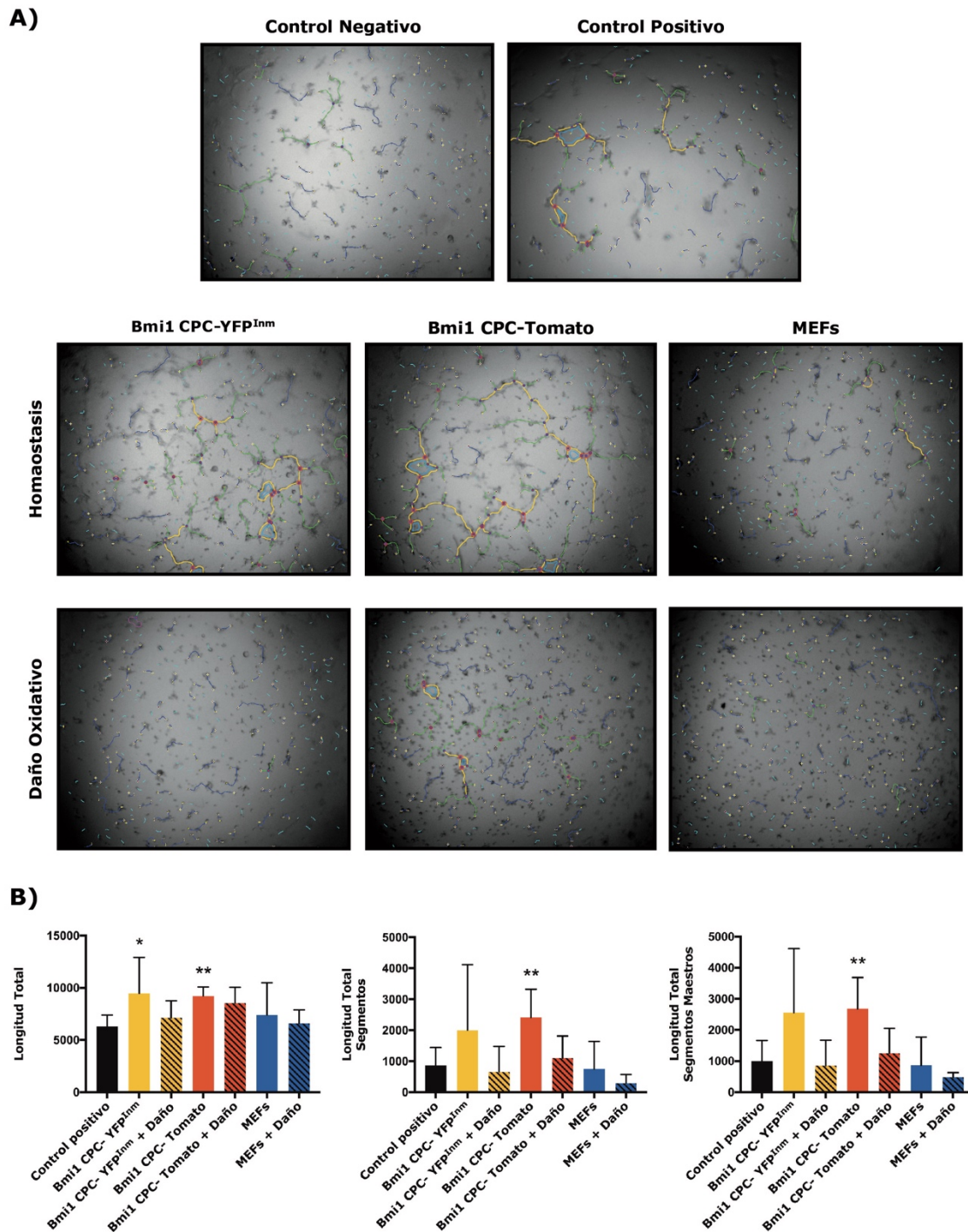


Figura 36: Los factores secretados por las Bmi1-CPC favorecen la angiogénesis en condiciones de homeostasis. A) Imágenes representativas de la cuantificación de la angiogénesis generada en la línea celular 1g11 en las diferentes condiciones testadas. Los segmentos primarios aparecen representados en azul, los secundarios en verde y los terciarios en amarillo. **B)** Representación de los principales parámetros analizados indicativos del proceso de angiogénesis. Las barras de error indican la SD derivada de la media de tres réplicas experimentales. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *One-Way ANOVA Bonferroni post-Test*.

Una vez confirmada la capacidad inductora de angiogénesis por parte del secretoma de las Bmi1-CPC, tratamos de identificar los factores concretos implicados en dicho

mecanismo. CXCL12 es el factor más abundante en el secretoma de las Bmi1-CPC-Tomato en condiciones de homeostasis y numerosos estudios han podido definir su capacidad pro-angiogénica¹³⁴. Por lo tanto, para testar su función realizamos un nuevo ensayo de angiogénesis en células 1g11 cultivadas sobre el medio condicionado de las Bmi1-CPC-Tomato suplementado con AMD3100, inhibidor de CXCR4 (**Figura 37**). Pudimos observar que el bloqueo de la actividad de CXCL12 por parte del inhibidor AMD3100 no generó diferencias negativas en la capacidad inductora de angiogénesis propia del secretoma de las células Bmi1-CPC-Tomato; por el contrario, se pudo observar un ligero aumento en algunos de los parámetros indicadores de angiogénesis analizados tras la inhibición de CXCL12. Por lo tanto, otros factores secretados por estas células serían los principales responsables de su capacidad pro-angiogénica.

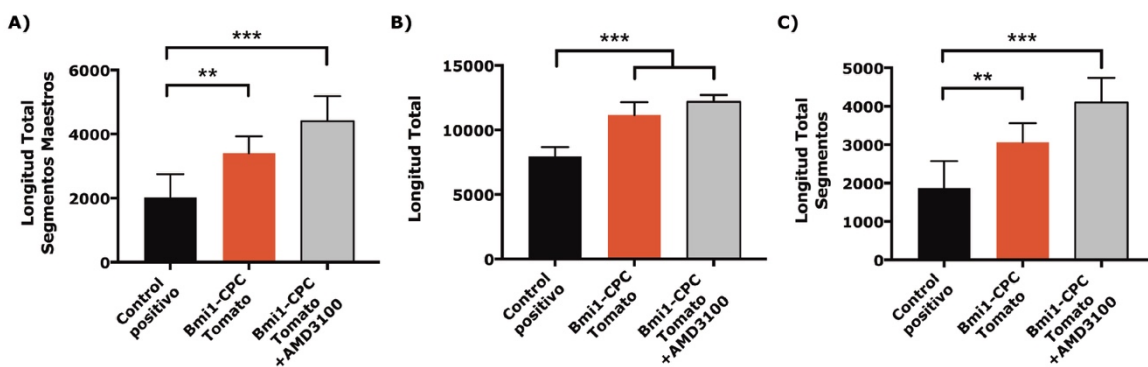


Figura 37: CXCL12 no desempeña un papel relevante en la inducción de angiogénesis por parte de las Bmi1-CPC. Representación de los principales parámetros analizados indicativos de la angiogénesis: **A)** Longitud Total de los Segmentos Maestros; **B)** Longitud Total; **C)** Longitud Total de los Segmentos. Las barras de error indican la SD derivada de la media de tres réplicas experimentales. ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; One-Way ANOVA Bonferroni post-Test.

Estos resultados confirmarían que los factores secretados por las células Bmi1-CPC presentan un efecto sobre las EC; además de inducir la migración en su proximidad, favorecen la formación de estructuras vasculares. Los mecanismos observados sugieren la existencia de una relación estrecha entre las Bmi1-CPC y el endotelio cardíaco.

3.5 El co-cultivo con células endoteliales favorece la supervivencia de las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} frente a daño oxidativo inducido por Paraquat

Estudios previos han descrito que los factores liberados por poblaciones de progenitores similares a las Bmi1-CPC presentan la capacidad de proteger a otros tipos celulares cardíacos frente a daño oxidativo¹⁶⁵. Quisimos comprobar si los factores secretados por las Bmi1-CPC promueven efectos similares.

Analizamos la supervivencia frente a la exposición a daño oxidativo severo en co-cultivos de Bmi1-CPC-YFP^{Inm} con modelos de los tipos celulares mayoritarios que componen el corazón: EC (1g11), CM (HL-1) y fibroblastos (MEFs). Previamente, pudimos observar que las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} perdían su marcaje por YFP al entrar en apoptosis y verse comprometida su integridad; lo que nos impedía discriminar entre las dos poblaciones que componían los co-cultivos *in-vitro* y evaluar el porcentaje de células apoptóticas en cada una.

Para poder diferenciar los tipos celulares que componían cada co-cultivo, realizamos un marcaje previo al co-cultivo sobre la población Bmi1-CPC-YFP^{Inm} con *Violet Tracer*, compatible con el marcaje de células muertas por PI (**Figura 38**).

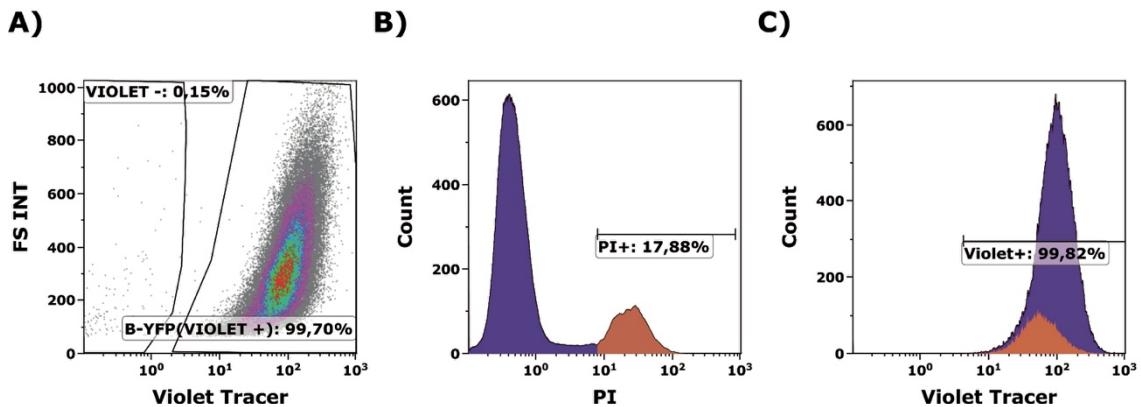


Figura 38: El marcaje por *Violet Tracer* es eficiente y compatible con la cuantificación de la muerte celular mediante PI. **A)** Representación del porcentaje del total de células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} marcadas con *Violet Tracer* tras el proceso de tinción empleado. **B)** Representación del porcentaje de células Bmi1-CPC-YFP^{Inm}/ Violet + muertas (PI+) tras la inducción de daño oxidativo mediante PQ 5mM 12h. **C)** Representación del marcaje conjunto de la tinción con *Violet tracer* y PI en las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} tratadas con daño oxidativo por PQ 5mM 12h.

Una vez optimizadas las condiciones que se emplearon para los co-cultivos, realizamos los experimentos de inducción de daño oxidativo por PQ (5 y 8mM) durante 12h, siguiendo el procedimiento representado en la **Figura 39**.

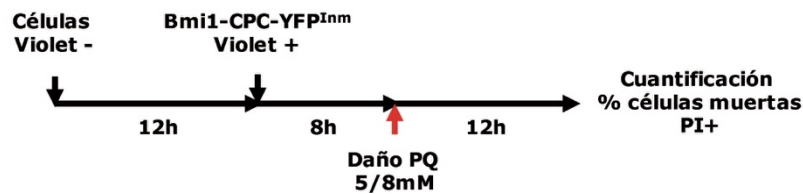


Figura 39: Esquema del procedimiento seguido para evaluar el efecto de la exposición a daño oxidativo severo sobre los co-cultivos de Bmi1-CPC-YFP^{Inm} con diferentes tipos celulares.

Tomando como ejemplo los co-cultivos entre células endoteliales 1g11 y Bmi1-CPC-YFP^{Inm}, en primer lugar, analizamos el porcentaje de células muertas (PI+) en cada población independiente tras un tratamiento de 12h con PQ a concentración de 5 (**Figura 40A y B**) y 8 mM (**Figura 40D y E**). Paralelamente, realizamos el mismo tratamiento de inducción de daño sobre las células co-cultivadas (**Figura 40C y F**). Comparamos el porcentaje de muerte observado en las células 1g11 (población Violet-) o Bmi1-CPC-YFP^{Inm} (población Violet+) con los obtenidos en los tratamientos de daño realizados sobre las células cultivadas independientemente. Seguimos el mismo procedimiento en los co-cultivos de células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} con las líneas HL-1 y MEFs.

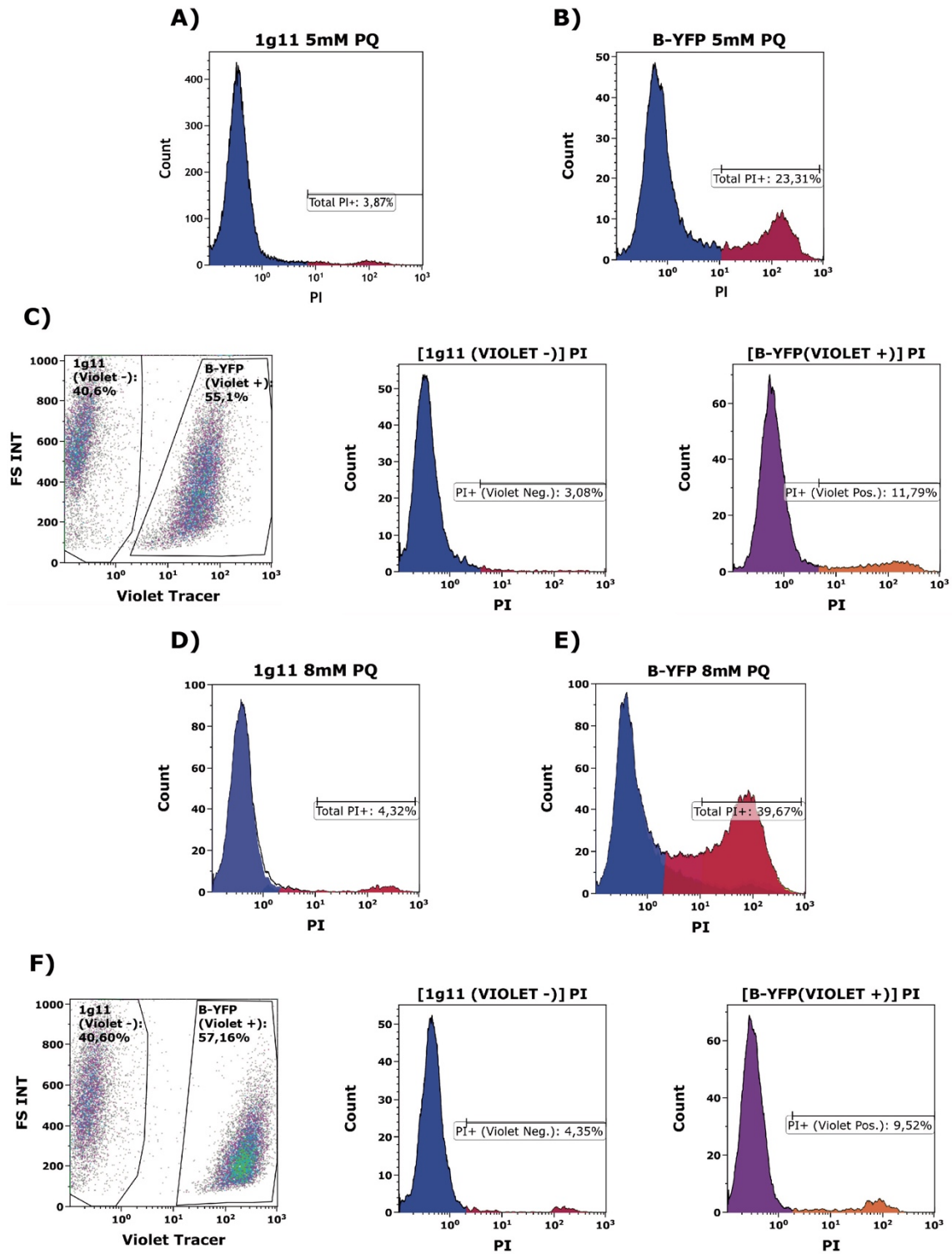


Figura 40: Cuantificación mediante citometría de flujo del efecto del co-cultivo directo entre Bmi1-CPC-YFP^{Imn} y 1g11 sobre la supervivencia celular frente a daño oxidativo. A) Representación del porcentaje de células 1g11 muertas (PI+) tras 12h de inducción de daño oxidativo por PQ 5mM. **B)** Representación del porcentaje de células Bmi1-CPC-YFP^{Imn} muertas (PI+) tras 12h de inducción de daño oxidativo por PQ 5mM. **C) Izquierda;** Representación de la población 1g11 (Violet -) y Bmi1-CPC-YFP^{Imn} (Violet +) en los co-cultivos tratados con PQ 5mM durante 12h. *Centro;* porcentaje de células 1g11 muertas (PI+) en condiciones de co-cultivo. *Derecha;* porcentaje de células Bmi1-CPC-YFP^{Imn} muertas (PI+) en condiciones de co-cultivo. **D)** Representación del porcentaje de células 1g11 muertas (PI+) tras 12h de inducción de daño oxidativo por PQ 8mM. **E)** Representación del porcentaje de células Bmi1-CPC-YFP^{Imn} muertas (PI+) tras 12h de inducción de daño oxidativo por PQ 8mM. **F) Izquierda;** Representación de la población 1g11 (Violet -) y Bmi1-CPC-YFP^{Imn} (Violet +) en los co-cultivos tratados con PQ 8mM durante 12h. *Centro;* porcentaje de células 1g11 muertas (PI+) en condiciones de co-cultivo. *Derecha;* porcentaje de células Bmi1-CPC-YFP^{Imn} muertas (PI+) en condiciones de co-cultivo.

Los análisis expuestos anteriormente revelaron que las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} no presentan un efecto protector frente a daño oxidativo sobre ninguno de los tipos celulares con los que fueron co-cultivadas (**Figura 41**). No se encontraron diferencias significativas entre el porcentaje de células muertas (PI+) detectadas en los cultivos independientes y en los co-cultivos con la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm}.

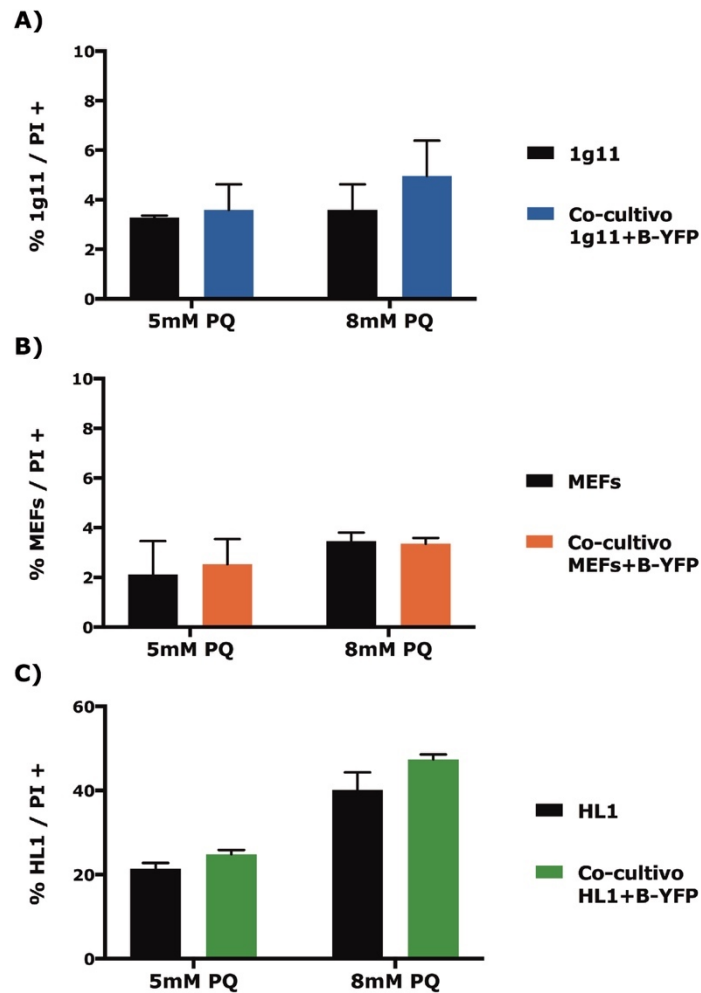


Figura 41: Las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} no presentan un efecto protector sobre los diferentes tipos celulares co-cultivados. Representación del porcentaje de células **A)** 1g11 **B)** MEFs **C)** HL-1 muertas marcadas con PI (% Bmi1-CPC-YFP^{Inm}/ PI+) observadas tras la inducción de daño oxidativo durante 12h con PQ 5 u 8mM en los co-cultivos realizados con las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} (B-YFP). Las barras de error indican la SD derivada de la media de tres réplicas experimentales.

Sin embargo, el análisis de las células apoptóticas presentes en la población Bmi1-CPC-YFP^{Inm} (Violet +) reveló que el co-cultivo directo con las células 1g11 generaba un efecto protector sobre la línea de progenitores cardíacos, reduciendo el porcentaje de células muertas tras el tratamiento con PQ. Además, la reducción en el porcentaje de células muertas Bmi1-CPC-YFP^{Inm} (Violet +) fue más pronunciado al exponerse los co-cultivos a concentraciones más altas de PQ (**Figura 42A**). Este efecto únicamente se observó en los co-cultivos entre células 1g11 y Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. El co-cultivo con fibroblastos (MEFs), redujo el porcentaje de células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} muertas a las concentraciones de daño más bajas. Sin embargo, generó un

Resultados

efecto adverso en el tratamiento con PQ 8mM, aumentando el porcentaje de células muertas que se observa al inducir daño sobre las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} independientes (**Figura 42B**). El co-cultivo con la línea de CM, HL-1 (**Figura 42C**), no presentó diferencias significativas respecto al porcentaje de células muertas reportado en los tratamientos de daño sobre los cultivos independientes.

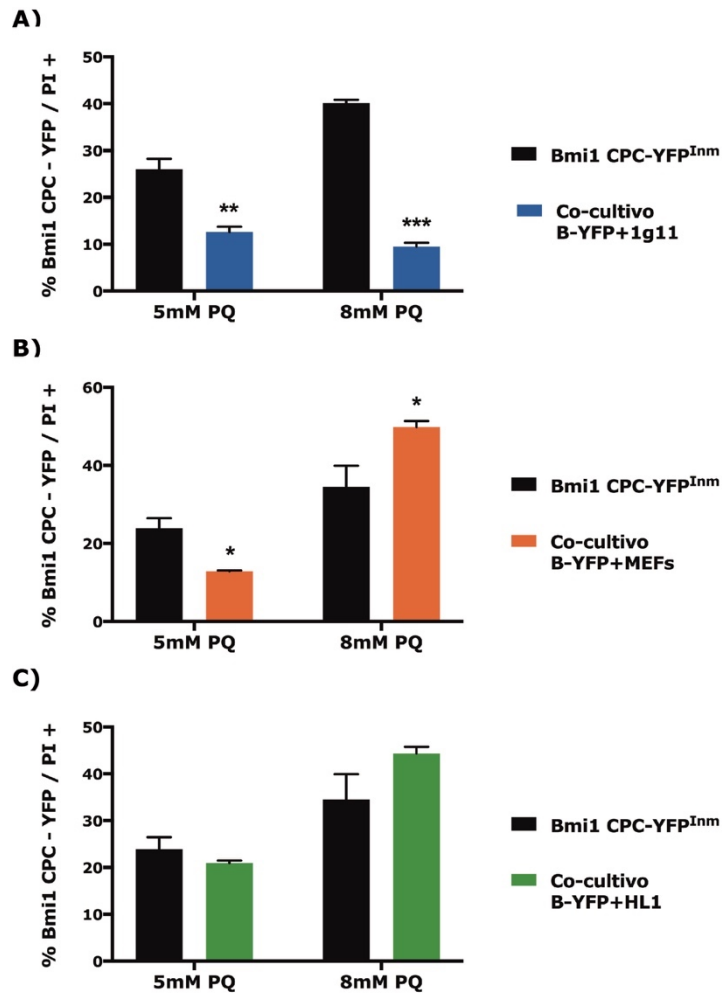


Figura 42: El co-cultivo directo con células 1g11 aumenta la capacidad de supervivencia frente a daño oxidativo en las Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Representación del porcentaje de células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} muertas marcadas con PI (% Bmi1-CPC-YFP^{Inm}/PI+) observadas tras la inducción de daño oxidativo durante 12h con PQ 5 u 8mM en los co-cultivos realizados sobre células **A)** 1g11; **B)** MEFs; y **C)** HL-1. Las barras de error indican la SD derivada de la media de tres réplicas experimentales. *p-valor<0,05; ** p-valor<0,01; *** p-valor<0,001; Mann-Whitney U-Test.

Adicionalmente, comprobamos que el efecto protector de las células 1g11 es específico de su relación con las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Analizamos el efecto del co-cultivo entre células 1g11 y HL-1 y no observamos diferencias significativas en el porcentaje de muerte observado en la línea de CM (**Figura 43**).

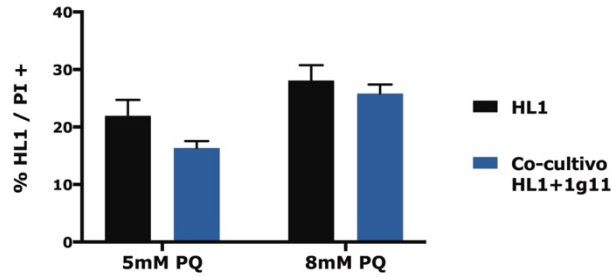


Figura 43: El efecto protector de la línea endotelial 1g11 sobre las células Bmi1 CPC-YFP^{Inm} es específico de la interacción entre ambos tipos celulares. Representación del porcentaje de células HL-1 muertas marcadas con PI (% HL-1/ PI+) observadas tras la inducción de daño oxidativo durante 12h con PQ 5 u 8mM en los co-cultivos realizados sobre células 1g11. Las barras de error indican la SD derivada de la media de tres réplicas experimentales.

Estos resultados apuntarían a la relación de tipo nicho entre células endoteliales y las Bmi1-CPC descrita anteriormente¹⁰⁷ y podrían sugerir una señalización bidireccional entre ambos tipos celulares.

3.6 El contacto directo con células endoteliales activa la ruta de Notch en las células Bmi1-CPC

Trabajos publicados previamente revelaron que el contacto directo entre EC y Bmi1-CPC afecta a diferentes procesos celulares claves para el mantenimiento de esta población de progenitores¹⁶⁵. En este proyecto tratamos de definir los mecanismos moleculares implicados en los procesos celulares que participan en la interacción existente entre el endotelio cardíaco y las células Bmi1-CPC.

Para analizar las rutas de señalización afectadas en las células Bmi1-CPC por el contacto con EC realizamos experimentos de co-cultivo directos empleando la línea inmortalizada Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Tras 12 horas de co-cultivo con las EC separamos la población Bmi1-CPC-YFP^{Inm}, por FACS empleando la fluorescencia del reportero YFP (YFP+ y YFP-), y extrajimos el RNA para analizar las variaciones en la expresión génica; siguiendo el esquema de la **Figura 44**.

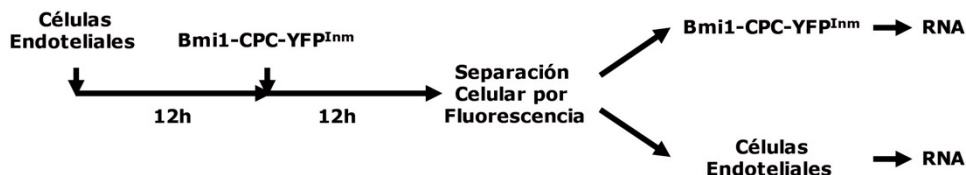


Figura 44: Esquema del procedimiento seguido para analizar el efecto de los co-cultivos con EC sobre el perfil de expresión de las Bmi1-CPC-YFP^{Inm}.

Experimentos previos mostraron que el co-cultivo directo de las células Bmi1-CPC-Tomato con células endoteliales cardíacas primarias (pCEC) reduce la proliferación de las Bmi1-CPC. Además, en la población Bmi1-CPC se identificó una sobreexpresión de varios genes implicados en la ruta de señalización de Notch¹⁰⁷. Estudios previos también han definido el

papel de la ruta de Notch en la relación de las MuSC con su nicho endotelial¹²², modulando su estado proliferativo de forma similar al observado en las células Bmi1-CPC. En base a estos resultados previos, analizamos los niveles de expresión de varios genes de la ruta de Notch en las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} tras ser co-cultivadas con la línea endotelial 1g11 (**Figura 45**). Para confirmar si las posibles alteraciones en los genes analizados se debían a la señalización por contacto célula-célula, incluimos un control de células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} co-cultivadas en la parte inferior de cámaras *transwell*, con células 1g11 en la parte superior, evitando de esta forma el contacto directo entre ambos tipos celulares.

Los resultados únicamente mostraron diferencias en los niveles de expresión de *Jag2* (ligando transmembrana de Notch)¹¹⁹ y *Hey2* (factor de transcripción regulado por la acción de la ruta de Notch)¹⁶⁶. No obstante, en ambos casos el aumento de expresión se observó también en los co-cultivos realizados en *transwell*, por lo que su aumento no se pudo atribuir a la señalización por contacto directo entre las células 1g11 y las Bmi1-CPC-YFP^{Inm}.

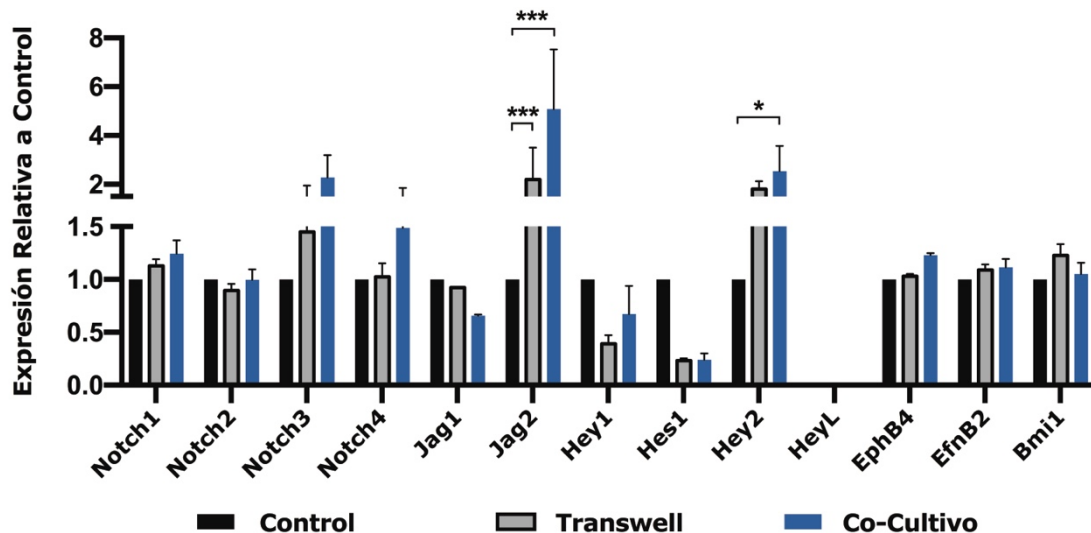


Figura 45: El co-cultivo con la línea endotelial 1g11 no promueve efectos sobre la activación de la ruta de Notch en las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Evaluación mediante RT-qPCR de la expresión en las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} de genes representativos de la ruta de Notch. Expresión representada como valores relativos al control de células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} cultivadas de forma independiente frente a las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} co-cultivadas con la línea 1g11 separada por un *transwell* o en condiciones de co-cultivo directo. Las barras de error indican la SD derivada de la media de tres réplicas experimentales. *p-valor<0,05; ***p-valor<0,001. One-Way ANOVA Bonferroni post-Test.

Al no observar diferencias en la activación de la ruta de Notch, analizamos la expresión de varias moléculas de señalización consideradas como posibles candidatas a ser expresadas en las células endoteliales y actuar como las inductoras de esta ruta en las células Bmi1-CPC. Entre ellas analizamos la expresión de *Dll4*, ligando de la ruta de Notch expresado en el endotelio y que participa en la activación de dicha ruta en las MuSC¹²². Igualmente, analizamos la expresión de *EphrinB4* y *EphB4*, moléculas de señalización célula-célula que han sido descritas ampliamente en el endotelio¹²⁰ y que nuestros resultados muestran que presentan actividad sobre las Bmi1-CPC¹⁰⁷ (**Figura 28**). Inesperadamente, observamos que la línea

celular 1g11 carecía de la expresión de *Dll4*, presentándose una alta expresión en los cultivos primarios de células endoteliales cardíacas (**Figura 46**).

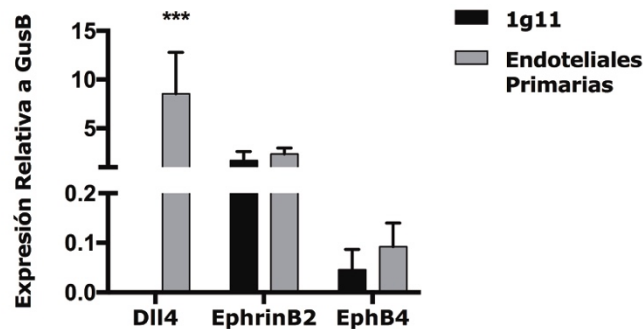


Figura 46: Las células 1g11 carecen de la expresión de *Dll4*, ligando activador de la ruta de Notch. Evaluación mediante RT-qPCR de la expresión de *Dll4*, *EphrinB2* y *EphB4* en la línea endotelial 1g11 y en las pCEC. Expresión representada de forma relativa al control endógeno *GusB*. Las barras de error indican la SD derivada de la media de tres réplicas experimentales. *** $p < 0,001$. *Mann-Whitney U-Test*

Tras identificar la expresión diferencial de algunas de las moléculas de señalización que podrían estar implicadas en la posible relación entre el endotelio y las células Bmi1-CPC, decidimos realizar nuevamente los experimentos de co-cultivo, esta vez con pCEC y Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Nuevamente, evaluamos en la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm} la expresión de varios genes pertenecientes a la ruta de Notch (**Figura 47**). Estos resultados reportaron un aumento significativo en la expresión de *Jag1* (ligando transmembrana de Notch)¹¹⁹, *Hey1*, *Hes1*, *HeyL*¹²² y *Hey2*¹⁶⁶ (factores de transcripción directamente regulados por la ruta de Notch). Este aumento es significativamente mayor a los valores obtenidos en las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} cultivadas en *transwell* y se debería, por lo tanto, a la señalización por contacto célula-célula entre pCEC y la población Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. La expresión diferencial identificada en las pCEC (**Figura 46**) parece postular a *Dll4* como una de las principales moléculas señalizadoras implicadas en la activación de la ruta de Notch en las Bmi1-CPC que indicarían los resultados obtenidos.

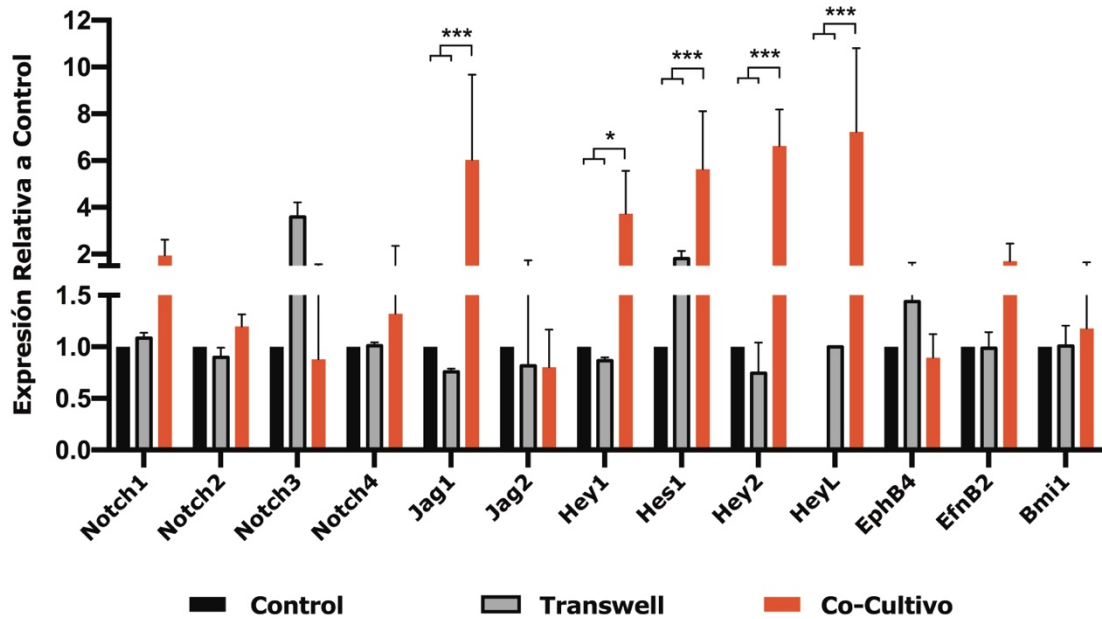


Figura 47: El co-cultivo con pCEC activa de forma significativa la ruta de Notch en las células Bmi1-CPC-YFP^{imn}. Evaluación mediante RT-qPCR de la expresión en las células Bmi1-CPC-YFP^{imn} de genes representativos de la ruta de Notch. Expresión representada como valores relativos al control de células Bmi1-CPC-YFP^{imn} cultivadas de forma independiente frente a las células Bmi1-CPC-YFP^{imn} co-cultivadas con pCEC separadas por un *transwell* o en condiciones de co-cultivo directo. Las barras de error indican la SD derivada de la media de cuatro réplicas experimentales. *p-valor<0,05; ***p-valor<0,001. *One-Way ANOVA Bonferroni post-Test*.

3.7 El contacto directo con células endoteliales afectaría a la actividad metabólica en las células Bmi1-CPC

Publicaciones previas demostraron que, además de una disminución en la proliferación, el co-cultivo con pCEC provocaba en las células Bmi1-CPC una bajada en los niveles de ROS totales asociado a una disminución en la masa mitocondrial¹⁰⁷. Empleamos las muestras de los co-cultivos obtenidas en el apartado anterior (**Figura 45**) para analizar varios mecanismos celulares que podrían estar relacionados con la disminución en los niveles de ROS (**Figura 48**). Analizamos la expresión de varios genes implicados en procesos de autofagia¹⁶⁷ y observamos una clara disminución de *Bnip3* y *Bnip3L*; genes relacionados con la autofagia mitocondrial. Paralelamente, estudiamos los niveles de expresión de varios genes implicados en la regulación metabólica¹⁶⁸ y encontramos una bajada significativa en la expresión de varios de ellos; *Apelina*, *Pppargc1a* y *Atp5j*. Estos resultados indicarían una reducción de la actividad metabólica de las Bmi1-CPC-YFP^{imn} como consecuencia del co-cultivo directo. Por último, analizamos varios genes implicados en diferentes rutas asociadas a envejecimiento¹⁶⁹, aunque no presentaron diferencias significativas. La variación en la expresión de estos genes estaba asociada de forma específica a los co-cultivos directos entre Bmi1-CPC-YFP^{imn} y células endoteliales, lo que indicaría que dichos efectos son consecuencia de la señalización por contacto directo célula-célula.

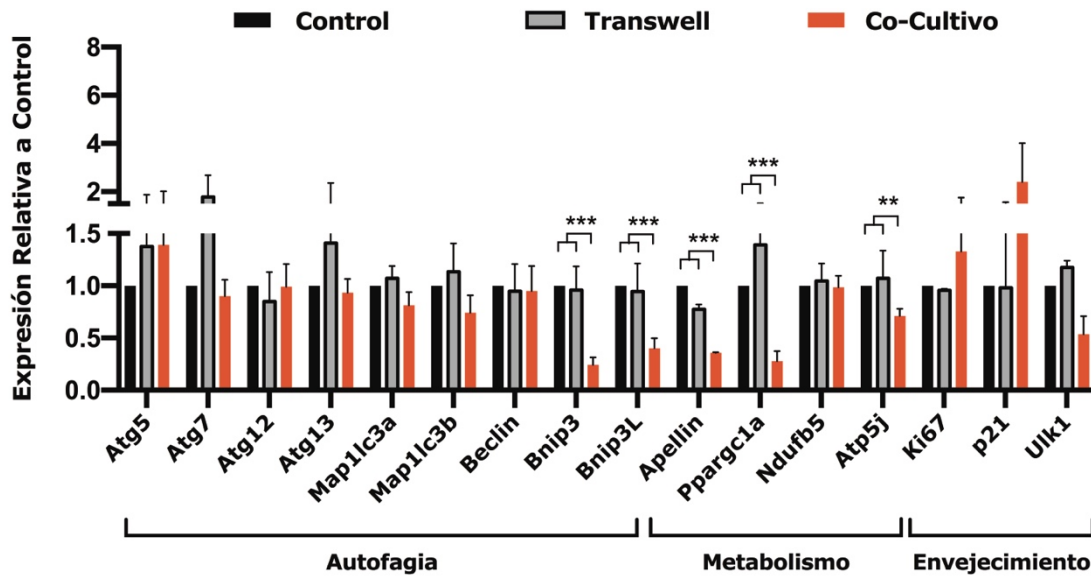


Figura 48: El co-cultivo con pCEC altera el flujo autofágico y reduce la actividad metabólica en las células Bmi1-CPC-YFP^{Imn}. Evaluación mediante RT-qPCR de la expresión en las células Bmi1-CPC-YFP^{Imn} de genes implicados en autofagia, metabolismo y envejecimiento. Expresión representada como valores relativos a control de células Bmi1-CPC-YFP^{Imn} cultivadas de forma independiente frente a las células Bmi1-CPC-YFP^{Imn} co-cultivadas con pCEC separadas por un *transwell* o en condiciones de co-cultivo directo. Las barras de error indican la SD derivada de la media de cuatro réplicas experimentales. ***p-valor<0,001. *One-Way ANOVA Bonferroni post-Test*.

Los resultados obtenidos mostraron que el contacto directo con pCEC modulaba en las células Bmi1-CPC la expresión de genes relacionados con los procesos de mitofagia y control del metabolismo. Estos procesos celulares están directamente relacionados con la producción de ROS, parámetro que previamente se mostró afectado en las células Bmi1-CPC tras el co-cultivo directo con pCEC¹⁰⁷.

DISCUSIÓN

Inmortalización efectiva de la línea Bmi1-CPC-YFP y limitaciones asociadas a la pérdida de un alelo de Bmi1 en el modelo Bmi1-CPC-GFP

Hasta la fecha, todos los proyectos centrados en el estudio de la población de progenitores Bmi1-CPC se basaban en el trabajo con modelos animales o cultivos celulares primarios derivados de ellos. Sin embargo, el trabajo con estos modelos está sujeto a numerosas limitaciones experimentales debidas a la escasa representación de las poblaciones estudiadas, así como al compromiso con la reducción de la cantidad de animales de experimentación utilizados. Diferentes estudios han confirmado la aplicabilidad de células pluripotentes inducidas¹⁷⁰ o células derivadas de células embrionarias^{171,172} como modelos válidos para el estudio del sistema cardiovascular. Estos modelos han permitido grandes avances, así como reducir la cantidad de animales de investigación destinados para estos estudios. Por estas razones, planteamos el desarrollo de una línea celular inmortalizada de Bmi1-CPC como uno de los objetivos principales de este proyecto.

Previamente se han aplicado con éxito diferentes protocolos de inmortalización sobre tipos celulares similares a las células Bmi1-CPC. Las estrategias empleadas se basan en la inducción de la expresión de genes que favorecen la proliferación y la autorenovación celular, mientras bloquean procesos como la senescencia o la muerte celular. Entre estas estrategias, destacan la inducción del propio gen *Bmi1*, la telomerasa humana (hTERT) o T-SV40^{153,151,152,165}. La inducción de la sobreexpresión de *Bmi1* fue descartada ya que es el gen cuya expresión caracteriza a nuestra población y su inducción excesiva podría afectar directamente a la dinámica celular. De igual forma, descartamos la sobreexpresión de la hTERT ya que se ha definido que puede afectar directamente a la expresión de *Bmi1*¹⁷³. Por lo tanto, planteamos una estrategia basada en la inducción del gen *T-SV40* que induce la inmortalización celular mediante la inhibición de p53¹⁷⁴. Así, su actividad no debería afectar a los niveles de expresión de *Bmi1*. Adicionalmente, la inmortalización con T-SV40 se ha confirmado como la más efectiva en un estudio comparativo frente al tratamiento con *Bmi1* y *hTERT*¹⁵¹.

Nos propusimos generar y comparar dos líneas celulares de Bmi1-CPC derivadas de modelos animales con una expresión diferencial de *Bmi1*. Por un lado, células Bmi1-CPC con expresión de *Bmi1* no alterada (*Bmi1*^{+/+}/ Bmi1-CPC-YFP²⁸). Por otro lado, células Bmi1-CPC con expresión haploinsuficiente de *Bmi1* (*Bmi1*^{+/-}/ Bmi1-CPC-GFP¹⁰⁰). De esta forma, pretendíamos analizar los efectos de las alteraciones en la expresión de *Bmi1* sobre los mecanismos que deseáramos analizar. La estrategia de inmortalización que planteamos resultó efectiva para la línea Bmi1-CPC-YFP^{Imm}, observándose un aumento significativo en la proliferación de estas células comparadas con los cultivos primarios (**Figura 12**). Estas células han podido ser mantenidas en cultivo de forma estable e indefinida (actualmente >40 pases). Sin embargo, fue imposible obtener unos efectos similares en las células Bmi1-CPC-GFP. Confirmamos que la expresión de los genes de inmortalización, aunque claramente detectable, se perdía progresivamente al mantener las células Bmi1-CPC-GFP en cultivo. Es posible que la dificultad para inmortalizar la línea haploinsuficiente Bmi1-CPC-GFP (*Bmi1*^{+/-}) se derive directamente de la deficiencia de *Bmi1*. *Bmi1*, es una parte fundamental del *PRC1*, que

desempeña una función esencial en la reparación de las roturas de doble cadena del DNA¹⁷⁵. El papel de *Bmi1* es especialmente relevante en los mecanismos de reparación no homóloga (NHEJ; *Non-Homologous End Joining*), potenciándose estos mecanismos mediante su sobreexpresión¹⁷⁶. Los mecanismos de NHEJ son fundamentales en los primeros estadios de la infección lentiviral¹⁷⁷. Por lo tanto, la pérdida de uno de los alelos de *Bmi1* podría afectar directamente al proceso de immortalización mediante infección lentiviral, haciendo menos eficiente la inserción de forma estable dentro del genoma (integración del provirus) en las células *Bmi1*-CPC-GFP y provocando la pérdida progresiva del inserto lentiviral (**Figura 49**).

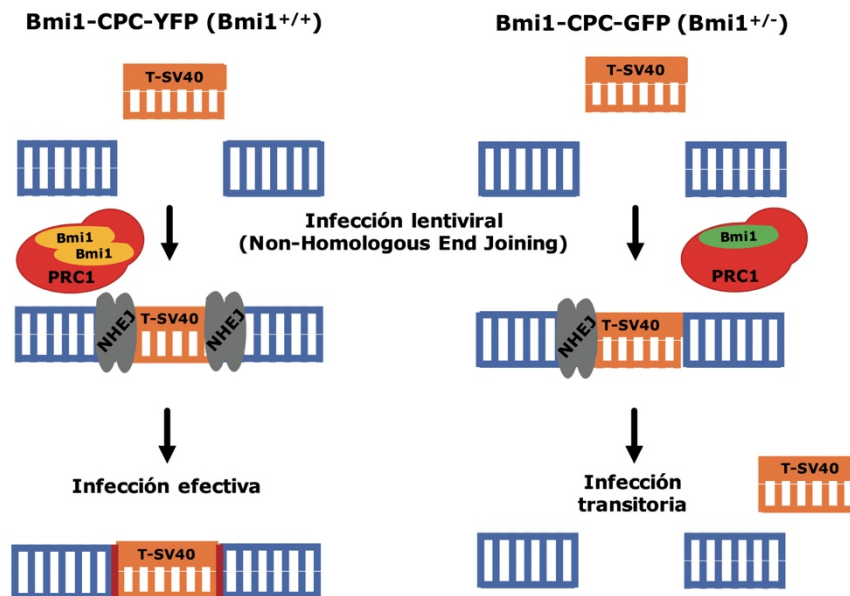


Figura 49: La haploinsuficiencia de *Bmi1* (*Bmi1*^{+/-}) en la línea *Bmi1*-CPC-GFP afectaría a los mecanismos de NHEJ reduciendo la eficiencia de transducción del vector lentiviral T-SV40.

La des-inmortalización de la línea *Bmi1*-CPC-YFP^{Inm} mediante inducción transitoria de la recombinasa Cre no es viable

La pérdida de T-SV40 tras la des-inmortalización provoca una bajada repentina en la proliferación y la entrada en senescencia

La estrategia para generar la línea inmortalizada fue planteada como un proceso de inmortalización reversible. El casete de inmortalización transducido en el genoma de las células *Bmi1*-CPC-YFP^{Inm} se presentaba flanqueado por dos secuencias LoxP, en repetición directa, lo que permitiría su delección al inducir la expresión de la recombinasa Cre. Esta estrategia ya había sido testada con éxito en otros tipos celulares, donde la reversión se confirmó efectiva y las células des-inmortalizadas pudieron ser mantenidas en cultivo, al menos durante un tiempo limitado que permitiera trabajar con ellas^{138,151,178,152}. En las *Bmi1*-CPC-YFP^{Inm}, se confirmó que el proceso de des-inmortalización era eficaz, eliminando completamente la expresión de los genes de inmortalización (**Figura 18**). Sin embargo, las *Bmi1*-CPC-YFP^{Inm-Rev} no eran viables, mostrando un bloqueo completo en su proliferación (**Figura 19**) y entrando de forma repentina en senescencia (**Figura 20**). Efectos similares asociados a la eliminación

genética de T-SV40 se han observado en otros modelos des-inmortalizados^{151,157}. Estos efectos se asocian a una súbita de-represión de p53 y un aumento en la expresión de genes como *p21* o *Cyclin-A2*, implicados en el control de la proliferación y la entrada en senescencia¹⁷⁹. Algunos estudios postulan que la inmortalización reversible mediante otros protocolos, como la combinación de *Bmi1* con *hTERT*, permite un proceso de des-inmortalización más tolerable¹⁵⁷. No obstante, como se expuso anteriormente, estos protocolos no eran compatibles con el mantenimiento de las características originales de los cultivos de Bmi1-CPC. Por esta razón, se optó por la utilización de T-SV40, a pesar de las posibles limitaciones asociadas.

Los efectos adversos en la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm} asociados al proceso de des-inmortalización no pudieron ser revertidos eficazmente

Para revertir o controlar los efectos adversos observados tras el proceso de des-inmortalización planteamos dos posibles estrategias. Inicialmente, tratamos de optimizar las condiciones de cultivo empleadas para las Bmi1-CPC buscando que estas fueran capaces de superar el estrés asociado a la pérdida del T-SV40. Testamos varios medios de cultivo empleados para mejorar la capacidad de mantener *in-vitro* progenitores cardíacos inducidos o células madre embrionarias en estado proliferativo y des-diferenciado^{139,140,141}. Sin embargo, al evaluar estos medios sobre las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} los resultados no fueron satisfactorios, produciéndose, nuevamente, una drástica disminución en la proliferación (**Figura 22**). Se observaron los mismos efectos sobre los cultivos primarios de Bmi1-CPC o al tratar de amplificar las células en los nuevos medios tras su extracción (*datos no mostrados, células no viables*). De esta forma, descartamos que el efecto fuera específico de la línea inmortalizada Bmi1-CPC-YFP^{Inm} o una consecuencia asociada al cambio repentino de las condiciones de cultivo. Por lo tanto, no fue posible mejorar las condiciones de cultivo empleadas previamente para el mantenimiento de las células Bmi1-CPC. EGF y FGF, presentes en el medio de cultivo estándar empleado para las Bmi1-CPC y retirados en los medios alternativos (**Tabla 4, Materiales y métodos**), se confirman como esenciales para el mantenimiento de estas células.

Paralelamente, tratamos de bloquear o retrasar la entrada en senescencia que observamos tras el proceso de des-inmortalización (**Figura 20**) usando inhibidores de rutas de señalización implicadas directamente en el SASP (**Figura 23**). La entrada en senescencia tras la reversión de la inmortalización es un efecto definido previamente en otros tipos celulares¹⁵⁷. Tratamientos basados en la inhibición del SASP, se han confirmado efectivos para retrasar la entrada en senescencia en diferentes modelos^{148,146}. Sin embargo, no fueron efectivos en las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm-Rev}. Únicamente el tratamiento con *Rapamicina* redujo el porcentaje de células senescentes, pero generando paralelamente una bajada en la proliferación celular (**Figura 24**); descartamos, por tanto, su aplicabilidad. Como se ha discutido anteriormente, algunos estudios muestran que los efectos negativos de la des-inmortalización de líneas celulares fueron más pronunciados cuando la inmortalización se basaba en la expresión de T-SV40^{151,157}. No obstante, en muchos modelos estos cultivos des-inmortalizados fueron viables^{138,151,178,152}; no fue así en nuestro modelo de Bmi1-CPC. No

obstante, consideramos que el modelo de Bmi1-CPC-YFP^{Inm} podría ser útil para el estudio de las Bmi1-CPC, al igual que numerosas líneas celulares son empleadas para estudios *in-vitro* en los que, de lo contrario, se tendría que trabajar con modelos celulares primarios^{165,180}.

La línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm} puede ser empleada como un modelo para el estudio de la población Bmi1-CPC

La línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm} mantiene las principales características de la población Bmi1-CPC

Antes de poder aplicar experimentalmente la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm}, debíamos confirmar que mantiene las principales características de las células Bmi1-CPC. Para ello, evaluamos la expresión de varios genes clave (**Figura 25**) o marcadores de membrana (**Figura 26**) que han sido empleados para definir a la población Bmi1-CPC.

Confirmamos que la mayoría de los genes analizados mantienen los niveles de expresión de la población original de Bmi1-CPC, aunque identificamos una disminución en la expresión de *VegfA* en las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Este efecto podría asociarse con el mantenimiento de los cultivos *in-vitro* fuera del microambiente perivascular en el que residen las Bmi1-CPC, y que afectaría a la expresión génica y a los factores que secretan, como se ha comprobado en otras poblaciones de progenitores^{122,130}. Además, las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} mostraron un aumento en la expresión génica de *Pdgfr α* comparadas con la población Bmi1-CPC-YFP. Estos resultados se replicaron en el análisis con citometría de flujo. El modelo Bmi1-CPC-YFP^{Inm} conservaba el patrón de expresión de los principales marcadores de membrana definidos para la población Bmi1-CPC (SCA1⁺/cKIT⁻/CD45⁻)²⁸. Sin embargo, mientras que las Bmi1-CPC están compuestas por una fracción CD31⁺ (85%) y una PDGFR α ⁺ (12%)¹⁰¹; en las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} la población PDGFR α ⁺ resultó mayoritaria, al mismo tiempo que la expresión de CD31 se perdía. Dentro de la población Sca1⁺, las células PDGFR α ⁺ han sido definidas como la subpoblación con mayor capacidad clonogénica²⁴. Por lo tanto, es posible que esta fracción de la población Bmi1-CPC fuera inmortalizada de forma más eficiente o que su mayor capacidad proliferativa se incrementara tras la expresión de T-SV40. De esta forma, las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm}/ PDGFR α ⁺ podrían haber superado a la población CD31, que se convirtió en minoritaria en el modelo Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Otra posibilidad es que el proceso de inmortalización afectara de forma directa a la expresión génica de las Bmi1-CPC; reduciendo la expresión de genes como *VegfA* o *CD31* e incrementando la de *Pdgfr α* . Estos efectos sobre la expresión génica han sido observados previamente, por ejemplo, al comparar células endoteliales primarias con líneas endoteliales inmortalizadas con T-SV40 combinado con hTERT¹⁸¹. Estas alteraciones se consideran como una consecuencia asumible del proceso de inmortalización, siempre que la identidad global de los cultivos originales se mantenga. No obstante, estas diferencias deben valorarse dentro de los experimentos realizados con modelos celulares inmortalizados.

Para confirmar que las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} podrían ser un modelo útil experimentalmente, realizamos un ensayo funcional frente a estímulos cuya respuesta ha sido definida previamente en las células Bmi1-CPC. Se ha podido observar un aumento en la expresión de *Bmi1* al exponer a las células Bmi1-CPC-Tomato a estímulos procedentes del endotelio, como VEGFA soluble en el medio de cultivo o el contacto directo con EPHRINB2 o EPHB4¹⁰⁷. Los resultados mostraron que las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} responden de forma similar al contacto con EPHRINB2 o EPHB4. El tratamiento con VEGFA también generó un aumento en la expresión de *Bmi1* (**Figura 28**), pero menor al observado en las Bmi1-CPC-Tomato primarias¹⁰⁷. Estos resultados mostraron a nivel funcional que las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} reproducen las principales características que definen a la población Bmi1-CPC; no obstante, la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm} podría presentar algunas alteraciones. Efectos similares asociados al proceso de immortalización se han definido, por ejemplo, en líneas celulares de CM; donde la línea inmortal HL-1 presenta diferencias en los flujos de Ca²⁺ si son comparadas con CM primarios¹⁸². No obstante, siempre que estas diferencias se consideren al evaluar los resultados, la utilización de líneas immortalizadas supone una gran herramienta para el estudio de los progenitores cardíacos adultos.

Como parte de la validación del modelo Bmi1-CPC-YFP^{Inm} realizamos un análisis citogénico que permitió identificar que esta línea estaba compuesta por una población heterogénea de células 2n diploides y 4n tetraploides (**Figura 27**). Este tipo de alteraciones cromosómicas es un fenómeno relativamente frecuente dentro de las líneas celulares immortalizadas. En concreto, se ha observado que el proceso de immortalización basado en la expresión de T-SV40 puede inducir diferentes alteraciones cromosómicas^{161,183,184}. No obstante, al trabajar sobre un cultivo primario especialmente sensible decidimos asegurar la eficiencia del procedimiento mediante este método, aunque pudiéramos comprometer en cierto punto la identidad del cultivo primario inicial. Afortunadamente, al igual que en nuestro modelo, la mayoría de estas alteraciones no generaron ningún efecto significativo sobre la identidad celular de las líneas inmortales^{183,184}. Sin embargo, será importante tener en cuenta estas alteraciones en futuros experimentos con la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm}.

La línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm} presenta una capacidad de respuesta a daño oxidativo similar a la población Bmi1-CPC

Una de las principales características de la población Bmi1-CPC es su capacidad de respuesta frente a daño oxidativo y su papel esencial en la respuesta al IAM^{105,101}. Parte del presente proyecto se enfocó en analizar los mecanismos moleculares implicados en la respuesta frente a daño oxidativo en las células Bmi1-CPC. Para ello, tratamos de optimizar un modelo de daño que permitiera estudiar estos procesos *in-vitro* e *in-vivo* como una primera aproximación experimental antes de inducir un IAM mediante cirugía en modelos murinos.

Para este modelo de daño propusimos la aplicación de Paraquat (PQ). El PQ es un potente agente inductor de daño oxidativo mediante la generación de ROS mitocondriales en la cadena de transporte electrónico¹⁶². El tratamiento con PQ ha sido empleado en numerosos estudios centrados en los mecanismos implicados en el daño cardíaco severo, tanto *in-*

vitro^{103,107,70} como *in-vivo*^{185,186}. En nuestro caso, expusimos en paralelo a las células Bmi1-CPC-Tomato y Bmi1-CPC-YFP^{Inm} a daño inducido por concentraciones crecientes de PQ durante 12h. Observamos que esta inducción de daño incrementó de forma progresiva el porcentaje de muerte celular (DAPI⁺/PI⁺) en ambos modelos (**Figura 29**), por lo que la aplicación del tratamiento se consideró efectiva. Además, ambos modelos presentaron una tolerancia comparable frente a este tipo de daño, ya que los porcentajes de células muertas observados en cada caso fueron similares. Analizamos la expresión de varios genes marcadores cuya sobre-expresión se han definido como biomarcadores de respuesta al daño cardíaco inducido por PQ¹⁶³. Confirmamos un aumento significativo de estos marcadores, tanto en las células Bmi1-CPC-Tomato como en las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} (**Figura 30**). No obstante, se pudo apreciar que el aumento de la expresión de dichos genes fue mayor en el modelo Bmi1-CPC-YFP^{Inm}, lo que apuntarían a una respuesta más eficiente frente a daño oxidativo. Estas diferencias podrían ser esperables y asociadas al proceso de immortalización ya que, generalmente, las líneas celulares estables presentan una mayor tolerancia frente a diferentes tipos de daño que los cultivos celulares primarios^{187,188}.

Identificación de los mecanismos implicados en la relación de tipo cross-talk entre las células Bmi1-CPC y su nicho vascular

El trabajo publicado por *D. Herrero et al* postuló por primera vez que el endotelio cardíaco podría estar actuando como un componente principal del nicho donde residirían las células Bmi1-CPC¹⁰⁷. La posibilidad de definir un nicho para esta población de progenitores, y los mecanismos que median en esa relación, resultaría de gran valor para su caracterización. Sin embargo, en el corazón, debido a la controversia sobre la existencia de una población de progenitores adultos definida (**Introducción, Figura 5**), no existe un consenso sobre la localización de un nicho cardíaco aceptado. O viceversa, ya que la identificación de un nicho cardíaco, junto con las células que lo estructuran, podría ayudar a definir la población o poblaciones de progenitores responsables de la renovación celular descrita en el corazón¹⁸⁹.

B Galvez et al. definieron previamente la relación entre la vasculatura cardíaca y poblaciones de progenitores en ratones jóvenes, con una mayor capacidad de regeneración¹⁹⁰. Estudios posteriores postularon la existencia de un nicho cardíaco en la zona del epicardio, en el que residiría una población de progenitores adultos que presentan un metabolismo preferentemente glucolítico; esta parte del corazón se caracteriza por encontrarse altamente vascularizada¹⁰⁶. También se han identificado en el corazón poblaciones similares a células madre mesenquimales que residen en zonas perivasculares⁷⁴. Éstas presentan algunas características similares a la población Bmi1-CPC (SCA1⁺ PDGFR α ⁺) y podrían tratarse incluso de poblaciones solapantes. Estos antecedentes nos permitieron plantear la posible relación de tipo nicho entre la población Bmi1-CPC y el endotelio cardíaco.

Además, recientes estudios mostraron que las MuSC¹²² o las NSC¹³⁰ mantienen una relación dinámica con su nicho vascular. Al igual que el endotelio controla el comportamiento de estas poblaciones, los factores secretados por ellas afectan directamente al mantenimiento

óptimo del endotelio. Estudios previos demostraron que las Bmi1-CPC participan directamente en la revascularización de la zona dañada tras IAM, dando lugar a aproximadamente el 20% de las EC que forman las estructuras vasculares generadas *de novo* tras infarto¹⁰¹. Este porcentaje es fundamental en el proceso de regeneración/reparación; los animales deficientes de la población Bmi1-CPC que son sometidos a un IAM reducen su capacidad de supervivencia en un 50%. Este efecto se asoció a una respuesta angiogénica deficiente, observándose una reducción en las estructuras vasculares maduras de las áreas adyacentes al infarto¹⁰¹. No obstante, resulta llamativo que una deficiencia en el 20% de la población de EC tenga un efecto tan importante sobre la supervivencia de los animales. Estos resultados nos hicieron plantearnos que las Bmi1-CPC podrían estar afectando a las EC mediante otros mecanismos, no solo diferenciándose hacia ellas; postulándose una relación de tipo *cross-talk* entre las Bmi1-CPC y su nicho endotelial.

El secretoma de las células Bmi1-CPC contiene factores relacionados con la angiogénesis y se ve afectado por la inducción de daño oxidativo severo

La primera aproximación que planteamos para tratar de conocer si existía una relación entre las Bmi1-CPC y el endotelio cardíaco fue estudiar el secretoma de estos progenitores mediante un *array* de proteínas enfocado a factores relacionados con angiogénesis. Además, comparamos los resultados obtenidos al analizar el medio condicionado generado por cultivos de células primarias con el medio generado por la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm}, como parte de la validación de dicha línea. Pudimos observar que ambos modelos celulares liberan al medio varios factores que podrían estar afectando al endotelio. El factor más abundante en ambos casos fue CXCL12 (**Figura 31**). CXCL12 es una importante quimioquina que desempeña un papel fundamental durante el desarrollo embrionario, la hematopoyesis, procesos de inflamación y angiogénesis. Actúa directamente sobre diversos tipos celulares, entre ellos diferentes poblaciones de progenitores y, especialmente, las EC; teniendo un papel fundamental en la inducción de la migración celular¹³⁴.

Los dos siguientes factores más abundantes también fueron comunes para los dos modelos celulares, poniendo de manifiesto una importante actividad de las Bmi1-CPC en el modelado de la matriz extracelular. En las Bmi1-CPC-Tomato se detectó la expresión de SERPINA-E1 seguida de Metaloproteinasa de Matriz-3 (MMP-3); en las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} fue al contrario (**Figura 31**); no obstante, en ambos casos las diferencias de expresión fueron mínimas. SERPINA-E1, controla la deposición de matriz extracelular en diferentes tejidos. Se ha visto que desempeña un papel fundamental en la regulación de la adhesión celular, migración, invasión y en la regeneración tras daño¹⁹¹. En el corazón, se ha comprobado que los animales deficientes de SERPINA-E1 desarrollan fibrosis de manera espontánea¹⁹¹, sugiriendo un importante papel cardioprotector mediante el mantenimiento de la integridad del tejido cardíaco y la estabilidad de la permeabilidad microvascular¹⁹². MMP-3 es una de las metaloproteinasas de matriz más importantes y degrada diferentes componentes de la matriz extracelular, afectando directa o indirectamente a la actividad de diferentes factores de crecimiento y citoquinas¹⁹³. Se ha comprobado que actúa en la respuesta angiogénica tras

daño cardíaco por isquemia-reperfusión¹⁹⁴, así como en otros procesos relacionados con el remodelado del tejido cardíaco¹⁹⁵. Destaca igualmente la presencia de VEGF-A en el medio condicionado de las Bmi1-CPC-Tomato, también detectado en las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} aunque a una concentración relativa menor (**Figura 31**). VEGF-A es un factor fundamental para el desarrollo de la vasculatura y el mantenimiento de la integridad de los vasos en homeostasis o en procesos de angiogénesis en condiciones patológicas¹⁹⁶. En el corazón, se ha descrito que juega un papel fundamental en la revascularización de la zona afectada tras daño severo¹⁹⁷. En el medio condicionado de las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} cabría destacar también la presencia de OSTEOPONTINA (OPN), una citoquina pro-inflamatoria que afecta directamente a la vasculatura en condiciones de estrés¹⁹⁸. De hecho, existen numerosos estudios clínicos que relacionan su actividad como marcador o indicador de diferentes vasculopatías cardíacas^{199,200}.

Adicionalmente, estudiamos la composición del medio condicionado de ambos modelos tras la inducción de daño oxidativo inducido por PQ. En términos generales, observamos una disminución de la concentración de los factores secretados por las Bmi1-CPC-Tomato (**Figura 32**), por lo que supusimos que el daño oxidativo inducido por PQ afecta de forma directa a su capacidad secretora. Este efecto no fue observado en las Bmi1-CPC-YFP^{Inm}; al contrario, algunos de los factores presentaban una intensidad relativa mayor que el máximo presente en condiciones de homeostasis (**Figura 32**). Estos efectos podrían relacionarse con el mayor aumento en la expresión de los genes de respuesta frente a daño por PQ observada en las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} (**Figura 30**). Una respuesta frente a daño más eficiente podría permitir que las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} mantuvieran su capacidad secretora mientras que en las Bmi1-CPC-Tomato se vea comprometida. En cuanto al patrón de factores identificados, también se observaron diferencias. En las Bmi1-CPC-Tomato, el factor más abundante fue OPN. A continuación, se detectó nuevamente SERPINA-E1, seguida de CXCL12 y VEGF (**Figura 32B**). En el caso de las Bmi1-CPC-YFP^{Inm}, el factor más abundante fue MMP-3, seguido de CXCL12, que presentaba niveles de intensidad relativa ligeramente superiores a los observados en homeostasis. Seguidamente, se detectaron según su intensidad relativa SERPINA-E1, OPN, PIGF-2 y VEGF-A (**Figura 32D**). Los cambios en el patrón de los factores presentes en el medio condicionado apuntarían a que las Bmi1-CPC son capaces de responder frente a daño oxidativo modificando su secretoma. Estos resultados indicarían que las Bmi1-CPC podrían participar de forma paracrina en la respuesta frente a daño cardíaco. Esta capacidad se ha observado en otras células progenitoras, como las células madre mesenquimales (MSC), que modulan los factores que secretan en función de diferentes estímulos, como señales solubles, estrés mecánico o variaciones en los niveles de estrés oxidativo²⁰¹.

Varios procesos relacionados con la respuesta frente a daño cardíaco podrían verse regulados por los factores secretados por las Bmi1-CPC. El aumento en la secreción de OPN promovería una respuesta pro-inflamatoria^{198,199,200}; el proceso de inflamación tras IAM se considera clave para la activación de la regeneración cardíaca²¹. En base a la presencia de SERPINA-E1 y MMP-3, las Bmi1-CPC parecen tener un papel fundamental en la degradación de la matriz extracelular, proceso de vital importancia para la remodelación del tejido cardíaco,

necesaria tras daño¹⁵. Por último, se detectaron altos niveles de CXCL12 y VEGF-A, factores que actúan directamente sobre las EC y que se ha comprobado que participan en el proceso de revascularización de la zona dañada tras IAM¹³⁶. La presencia de CXCL12 y VEGF-A entre los factores secretados por las Bmi1-CPC, tanto en homeostasis como en condiciones de daño, apuntan hacia la potencial capacidad de éstas para actuar sobre el endotelio cardíaco; proponiendo a una posible relación de *cross-talk* entre las Bmi1-CPC y su nicho vascular.

Las células Bmi1-CPC inducen la migración endotelial y la angiogénesis mediante señales paracrinas

Uno de los principales fenómenos observados en los mecanismos de *cross-talk* identificados en MuSC¹²² y NSC¹³⁰, es que estas poblaciones de progenitores secretan factores capaces de inducir la migración del endotelio. De esta forma, promueven que las estructuras vasculares se desarrollen en su proximidad y favorecen la relación de tipo nicho entre ambos tipos celulares. Tras identificar factores como CXCL12 y VEGF-A en el medio condicionado de las Bmi1-CPC, estudiamos si estas células presentaban una capacidad similar.

Realizamos ensayos de migración en *transwell* sobre la línea endotelial inmortalizada 1g11. Dada la complicación para realizar estos experimentos con cultivos celulares primarios, y viendo que la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm} mantiene las principales características del secretoma de las Bmi1-CPC-Tomato, decidimos realizar estos experimentos con la línea inmortalizada. Observamos que los factores secretados por las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} presentaban una gran capacidad para inducir la migración endotelial; significativamente mayor que otros tipos celulares (**Figura 33**). El principal candidato para modular este mecanismo fue CXCL12, dado que fue el factor más abundante entre los identificados en el secretoma de las Bmi1-CPC (**Figura 31**) y su capacidad para inducir la migración endotelial ha sido ampliamente confirmada¹³⁴. Tras la inhibición de CXCR4, principal receptor de CXCL12, se redujo drásticamente la migración endotelial observada, alcanzando los niveles de los controles celulares externos (MEFs) y confirmando que CXCL12 juega un papel fundamental en la inducción de la migración endotelial (**Figura 34**). Estos resultados apuntaron hacia un mecanismo en el que las Bmi1-CPC secretarían CXCL12 para inducir la migración de la vasculatura cardíaca en su proximidad, favoreciendo la interacción entre ambos tipos celulares (**Figura 50**).

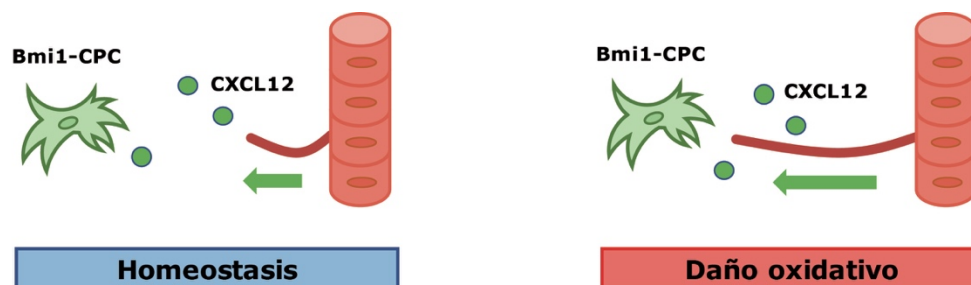


Figura 50: La secreción de CXCL12 por las células Bmi1-CPC induciría la migración endotelial en su proximidad, efecto más pronunciado en condiciones de daño oxidativo moderado.

Esta relación de *cross-talk* entre progenitores y vasculatura se ha mostrado especialmente importante en procesos de regeneración tras daño. Estudios realizados sobre MuSC, demostraron que la modificación de la capacidad secretora de estas células afecta directamente a la revascularización de la zona dañada en el músculo esquelético¹³². Dado que las células Bmi1-CPC participan activamente en el proceso de revascularización tras IAM¹⁰¹, evaluamos los efectos de la inducción de daño oxidativo en su capacidad para inducir la migración endotelial. Observamos que en condiciones de estrés oxidativo moderado generado por el tratamiento con PQ 5mM, se aumentaba la migración endotelial respecto a los resultados en homeostasis. Sin embargo, al incrementarse la concentración de PQ (hasta 8mM) se observaron resultados contrarios, reduciéndose la migración endotelial (**Figura 35**). En base a estos resultados, en condiciones de daño oxidativo severo la capacidad secretora de las Bmi1-CPC podría verse comprometida. Igualmente, es posible que en dichas condiciones se reduzca la capacidad de migración de las EC. No obstante, en ambas concentraciones de PQ se pudo confirmar que CXCL12 desempeña un papel fundamental en la inducción de la migración endotelial (**Figura 35**). Trabajos realizados en el laboratorio de la *Dra. K Red-Horse* sobre ratones neonatales mostraron un aumento de los niveles de CXCL12 tras la inducción de IAM. Este efecto es fundamental para la migración de las EC hasta la zona afectada por el infarto, permitiendo su revascularización¹³⁵. Estudios adicionales realizados en pez cebra confirmaron que tras daño cardíaco se produce un aumento de los niveles de CXCL12 en el epicardio adyacente a la zona dañada. Este aumento tiene un papel esencial en la reparación del tejido cardíaco tras daño¹³⁶. Previamente, se ha demostrado que las Bmi1-CPC tienen una actividad especialmente importante en la zona periférica al infarto, diferenciándose a los principales tipos celulares cardíacos, especialmente hacia EC¹⁰¹. Los resultados obtenidos apuntarían a que, además de generar células *de novo*, las Bmi1-CPC podrían participar de forma paracrina en el proceso de revascularización de la zona afectada por IAM mediante la generación de un gradiente de CXCL12.

Para un proceso de revascularización efectivo, además de producirse la migración de EC, deberían generarse estructuras vasculares funcionales, es decir, angiogénesis^{101,135,168}. Por lo tanto, testamos si los factores liberados por las Bmi1-CPC eran capaces de inducir este fenómeno sobre la línea inmortalizada endotelial 1g11. Observamos que las Bmi1-CPC eran capaces de favorecer la angiogénesis únicamente en homeostasis, siendo mayores los efectos del medio condicionado generado por los cultivos primarios (Bmi1-CPC-Tomato) (**Figura 36**). Estas diferencias podrían deberse a las variaciones observadas entre los factores identificados en el medio condicionado de ambos modelos de Bmi1-CPC. Además, pudimos confirmar que este efecto no depende de la acción de CXCL12 (**Figura 37**), por lo que factores adicionales presentes en el secretoma de las Bmi1-CPC serían los principales mediadores. No obstante, serían necesarios estudios complementarios para poder identificar los factores responsables de la capacidad pro-angiogénica de las Bmi1-CPC. Estos resultados indicarían que las Bmi1-CPC son capaces de favorecer el desarrollo de vasos sanguíneos en su proximidad, propiciando la relación de tipo nicho entre ambos tipos celulares (**Figura 51**).

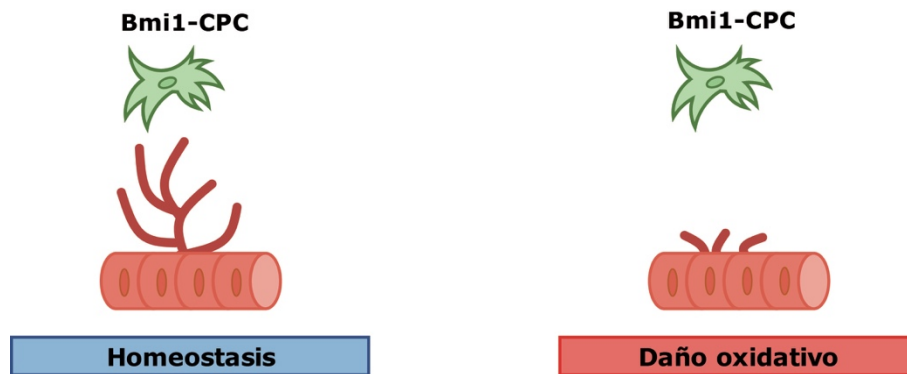


Figura 51: Los factores secretados por las células Bmi1-CPC inducirían angiogénesis en su proximidad; dicho efecto se inhibe en condiciones de daño oxidativo.

A diferencia de los resultados obtenidos en MuSC¹²² y NSC¹³⁰, donde VEGF-A actúa como principal mediador del mecanismo de *cross-talk*, en el caso de las Bmi1-CPC, parece que este efecto se debe en gran parte a la acción de CXCL12; aunque otros factores podrían estar implicados. Sin embargo, la capacidad angiogénica de las Bmi1-CPC fue completamente inhibida en condiciones de daño oxidativo (**Figura 36**). Estas observaciones resultan en parte contradictorias, ya que estudios anteriores han comprobado que los factores secretados por células madre mesenquimales favorecen la angiogénesis tras IAM, mejorando la función cardíaca¹³³. Además, se ha definido previamente que CXCL12 desempeña un papel fundamental en este proceso²⁰². Es posible que las condiciones de daño *in-vitro* en las que se realizaron estos experimentos fueran demasiado agresivas y que la línea endotelial 1g11 viera comprometida su capacidad de formar estructuras vasculares. Además, la participación de otros tipos celulares o el efecto del microambiente del tejido cardíaco podría influenciar la formación de estructuras vasculares. Estudios *in-vivo* permitirían elucidar el papel real de la secreción de CXCL12 por parte de la población Bmi1-CPC en el proceso de revascularización tras IAM.

Las células endoteliales protegen a las Bmi1-CPC frente al daño oxidativo

Adicionalmente, tratamos de definir si la acción del secretoma de la población Bmi1-CPC podrían estar afectando a otros procesos dentro del tejido cardíaco. Estudios anteriores han definido que la acción paracrina de las células progenitoras cardíacas Sca1⁺ presenta propiedades protectoras frente a daño cardíaco²⁰³. Se ha definido que el secretoma de una subpoblación de SCA1⁺CD31⁻ presenta propiedades protectoras sobre CMs¹⁶⁵; este efecto es principalmente mediado por la acción de MCP-1, factor que también es secretado por las células Bmi1-CPC. En base a este y otros factores identificados en el secretoma de las Bmi1-CPC, postulamos que estas células podrían tener un papel dentro de este efecto protector.

Los experimentos de co-cultivo en condiciones de daño mostraron que la acción de las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} no mejora la supervivencia frente a daño en modelos de los tipos celulares mayoritarios que se componen en el corazón: células endoteliales (1g11), CM (HL-1) y

fibroblastos (MEFs) (**Figura 41**). Sin embargo, los co-cultivos con la línea endotelial 1g11 mostraron un efecto protector sobre las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} (**Figura 42A**), efecto específico de la interacción entre estos tipos celulares (**Figura 43**). Estos resultados reforzaron la hipótesis de una relación de tipo nicho entre la vasculatura cardíaca y la población Bmi1-CPC. Este efecto de protección por parte del nicho endotelial se ha definido previamente en otros modelos; por ejemplo, en las células madre hematopoyéticas al ser expuestas a daño por radiación²⁰⁴. De hecho, se ha comprobado que el nicho vascular tiene un papel fundamental en las terapias celulares frente a IAM basadas en MSC. Las MSC se emplazan en el nicho vascular dentro del tejido dañado, protegiéndose del intenso estrés oxidativo presente en el corazón y mejorando la regeneración cardíaca²⁰⁵. Nuestros resultados apuntarían a un efecto similar, las EC estarían favoreciendo la supervivencia de la población Bmi1-CPC en condiciones de daño. Esto permitiría a las células Bmi1-CPC resistir el alto estrés oxidativo generado tras IAM y favorecería su papel en la regeneración del tejido. No obstante, se requieren más estudios para discernir los mecanismos moleculares que mediarían en este efecto protector.

Las células endoteliales modulan el comportamiento de las Bmi1-CPC mediante contacto directo

Los resultados obtenidos en los trabajos previos realizados por nuestro grupo mostraron que el contacto directo entre las Bmi1-CPC y el endotelio aumentaba la expresión de *Bmi1*, reducía la proliferación de las Bmi1-CPC y sus niveles de ROS intracelular. Mediante RNAseq comparado entre la población Bmi1-CPC y Sca1⁺Bmi1⁻ de la fracción no miocítica del corazón (la población más cercana a las Bmi1-CPC), se observó una sobre-expresión de varios genes implicados en la ruta de *Notch*¹⁰⁷. Estudios previos han definido la implicación de diferentes ligandos de la ruta de *Notch* expresados por el nicho vascular en la regulación por contacto directo de células progenitoras hematopoyéticas¹²³, musculares¹²⁴ o neurales¹²⁵.

En base a estos antecedentes, planteamos que la ruta de *Notch* podría ser uno de los mecanismos moleculares implicados en la interacción entre el endotelio y la población Bmi1-CPC. Para testar esta hipótesis, realizamos experimentos de co-cultivo directo entre las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} y EC, y evaluamos las variaciones en los niveles de expresión de varios genes implicados en la ruta de *Notch*. Los primeros experimentos de co-cultivo entre las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} y EC de la línea inmortalizada 1g11 no mostraron diferencias respecto a las células cultivadas individualmente (**Figura 45**). Sin embargo, al ser comparadas con células endoteliales primarias cardíacas (pCEC), las células 1g11 presentaban una deficiencia en la expresión de Dll4, ligando canónico de los receptores transmembrana de *Notch*¹¹⁹ (**Figura 46**). Estas alteraciones en la expresión génica pueden ser una consecuencia directa del proceso de immortalización necesario para generar una línea de células endoteliales estable¹⁸¹. Al realizar nuevamente los experimentos de co-cultivo directo entre las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} y pCEC, observamos un aumento generalizado en la expresión de varios genes regulados por la ruta de *Notch* (**Figura 47**). Estos resultados confirmaron que el contacto directo con pCEC activa la ruta de *Notch* en las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Además, postularon a Dll4 expresado en el endotelio cardíaco como principal mediador de esta activación. Se ha demostrado que la

señalización mediante Dll4 por parte del nicho endotelial de las HSC regula directamente los procesos de diferenciación hacia los distintos linajes hematopoyéticos¹²¹. Este mecanismo también ha sido definido entre las MuSC y la vasculatura del músculo esquelético. Las EC expresan Dll4, activando la ruta de *Notch* en las MuSC; esta activación reduce la proliferación de las células progenitoras manteniéndolas en un estado quiescente¹²². Dicha interacción es fundamental para el mantenimiento de las MuSC, previniendo una activación excesiva que conduciría a un agotamiento prematuro de la población¹⁰⁹. Los resultados obtenidos en las células Bmi1-CPC postulan un mecanismo similar. Las células endoteliales cardíacas expresarían Dll4 en su membrana, que activaría la ruta de *Notch* en las Bmi1-CPC, reduciendo su proliferación y favoreciendo un estado quiescente que permitiría su mantenimiento. Este mecanismo respaldaría los resultados previos del grupo, que indican que existe una relación inversa entre la distancia de las Bmi1-CPC al endotelio cardíaco y su estado proliferativo; las Bmi1-CPC más cercanas al endotelio se encuentran en un estado quiescente¹⁰⁷.

Otro de los efectos observados en las células Bmi1-CPC tras el co-cultivo directo con pCEC fue una reducción significativa de los niveles de ROS intracelular. El microambiente en el que residen las Bmi1-CPC, próximas al endotelio, también se ha caracterizado por presentar un bajo estrés oxidativo. Variaciones en los niveles de ROS de diferentes modelos murinos alteraron esta relación de tipo nicho entre las Bmi1-CPC y el endotelio cardíaco¹⁰⁷. Previamente, se pudo definir que alteraciones en los niveles de ROS afectaban a la función de *Bmi1*, promoviendo la diferenciación de la población Bmi1-CPC hacia los diferentes linajes celulares del corazón¹⁰³. Estos resultados apuntan hacia un papel fundamental de la regulación de los niveles de ROS por parte del nicho endotelial en el mantenimiento de Bmi1-CPC. La regulación de los niveles de ROS se ha confirmado como un mecanismo central para el mantenimiento de diferentes poblaciones de progenitoras, previniendo su entrada en senescencia²⁰⁶. Por lo tanto, nos cuestionamos cuáles podrían ser los mecanismos moleculares implicados en la disminución de ROS intracelular observada en las células Bmi1-CPC-YFP^{nm} tras el co-cultivo con pCEC¹⁰⁷. Para ello, evaluamos la expresión de varios genes implicados en procesos celulares claves en la regulación de los niveles de ROS, la autofagia y el metabolismo.

Estudios anteriores han comprobado que la regulación de la autofagia es esencial para prevenir la entrada prematura en senescencia por un aumento de los niveles de estrés oxidativo¹²⁷. Las Bmi1-CPC-YFP^{nm} co-cultivadas mostraron una disminución significativa en los niveles de expresión de *Bnip3* y *Bnip3L* (**Figura 48**), fundamentales en el proceso de autofagia mitocondrial (mitofagia)²⁰⁷. Además, se ha podido confirmar que los niveles de *Bmi1* afectan directamente a la regulación de la autofagia²⁰⁸, por lo que el aumento de *Bmi1* observado en los co-cultivos¹⁰⁷ podría tener consecuencias sobre estos mecanismos. Estos resultados preliminares sugieren que la relación entre el endotelio y las Bmi1-CPC podría inducir alteraciones del flujo autofágico para regular los niveles de ROS intracelular. No obstante, estudios adicionales serían necesarios para conocer los mecanismos implicados. Otro de los procesos esenciales para la regulación de los niveles de ROS intracelular es el control de la actividad metabólica. Las células madre hematopoyéticas residen en condiciones de

homeostasis en su nicho vascular, que favorece su mantenimiento en un estado quiescente con una actividad metabólica reducida, preferentemente glucolítica para evitar la formación de ROS¹²⁸. Igualmente, en estudios realizados en pez cebra, se ha podido observar una regulación de la actividad metabólica de las EC como parte del proceso de revascularización tras daño cardíaco¹⁶⁸. Al evaluar los efectos del co-cultivo con células pCEC sobre la expresión génica de las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} (**Figura 48**), pudimos observar una disminución en la expresión de *Apelina*, un regulador del metabolismo que activa la adquisición y consumo de glucosa y ácidos grasos²⁰⁹. Por lo tanto, una disminución en su expresión podría relacionarse con una ralentización del metabolismo en las Bmi1-CPC-YFP^{Inm} en co-cultivo. Además, se observó paralelamente una disminución de la expresión de *Ppargc1a*, uno de los principales reguladores del metabolismo oxidativo, así como de algunos de sus targets directos, como *Atp5j*²⁰⁹. Estas modificaciones en la expresión génica inducidas por el contacto directo con las pCEC, favorecerían el mantenimiento de las Bmi1-CPC en un estado de baja actividad metabólica, con un flujo metabólico menos oxidativo y más glucolítico; reduciendo la producción de ROS y permitiendo su mantenimiento en un estado quiescente.

Mecanismos conservados están implicados en el nicho de las Bmi1-CPC

Algunas de las características propias del nicho propuesto para las Bmi1-CPC han sido definidas previamente en el estudio de otras poblaciones de progenitores. Esto refuerza la validez de los resultados obtenidos en este proyecto y apunta hacia mecanismos conservados que serían esenciales para el mantenimiento de poblaciones de células progenitoras adultas. Por ejemplo, en los nichos hematopoyético¹¹⁷ y neural¹¹⁵, al igual que en el caso de las Bmi1-CPC, el endotelio desempeña un papel fundamental. Se ha descrito que la activación de la ruta de *Notch* en las HSC por parte del nicho hematopoyético controla su estado proliferativo¹²³ y diferenciación hacia los diferentes linajes¹²¹, además de generar un microambiente con bajo ROS que favorece su mantenimiento¹²⁸. Igualmente, las NSC dependen de la activación de *Notch* por contacto directo con su nicho endotelial para mantener su capacidad progenitora¹²⁵ y son capaces de secretar factores que afectan directamente al comportamiento del endotelio¹³⁰.

No obstante, los resultados obtenidos en las células Bmi1-CPC se asemejan en gran medida a los mecanismos de regulación descritos para las MuSC. Se ha observado que la señalización de Dll4-Notch por parte del endotelio es fundamental para el control de la proliferación de las MuSC, manteniendo la población en un estado quiescente que evita su agotamiento¹²². De igual forma, las MuSC son capaces de secretar diferentes factores que modulan el estado de su nicho vascular en condiciones de homeostasis¹²² o frente a daño¹³². Además, alteraciones en la regulación de la autofagia o el metabolismo afectan directamente al comportamiento de las MuSC^{109,127}. Recientemente, se ha descrito un innovador mecanismo en pez cebra. Tras la inducción de daño, una subpoblación de los macrófagos residentes co-localizan e interaccionan junto con las MuSCs en el límite de la zona dañada. Estos macrófagos inducen la proliferación de las MuSCs, tras lo cual se disocian; este estado se ha denominado nicho pro-proliferativo transitorio. La depleción de esta población de macrófagos provoca una

reducción en la capacidad regenerativa del músculo²¹⁰. Igualmente, se ha confirmado que una población de macrófagos residentes participa en la homeostasis del corazón de mamíferos adultos. Eliminan material dañado (fundamentalmente mitocondrias), en un proceso controlado por la maquinaria de autofagia de los CM, estimulada tras estrés cardíaco²¹¹. Esta nueva regulación de la homeostasis cardíaca, junto con la presencia en el secretoma de las Bmi1-CPC de factores pro-inflamatorios, sugieren que subpoblaciones de macrófagos cardíacos podrían tener un papel relevante dentro del nicho de las Bmi1-CPC. La interacción de tipos celulares adicionales con el nicho endotelial descrito en la presente tesis doctoral abriría un nuevo campo de investigación en la regulación de las poblaciones de progenitores cardíacos.

Observaciones globales

Finalmente, podemos considerar que la línea celular inmortalizada Bmi1-CPC-YFP^{Inm} es un modelo aplicable al estudio de la población Bmi1-CPC, ya que reproduce sus principales características definitorias. El uso de este modelo nos ha permitido definir un mecanismo de *cross-talk* entre las células Bmi1-CPC y su nicho endotelial. Las Bmi1-CPC secretarían factores como CXCL12 que favorecerían el desarrollo de la vasculatura en su proximidad; esto favorecería su contacto directo con el endotelio cardíaco. La señalización célula-célula entre ambos tipos celulares regularía diferentes mecanismos moleculares en las células Bmi1⁺, como la ruta de *Notch*, el flujo mitofágico o la actividad metabólica. Esta interacción mantendría a estos progenitores en un estado poco proliferativo que permitiría una producción controlada de ROS. Además, la generación de un microambiente favorable en la proximidad del endotelio protegería a las Bmi1-CPC del aumento de estrés oxidativo asociado a daño y favorecería su participación en el proceso de reparación/regeneración (**Figura 52**). Algunos de los elementos que participan en esta interacción, como la señalización dependiente de Dll4, han sido observados en otras poblaciones de progenitores adultos^{122,121}. Estos resultados apuntarían hacia mecanismos conservados implicados en el mantenimiento de estas poblaciones. No obstante, experimentos con modelos deficientes de Dll4 ayudarían a confirmar la relevancia de esta ruta de señalización. Además, estudios comparativos entre diferentes poblaciones de progenitores, junto con la modelización de su nicho vascular, serán necesarios para confirmar esta hipótesis.

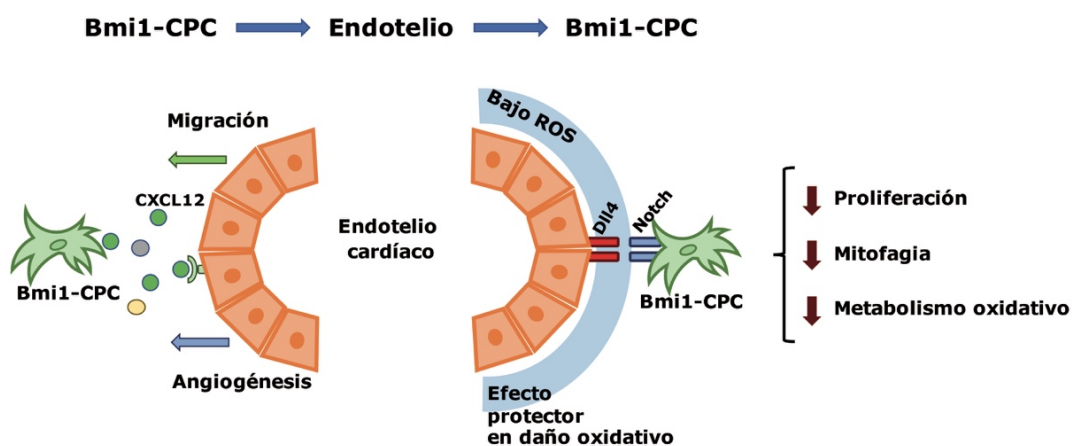


Figura 52: Relación de tipo *cross-talk* entre la población Bmi1-CPC y su nicho endotelial.

El daño asociado a episodios de IAM es uno de los principales problemas de salud pública en la actualidad. Los últimos ensayos clínicos que evaluaron terapias celulares frente a estas patologías reflejaron efectos positivos, aunque limitados, debidos principalmente a efectos indirectos²¹². Dada la reducida capacidad que han mostrado las células exógenas para integrarse en el tejido cardíaco y diferenciarse a los linajes celulares, los factores secretados por las células progenitoras adquirieron una especial relevancia^{22,213}. Los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral postulan que la acción paracrina de las Bmi1-CPC podría tener una gran influencia en el proceso de revascularización observado en modelos murinos. Para definir estos mecanismos, nos centramos en experimentos *in-vitro*. Por tanto, la aplicación de modelos *in-vivo* será esencial para confirmar la relevancia de los factores secretados por las Bmi1-CPC en el proceso de reparación/regeneración cardíaca tras infarto y en la relación con su nicho vascular. Definir los mecanismos que regulan a las poblaciones de progenitores y su respuesta frente a daño cardíaco podría abrir la puerta al diseño de nuevas terapias basadas en la potenciación de la reparación/regeneración intrínseca del corazón

CONCLUSIONES

Conclusiones

- 1.** La estrategia de immortalización basada en un vector lentiviral inductor de la expresión de T-SV40 ha resultado efectiva para generar una línea celular derivada de la población Bmi1-CPC. Las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} mantienen una proliferación estable y una expresión constante de los genes de immortalización y selección negativa.
- 2.** Las células Bmi1-CPC haploinsuficientes para *Bmi1* (*Bmi1*^{+/-}) no pudieron ser immortalizadas de forma efectiva mediante la transducción con un vector lentiviral inductor de la expresión de T-SV40. La expresión deficiente de *Bmi1* podría afectar negativamente a la integración del vector lentiviral al participar en la regulación de los mecanismos de NHEJ.
- 3.** La estrategia de des-immortalización mediante inducción de la recombinasa Cre en la línea Bmi1-CPC-YFP^{Inm} no resultó viable. Las células des-immortalizadas detenían súbitamente su proliferación y entraban de manera repentina en senescencia.
- 4.** Las células de la línea immortalizada Bmi1-CPC-YFP^{Inm} reproducen las principales características en cuanto a expresión génica y marcadores de membrana que caracterizan a la población Bmi1-CPC.
- 5.** Las células Bmi1-CPC-Tomato y Bmi1-CPC-YFP^{Inm} presentan una sensibilidad similar al daño oxidativo inducido por PQ. No obstante, la respuesta a daño a nivel de expresión génica por parte de las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} fue más eficiente.
- 6.** El secretoma de las células Bmi1-CPC-Tomato y Bmi1-CPC-YFP^{Inm}, en condiciones de homeostasis, presenta una composición similar, rica en factores pro-angiogénicos; en ambos casos el factor detectado más abundante fue CXCL12. Sin embargo, al comparar ambos modelos en condiciones de daño oxidativo se observaron variaciones relativas en las concentraciones de algunos factores.
- 7.** Los factores secretados por las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} y Bmi1-CPC-Tomato favorecen la migración y angiogénesis de la línea endotelial 1g11, principalmente mediados por la acción de CXCL12. En condiciones de daño oxidativo los efectos en migración se potencian mientras que la estimulación de la angiogénesis se inhibe.

Conclusiones

- 8.** El co-cultivo con la línea celular endotelial 1g11 protege a las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm} del daño oxidativo inducido por PQ. Este efecto es específico de la interacción entre ambos tipos celulares.
- 9.** El co-cultivo con pCEC activa la ruta de *Notch* en las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. La expresión del ligando de Notch, Dll4, en las células endoteliales primarias se postula como el principal mediador de esta activación.
- 10.** El co-cultivo con pCEC altera la expresión de genes relacionados con la regulación de autofagia y el metabolismo en las células Bmi1-CPC-YFP^{Inm}. Esta relación podría afectar a los niveles de ROS intracelular de las células Bmi1-CPC.

BIBLIOGRAFÍA

1. Weels M. The evolution of circulatory system. Phylogenetic Models in Functional Coupling of the CNS and the Cardiovascular System. 1992. Vol. 11, pp 5-14. *Karger Publishers*
2. Monahan-earley R, Dvorak AM, Aird WC, et al. *The Bat Club. Open Meeting, Hole-in-the-Wall, London, Wednesday, November 23Rd, 1842.* Vol 39.; 1842. doi:10.1111/jth.12253.Evolutionary
3. Courchaine K, Rykiel G, Rugonyi S. Influence of blood flow on cardiac development. *Prog Biophys Mol Biol.* 2018;137:95-110. doi:10.1016/j.pbiomolbio.2018.05.005
4. Stephenson A, Adams JW, Vaccarezza M. The vertebrate heart: an evolutionary perspective. *J Anat.* 2017;231(6):787-797. doi:10.1111/joa.12687
5. Pinto AR, Ilinykh A, Ivey MJ, et al. Revisiting Cardiac Cellular Composition Alexander. *Circ Res.* 2017;118(3):400-409. doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.307778.Revisiting
6. Gregorio CC, Antin PB. To the heart of myofibril assembly. *Trends Cell Biol.* 2000;10(9):355-362. doi:10.1016/S0962-8924(00)01793-1
7. Vendelin M, Béraud N, Guerrero K, et al. Mitochondrial regular arrangement in muscle cells: A "crystal- like" pattern. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2005;288(3 57-3):757-767. doi:10.1152/ajpcell.00281.2004
8. Soonpaa MH, Kim KK, Pajak L, Franklin M, Field LJ. Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol.* 1996;271(5 40-5). doi:10.1152/ajpheart.1996.271.5.h2183
9. Huber I, Itzhaki I, Caspi O, et al. Identification and selection of cardiomyocytes during human embryonic stem cell differentiation. *FASEB J.* 2007;21(10):2551-2563. doi:10.1096/fj.05-5711com
10. Kummitha CM, Kalhan SC, Saidel GM, Lai N. Relating tissue/organ energy expenditure to metabolic fluxes in mouse and human: Experimental data integrated with mathematical modeling. *Physiol Rep.* 2014;2(9):1-20. doi:10.14814/phy2.12159
11. Yu QC, Song W, Wang D, Zeng YA. Identification of blood vascular endothelial stem cells by the expression of protein C receptor. *Cell Res.* 2016;26(10):1079-1098. doi:10.1038/cr.2016.85
12. Sá da Bandeira D, Casamitjana J, Crisan M. Pericytes, integral components of adult hematopoietic stem cell niches. *Pharmacol Ther.* 2017;171:104-113. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.11.006
13. Rensen SSM, Doevendans PAFM, Van Eys GJJM. Regulation and characteristics of vascular smooth muscle cell phenotypic diversity. *Netherlands Hear J.* 2007;15(3):100-108. doi:10.1007/BF03085963
14. Cappellari O, Cossu G. Pericytes in development and pathology of skeletal muscle. *Circ Res.* 2013;113(3):341-347. doi:10.1161/CIRCRESAHA.113.300203
15. French BA, Kramer CM. Mechanisms of postinfarct left ventricular remodeling. *Drug Discov Today Dis Mech.* 2007;4(3):185-196. doi:10.1016/j.ddmec.2007.12.006
16. Doppler SA, Carvalho C, Lahm H, et al. Cardiac fibroblasts: More than mechanical support. *J Thorac Dis.* 2017;9(Suppl 1):S36-S51. doi:10.21037/jtd.2017.03.122
17. Furtado MB, Costa MW, Pranoto EA, et al. Cardiogenic Genes Expressed in Cardiac Fibroblasts Contribute to Heart Development and Repair. *Circ Res.* 2014 April 25;

- 114(9): 1422–1434. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302530. Cardiogenic
18. Mahmoud AI, Meara CCO, Gemberling M, et al. Maternal Weight Change Between 1 and 2 Years Postpartum: The Importance of 1 Year Weight Retention Leah. 2016;34(4):387-399. doi:10.1016/j.devcel.2015.06.017. *Nerves*
 19. Cowley KC. A new conceptual framework for the integrated neural control of locomotor and sympathetic function: Implications for exercise after spinal cord injury 1. *Appl Physiol Nutr Metab*. 2018;43(11):1140-1150. doi:10.1139/apnm-2018-0310
 20. Balmer GM, Bollini S, Dubé KN, Martinez-Barbera JP, Williams O, Riley PR. Dynamic haematopoietic cell contribution to the developing and adult epicardium. *Nat Commun*. 2014;5(May). doi:10.1038/ncomms5054
 21. Aurora AB, Porrello ER, Tan W, et al. Macrophages are required for neonatal heart regeneration. *J Clin Invest*. 2014;124(3):1382-1392. doi:10.1172/JCI72181
 22. Malliaras K, Ibrahim A, Tseliou E, et al. Stimulation of endogenous cardioblasts by exogenous cell therapy after myocardial infarction. *EMBO Mol Med*. 2014;6(6):760-777. doi:10.1002/emmm.201303626
 23. Uchida S, De Gaspari P, Kostin S, et al. Sca1-derived cells are a source of myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem Cell Reports*. 2013;1(5):397-410. doi:10.1016/j.stemcr.2013.09.004
 24. Nosedá M, Harada M, McSweeney S, et al. PDGFR α demarcates the cardiogenic clonogenic Sca1+ stem/progenitor cell in adult murine myocardium. *Nat Commun*. 2015;6(May):1-16. doi:10.1038/ncomms7930
 25. Fessler, Michael B.; Rudel, Lawrence L.; Brown M. Endothelial cells contribute to generation of adult ventricular myocytes during cardiac homeostasis. *Bone*. 2008;23(1):1-7. doi:10.1038/jid.2014.371
 26. Serpooshan V, Liu YH, Buikema JW, et al. Nkx2.5+ Cardiomyoblasts Contribute to Cardiomyogenesis in the Neonatal Heart. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-13. doi:10.1038/s41598-017-12869-4
 27. Moretti A, Caron L, Nakano A, et al. Multipotent Embryonic Isl1+ Progenitor Cells Lead to Cardiac, Smooth Muscle, and Endothelial Cell Diversification. *Cell*. 2006;127(6):1151-1165. doi:10.1016/j.cell.2006.10.029
 28. Valiente-Alandi I, Albo-Castellanos C, Herrero D, et al. Cardiac Bmi1+ cells contribute to myocardial renewal in the murine adult heart. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(1):1-16. doi:10.1186/s13287-015-0196-9
 29. Barker N, Bartfeld S, Clevers H. Tissue-resident adult stem cell populations of rapidly self-renewing organs. *Cell Stem Cell*. 2010;7(6):656-670. doi:10.1016/j.stem.2010.11.016
 30. Fliedner TM, Graessle D, Paulsen C, Reimers K. Structure and function of bone marrow hemopoiesis: Mechanisms of response to ionizing radiation exposure. *Cancer Biother Radiopharm*. 2002;17(4):405-426. doi:10.1089/108497802760363204
 31. Pallafacchina G, Blaauw B, Schiaffino S. Role of satellite cells in muscle growth and maintenance of muscle mass. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2013;23(SUPPL1):1-7. doi:10.1016/j.numecd.2012.02.002
 32. Nakafuku M, del Águila Á. Developmental dynamics of neurogenesis and gliogenesis in

- the postnatal mammalian brain in health and disease: Historical and future perspectives. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2020;9(3):1-20. doi:10.1002/wdev.369
33. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Evidence for cardiomyocyte renewal in humans. *Science (80-)*. 2009;324(5923):98-102. doi:10.1126/science.1164680
 34. Bergmann O, Zdunek S, Felker A, et al. Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart. *Cell.* 2015;161(7):1566-1575. doi:10.1016/j.cell.2015.05.026
 35. Walsh S, Pontén A, Fleischmann BK, Jovinge S. Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation in vivo-An analysis based on cardiomyocyte nuclei. *Cardiovasc Res.* 2010;86(3):365-373. doi:10.1093/cvr/cvq005
 36. Poss KD, Wilson LG, Keating MT. Heart regeneration in zebrafish. *Science (80-)*. 2002;298(5601):2188-2190. doi:10.1126/science.1077857
 37. Flink IL. Cell cycle reentry of ventricular and atrial cardiomyocytes and cells within the epicardium following amputation of the ventricular apex in the axolotl, *Amblystoma mexicanum*: Confocal microscopic immunofluorescent image analysis of bromodeoxyuridine-label. *Anat Embryol (Berl)*. 2002;205(3):235-244. doi:10.1007/s00429-002-0249-6
 38. Jopling C, Sleep E, Raya M, Martí M, Raya A, Belmonte JCI. Zebrafish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature.* 2010;464(7288):606-609. doi:10.1038/nature08899
 39. Wang J, Panáková D, Kikuchi K, et al. The regenerative capacity of zebrafish reverses cardiac failure caused by genetic cardiomyocyte depletion. *Development.* 2011;138(16):3421-3430. doi:10.1242/dev.068601
 40. Zhao A, Qin H, Fu X. What determines the regenerative capacity in animals? *Bioscience.* 2016;66(9):735-746. doi:10.1093/biosci/biw079
 41. Sturzu AC, Rajarajan K, Passer D, et al. Fetal Mammalian Heart Generates a Robust Compensatory Response to Cell Loss. *Circulation.* 2015;132(2):109-121. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011490
 42. Porrello E, Mahmoud A, Simpson E, et al. Transient Regenerative Potential of the Neonatal Mouse Heart. *Science.* 2011 February 25; 331(6020): 1078-1080. doi:10.1126/science.1200708.
 43. Notari M, Ventura-Rubio A, Bedford-Guaus SJ, et al. The local microenvironment limits the regenerative potential of the mouse neonatal heart. *Sci Adv.* 2018;4(5). doi:10.1126/sciadv.aao5553
 44. Sampaio-Pinto V, Rodrigues SC, Laundos TL, et al. Neonatal Apex Resection Triggers Cardiomyocyte Proliferation, Neovascularization and Functional Recovery Despite Local Fibrosis. *Stem Cell Reports.* 2018;10(3):860-874. doi:10.1016/j.stemcr.2018.01.042
 45. Yang F, Liu Y, Yang X, Xu J, Kapke A, Carretero OA. Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice Translation and Integration Experimental Physiology: We established a mouse model of cardiac dysfunction due to myocardial infarction (MI). For this we ligated the Experimental Physiology: *Exp Physiol Transl Integr.* 2002;87(5):547-555.
 46. Patterson M, Barske L, Van Handel B et al. Frequency of mononuclear diploid cardiomyocytes underlies natural variation in heart regeneration. *Nat Genet.* 2017

- September ; 49(9): doi:10.1038/ng.3929
47. Arora N, Wingert RA, Bollig F, Djordjevic G. Regeneration in Zebrafish. 2011;470(7332):95-100. doi:10.1016/j.devcel.2018.01.021.Myocardial
 48. Puente BN, Kimura W, Muralidhar SA, et al. The Oxygen Rich Postnatal Environment Induces Cardiomyocyte Cell Cycle Arrest Through DNA Damage Response. *Cell*. 2014;157(3):565-579. doi:10.1016/j.cell.2014.03.032
 49. Machado L, Geara P, Camps J, et al. Tissue damage induces a conserved stress response that initiates quiescent muscle stem cell activation. *Cell Stem Cell*. Published online 2021:1-11. doi:10.1016/j.stem.2021.01.017
 50. Lin Z, Hollinger MK, Wu Z, et al. Sirolimus augments hematopoietic stem and progenitor cell regeneration following hematopoietic insults. *Stem Cells*. 2021;39(2):240-252. doi:10.1002/stem.3313
 51. Jopling C, Boue S, Belmonte JCI. Dedifferentiation, transdifferentiation and reprogramming: Three routes to regeneration. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011;12(2):79-89. doi:10.1038/nrm3043
 52. Senyo S, Steinhauser M, Pizzimenti C, et al. Mammalian Heart Renewal by Preexisting Cardiomyocytes. *Nature*. 2013; 493(7432):433-436. doi:10.1038/nature11682.Mammalian
 53. Kimura W, Xiao F, Canseco DC, et al. Hypoxia fate mapping identifies cycling cardiomyocytes in the adult heart. *Nature*. 2015;523(7559):226-230. doi:10.1038/nature14582
 54. Nakada Y, Canseco DC, Thet S, et al. Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. *Nature*. 2017;541(7636):222-227. doi:10.1038/nature20173
 55. Moore-Morris T, Guimarães-Camboa N, Banerjee I, et al. Resident fibroblast lineages mediate pressure overload-induced cardiac fibrosis. *J Clin Invest*. 2014;124(7):2921-2934. doi:10.1172/JCI74783
 56. Epelman S, Lavine KJ, Beaudin AE, et al. Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity*. 2014 January 16; 40(1): 91-104. doi:10.1016/j.immuni.2013.11.019.
 57. Zhang W, Liang J, Han P. Cardiac cell type-specific responses to injury and contributions to heart regeneration. *Cell Regen*. 2021;10(1):1-9. doi:10.1186/s13619-020-00065-1
 58. Chen Q, Zhang H, Liu Y, et al. Endothelial cells are progenitors of cardiac pericytes and vascular smooth muscle cells. *Nat Commun*. 2016;7:1-13. doi:10.1038/ncomms12422
 59. Wylie BJ, Singh MP, Coull BA, et al. Mesenchymal-endothelial-transition contributes to cardiac neovascularization. *Nature*. 2015;34(3):355-368. doi:10.1038/nature13839.Mesenchymal-endothelial-transition
 60. Muñoz-Martín N, Sierra R, Schimmang T, Del Campo CV, Torres M. Myc is dispensable for cardiomyocyte development but rescues Mycn-deficient hearts through functional replacement and cell competition. *Dev*. 2019;146(3). doi:10.1242/dev.170753
 61. Bhartiya D, Boheler KR, Rameshwar P. Multipotent to pluripotent properties of adult stem cells. *Stem Cells Int*. 2013;2013:2-3. doi:10.1155/2013/813780
 62. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, et al. Adult Cardiac Stem Cells Are Multipotent and

- Support Myocardial Regeneration we have documented the existence of cycling ventricular myocytes in the normal and pathologic adult mam. *Cell*. 2003;114:763-776.
63. Hsieh PCH, Segers VFM, Davis ME, et al. Evidence from a genetic fate-mapping study that stem cells refresh adult mammalian cardiomyocytes after injury. *Nat Med*. 2007;13(8):970-974. doi:10.1038/nm1618
 64. Sultana N, Zhang L, Yan J, et al. Resident c-kit⁺ cells in the heart are not cardiac stem cells. *Nat Commun*. 2015;6:1-10. doi:10.1038/ncomms9701
 65. Vicinanza C, Aquila I, Cianflone E, et al. Kitcre knock-in mice fail to fate-map cardiac stem cells. *Nature*. 2018;555(7697):E1-E17. doi:10.1038/nature25771
 66. van Verlo J, Kanisicak O, Maillet M, et al. c-kit⁺ Cells Minimally Contribute to the Heart. *Nature*. 2014; 509 (7500):337-341 doi:10.1038/nature13309.c-kit
 67. Hung CH, Wang KY, Liou YH, et al. Negative regulation of the differentiation of flk2⁻cd34⁻ Isk hematopoietic stem cells by eklf/klf1. *Int J Mol Sci*. 2020;21(22):1-15. doi:10.3390/ijms21228448
 68. Matthews BG, Novak S, Sbrana F V., et al. Heterogeneity of murine periosteum progenitors involved in fracture healing. *Elife*. 2021;10:1-28. doi:10.7554/eLife.58534
 69. Messina E, De Angelis L, Frati G, et al. Isolation and expansion of adult cardiac stem cells from human and murine heart. *Circ Res*. 2004;95(9):911-921. doi:10.1161/01.RES.0000147315.71699.51
 70. Maher TJ, Ren Y, Li Q, et al. ATP-binding cassette transporter Abcg2 lineage contributes to the cardiac vasculature after oxidative stress. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 2014;306(12):1610-1618. doi:10.1152/ajpheart.00638.2013
 71. Oh H, Bradfute SB, Gallardo TD, et al. Cardiac progenitor cells from adult myocardium: Homing, differentiation, and fusion after infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(21):12313-12318. doi:10.1073/pnas.2132126100
 72. Pfister O, Mouquet F, Jain M, et al. CD31⁻ but not CD31⁺ cardiac side population cells exhibit functional cardiomyogenic differentiation. *Circ Res*. 2005;97(1):52-61. doi:10.1161/01.RES.0000173297.53793.fa
 73. Oyama T, Nagai T, Wada H, et al. Cardiac side population cells have a potential to migrate and differentiate into cardiomyocytes in vitro and in vivo. *J Cell Biol*. 2007;176(3):329-341. doi:10.1083/jcb.200603014
 74. Chong, Rashidianfar A, Biben C, et al. Adult Cardiac-Resident MSC-like Stem Cells with a Proepicardial Origin. *Cell Stem Cell*. 2013;9(6):527-540. doi:10.1016/j.stem.2011.10.002.Adult
 75. Kramman R, Schneider R, DiRocco D, et al. Perivascular Gli1⁺ progenitors are key contributors to injury-induced organ fibrosis. *Cell Stem Cell*. 2015 January 8; 16(1): 51-66. doi:10.1016/j.stem.2014.11.004
 76. Blackledge NP, Rose NR, Klose RJ. Targeting Polycomb systems to regulate gene expression: Modifications to a complex story. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16(11):643-649. doi:10.1038/nrm4067
 77. Kahn TG, Dorafshan E, Schultheis D, et al. Interdependence of PRC1 and PRC2 for

- recruitment to Polycomb Response Elements. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(21):10132-10149. doi:10.1093/nar/gkw701
78. Nakamura S, Oshima M, Yuan J, et al. Bmi1 confers resistance to oxidative stress on hematopoietic stem cells. *PLoS One.* 2012;7(5). doi:10.1371/journal.pone.0036209
79. Kondo T, Isono K, Kondo K, et al. Polycomb Potentiates Meis2 Activation in Midbrain by Mediating Interaction of the Promoter with a Tissue-Specific Enhancer. *Dev Cell.* 2014;28(1):94-101. doi:10.1016/j.devcel.2013.11.021
80. Jaber-Hijazi F, Lo PJKP, Mihaylova Y, et al. Planarian MBD2/3 is required for adult stem cell pluripotency independently of DNA methylation. *Dev Biol.* 2013;384(1):141-153. doi:10.1016/j.ydbio.2013.09.020
81. Sahasrabudhe AA. BMI1: A Biomarker of Hematologic Malignancies. *Biomark Cancer.* 2016;8:BIC.S33376. doi:10.4137/bic.s33376
82. Desai D, Pethe P. Polycomb repressive complex 1: Regulators of neurogenesis from embryonic to adult stage. *J Cell Physiol.* 2020;235(5):4031-4045. doi:10.1002/jcp.29299
83. Yang D, Liu HQ, Yang Z, Fan D, Tang QZ. BMI1 in the heart: Novel functions beyond tumorigenesis. *EBioMedicine.* 2021;63:103193. doi:10.1016/j.ebiom.2020.103193
84. Van der Lugt NMT, Domen J, Linders K, et al. Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the bmi-1 proto- oncogene. *Genes Dev.* 1994;8(7):757-769. doi:10.1101/gad.8.7.757
85. Jacobs JL, Kieboom K, Marino S, DePinho RA, Van Lohuizen M. The oncogene and Polycombgroup gene bmi-1 regulates cell proliferation and senescence through the ink4a locus. *Nature.* 1999;397(6715):164-168. doi:10.1038/16476
86. Jin HJ, Lee HJ, Heo J, et al. Senescence-Associated MCP-1 Secretion Is Dependent on a Decline in BMI1 in Human Mesenchymal Stromal Cells. *Antioxidants Redox Signal.* 2016;24(9):471-485. doi:10.1089/ars.2015.6359
87. Zhou Y, Wang L, Vaseghi HR, et al. Bmi1 Is a Key Epigenetic Barrier to Direct Cardiac Reprogramming. *Cell Stem Cell.* 2016;18(3):382-395. doi:10.1016/j.stem.2016.02.003
88. Mustafi SB, Aznar N, Dwivedi SKD, et al. Mitochondrial BMI1 maintains bioenergetic homeostasis in cells. *FASEB J.* 2016;30(12):4042-4055. doi:10.1096/fj.201600321R
89. Liu J, Cao L, Chen J, et al. Bmi1 regulates mitochondrial function and the DNA damage response pathway. *Nature.* 2009;459(7245):387-392. doi:10.1038/nature08040
90. Di Foggia V, Zhang X, Licastro D, et al. Bmi1 enhances skeletal muscle regeneration through MT1-mediated oxidative stress protection in a mouse model of dystrophinopathy. *J Exp Med.* 2014;211(13):2617-2633. doi:10.1084/jem.20140317
91. Xiao P, Zhang K, Tao Z, et al. Bmi1 and BRG1 drive myocardial repair by regulating cardiac stem cell function in acute rheumatic heart disease. *Exp Ther Med.* 2017;14(4):3812-3816. doi:10.3892/etm.2017.4936
92. Komai Y, Tanaka T, Tokuyama Y, et al. Bmi1 expression in long-term germ stem cells. *Sci Rep.* 2014;4:1-12. doi:10.1038/srep06175
93. Park IK, Qian D, Kiel M, et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature.* 2003;423(6937):302-305.

- doi:10.1038/nature01587
94. Biehs B, Hu JKH, Strauli NB, et al. BMI1 represses Ink4a/Arf and Hox genes to regulate stem cells in the rodent incisor. *Nat Cell Biol.* 2013;15(7):846-852. doi:10.1038/ncb2766
 95. Sangiorgi E, Capecchi MR. Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells. *Nat Genet.* 2008;40(7):915-920. doi:10.1038/ng.165
 96. Molofsky A V., Pardal R, Iwashita T, Park IK, Clarke MF, Morrison SJ. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature.* 2003;425(6961):962-967. doi:10.1038/nature02060
 97. Yoo YA, Roh M, Naseem AF, et al. Bmi1 marks distinct castration-resistant luminal progenitor cells competent for prostate regeneration and tumour initiation. *Nat Commun.* 2016;7:1-13. doi:10.1038/ncomms12943
 98. Dovey JS, Zacharek SJ, Kim CF, Lees JA. Bmi1 is critical for lung tumorigenesis and bronchioalveolar stem cell expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(33):11857-11862. doi:10.1073/pnas.0803574105
 99. Sangiorgi E, Capecchi MR. Bmi1 lineage tracing identifies a self-renewing pancreatic acinar cell subpopulation capable of maintaining pancreatic organ homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(17):7101-7106. doi:10.1073/pnas.0902508106
 100. Hosen N, Yamane T, Muijtjens M, Pham K, Clarke MF, Weissman IL. Bmi-1-Green Fluorescent Protein-Knock-In Mice Reveal the Dynamic Regulation of Bmi-1 Expression in Normal and Leukemic Hematopoietic Cells. *Stem Cells.* 2007;25(7):1635-1644. doi:10.1634/stemcells.2006-0229
 101. Herrero D, Cañón S, Pelacho B, et al. Bmi1-progenitor cell ablation impairs the angiogenic response to myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2018;38(9):2160-2173. doi:10.1161/ATVBAHA.118.310778
 102. Song Y, Zhao M, Xie Y, et al. Bmi-1 high-expressing cells enrich cardiac stem/progenitor cells and respond to heart injury. *J Cell Mol Med.* 2019;23(1):104-111. doi:10.1111/jcmm.13889
 103. Herrero D, Tomé M, Cañón S, et al. Redox-dependent BMI1 activity drives in vivo adult cardiac progenitor cell differentiation. *Cell Death Differ.* 2018;25(4):807-820. doi:10.1038/s41418-017-0022-2
 104. Hori M, Nishida K. Oxidative stress and left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 2009;81(3):457-464. doi:10.1093/cvr/cvn335
 105. Valiente-Alandi I, Albo-Castellanos C, Herrero D, Sanchez I, Bernad A. Bmi1 + cardiac progenitor cells contribute to myocardial repair following acute injury. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):1-11. doi:10.1186/s13287-016-0355-7
 106. Kocabas F, Mahmoud AI, Sosic D, et al. The hypoxic epicardial and subepicardial microenvironment. *J Cardiovasc Transl Res.* 2012;5(5):654-665. doi:10.1007/s12265-012-9366-7
 107. Herrero D, Cañón S, Albericio G, et al. Age-related oxidative stress confines damage-responsive Bmi1 + cells to perivascular regions in the murine adult heart. *Redox Biol.* 2019;22(March):101156. doi:10.1016/j.redox.2019.101156
 108. Morrison SJ, Spradling AC. Stem Cells and Niches: Mechanisms That Promote Stem Cell

- Maintenance throughout Life. *Cell*. 2008;132(4):598-611. doi:10.1016/j.cell.2008.01.038
109. García-Prat L, Perdiguero E, Alonso-Martín S, et al. *FoxO Maintains a Genuine Muscle Stem-Cell Quiescent State until Geriatric Age*. Vol 22.; 2020. doi:10.1038/s41556-020-00593-7
110. Borok M, Didier N, Gattazzo F, et al. Progressive and Coordinated Mobilization of the Skeletal Muscle Niche throughout Tissue Repair Revealed by Single-Cell Proteomic Analysis. *Cells*. 2021;10(4):1-13. doi:10.3390/cells10040744
111. McCarthy N, Kraiczy J, Shivdasani RA. Cellular and molecular architecture of the intestinal stem cell niche. *Nat Cell Biol*. 2020;22(9):1033-1041. doi:10.1038/s41556-020-0567-z
112. Mosteo L, Storer J, Batta K, Searle EJ, Duarte D, Wiseman DH. The Dynamic Interface Between the Bone Marrow Vascular Niche and Hematopoietic Stem Cells in Myeloid Malignancy. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9(March):1-24. doi:10.3389/fcell.2021.635189
113. Dinulovic I, Furrer R, Handschin C. Plasticity of the Muscle Stem Cell Microenvironment. *Adv Exp Med Biol*. 2017 ; 1041: 141–169. doi:10.1007/978-3-319-69194-7_8.
114. Navarro Negredo P, Yeo RW, Brunet A. Aging and Rejuvenation of Neural Stem Cells and Their Niches. *Cell Stem Cell*. 2020;27(2):202-223. doi:10.1016/j.stem.2020.07.002
115. Delgado AC, Ferrón SR, Vicente D, et al. Endothelial NT-3 Delivered by Vasculature and CSF Promotes Quiescence of Subependymal Neural Stem Cells through Nitric Oxide Induction. *Neuron*. 2014;83(3):572-585. doi:10.1016/j.neuron.2014.06.015
116. Kang S, Shinojima N, Hossain A. Isolation and Perivascular Localization of Mesenchymal Stem Cells From Mouse Brain. *Neurosurgery*. 2010 September ; 67(3): 711–720. doi:10.1227/01.NEU.0000377859.06219.78
117. Chen JY, Miyanishi M, Wang SK, et al. Hoxb5 marks long-term haematopoietic stem cells and reveals a homogenous perivascular niche. *Nature*. 2016;530(7589):223-227. doi:10.1038/nature16943
118. Gómez-Gaviró MV, Lovell-Badge R, Fernández-Avilés F, Lara-Pezzi E. The vascular stem cell niche. *J Cardiovasc Transl Res*. 2012;5(5):618-630. doi:10.1007/s12265-012-9371-x
119. Chillakuri CR, Sheppard D, Lea SM, Handford PA. Notch receptor-ligand binding and activation: Insights from molecular studies. *Semin Cell Dev Biol*. 2012;23(4):421-428. doi:10.1016/j.semcdb.2012.01.009
120. Yang D, Jin C, Ma H, et al. EphrinB2/EphB4 pathway in postnatal angiogenesis: a potential therapeutic target for ischemic cardiovascular disease. *Angiogenesis*. 2016;19(3):297-309. doi:10.1007/s10456-016-9514-9
121. Rafii S, Kloss CC, Butler JM, et al. Human ESC-derived hemogenic endothelial cells undergo distinct waves of endothelial to hematopoietic transition. *Blood*. 2013;121(5):770-780. doi:10.1182/blood-2012-07-444208
122. Verma M, Asakura Y, Murakonda BSR, et al. Muscle Satellite Cell Cross-Talk with a Vascular Niche Maintains Quiescence via VEGF and Notch Signaling. *Cell Stem Cell*. 2018;23(4):530-543.e9. doi:10.1016/j.stem.2018.09.007

123. Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, et al. Endothelial Cells Are Essential for the Self-Renewal and Repopulation of Notch-Dependent Hematopoietic Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 2010;6(3):251-264. doi:10.1016/j.stem.2010.02.001
124. Bröhl D, Vasyutina E, Czajkowski MT, et al. Colonization of the Satellite Cell Niche by Skeletal Muscle Progenitor Cells Depends on Notch Signals. *Dev Cell*. 2012;23(3):469-481. doi:10.1016/j.devcel.2012.07.014
125. Ottone C, Krusche B, Whitby A, et al. Direct cell-cell contact with the vascular niche maintains quiescent neural stem cells. *Nat Cell Biol*. 2014;16(11):1045-1056. doi:10.1038/ncb3045
126. Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, et al. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. *Nature*. 2014;508(7495):269-273. doi:10.1038/nature13034
127. García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguero E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature*. 2016;534(7607):S3-S4. doi:10.1038/nature19415
128. Suda T, Takubo K, Semenza GL. Metabolic regulation of hematopoietic stem cells in the hypoxic niche. *Cell Stem Cell*. 2011;9(4):298-310. doi:10.1016/j.stem.2011.09.010
129. Mohyeldin A, Garzón-Muvdi T, Quiñones-Hinojosa A. Oxygen in stem cell biology: A critical component of the stem cell niche. *Cell Stem Cell*. 2010;7(2):150-161. doi:10.1016/j.stem.2010.07.007
130. Vissapragada R, Contreras MA, Da Silva CG, et al. Bidirectional crosstalk between periventricular endothelial cells and neural progenitor cells promotes the formation of a neurovascular unit. *Brain Res*. 2014;1565:8-17. doi:10.1016/j.brainres.2014.03.018
131. Rodrigues TB, Ballesteros P. Journal of Neuroscience Research 85:3244–3253 (2007). *J Neurosci Res*. 2007;3253(April):3244-3253. doi:10.1002/jnr
132. An X, Ogawa-Wong A, Carmody C, et al. A Type 2 Deiodinase-Dependent Increase in Vegfa Mediates Myoblast-Endothelial Cell Crosstalk during Skeletal Muscle Regeneration. *Thyroid*. 2021;31(1):115-127. doi:10.1089/thy.2020.0291
133. Guo HD, Cui GH, Tian JX, et al. Transplantation of salvianolic acid B pretreated mesenchymal stem cells improves cardiac function in rats with myocardial infarction through angiogenesis and paracrine mechanisms. *Int J Cardiol*. 2014;177(2):538-542. doi:10.1016/j.ijcard.2014.08.104
134. Janssens R, Struyf S, Proost P. The unique structural and functional features of CXCL12. *Cell Mol Immunol*. 2018;15(4):299-311. doi:10.1038/cmi.2017.107
135. Das S, Goldstone AB, Wang H, et al. A Unique Collateral Artery Development Program Promotes Neonatal Heart Regeneration. *Cell*. 2019;176(5):1128-1142.e18. doi:10.1016/j.cell.2018.12.023
136. Marin-Juer R, El-Sammak H, Helker C, et al. Coronary revascularization is regulated by epicardial and endocardial cues and forms a scaffold for cardiomyocyte repopulation. *Dev Cell*. 2019 November 18; 51(4): 503–515.e4. doi:10.1016/j.devcel.2019.10.019.
137. Robinet P, Milewicz DM, Cassis LA, Leeper NJ, Lu HS, Smith JD. Consideration of Sex Differences in Design and Reporting of Experimental Arterial Pathology Studies-Statement from ATVB Council. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2018;38(2):292-303. doi:10.1161/ATVBAHA.117.309524

138. Salmon P, Oberholzer J, Occhiodoro T, Morel P, Lou J, Trono D. Reversible immortalization of human primary cells by lentivector-mediated transfer of specific genes. *Mol Ther*. 2000;2(4):404-414. doi:10.1006/mthe.2000.0141
139. Lalit PA, Salick MR, Nelson DO, et al. Lineage Reprogramming of Fibroblasts to Proliferative Induced Cardiac Progenitor Cells by Defined Factors. *Cell Stem Cell*. 2016 March 3; 18(3): 354–367. doi:10.1016/j.stem.2015.12.001.Lineage
140. Zhang Y, Cao N, Xu S, Spencer C, et al. Expandable Cardiovascular Progenitor Cells Reprogrammed from Fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2016 March 03; 18(3):doi:10.1016/j.stem.2016.02.001.
141. Wray J, Kalkan T, Gomez-Lopez S, et al. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation (Nature Cell Biology (2011) 13 (838-845)). *Nat Cell Biol*. 2012;14(5):555. doi:10.1038/ncb0512-555a
142. Ying QL, Wray J, Nichols J, et al. The ground state of embryonic stem cell self-renewal. *Nature*. 2008;453(7194):519-523. doi:10.1038/nature06968
143. Patel M, Subramanian RB. Effect of a chelating agent on lead uptake by *Spinacia oleracea*. *Pollut Res*. 2006;25(1):77-79.
144. Xiao L, Yuan X, Sharkis SJ. Activin A Maintains Self-Renewal and Regulates Fibroblast Growth Factor, Wnt, and Bone Morphogenic Protein Pathways in Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. 2006;24(6):1476-1486. doi:10.1634/stemcells.2005-0299
145. Laberge RM, Sun Y, Orjalo A V., et al. MTOR regulates the pro-tumorigenic senescence-associated secretory phenotype by promoting IL1A translation. *Nat Cell Biol*. 2015;17(8):1049-1061. doi:10.1038/ncb3195
146. Kortlever RM, Higgins PJ, Bernards R. Plasminogen activator inhibitor-1 is a critical downstream target of p53 in the induction of replicative senescence. *Nat Cell Biol*. 2006;8(8):878-884. doi:10.1038/ncb1448
147. Liu F, Wu X, Jiang X, Qian Y, Gao J. Prolonged inhibition of class I PI3K promotes liver cancer stem cell expansion by augmenting SGK3/GSK-3 β / β -catenin signalling. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018;37(1):1-13. doi:10.1186/s13046-018-0801-8
148. Alimbetov D, Davis T, Brook AJC, et al. Suppression of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) in human fibroblasts using small molecule inhibitors of p38 MAP kinase and MK2. *Biogerontology*. 2016;17(2):305-315. doi:10.1007/s10522-015-9610-z
149. Xu M, Tchkonja T, Ding H, et al. JAK inhibition alleviates the cellular senescence-associated secretory phenotype and frailty in old age. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(46):E6301-E6310. doi:10.1073/pnas.1515386112
150. Chapman S, Liu X, Meyers C, Schlegel R, McBride AA. Human keratinocytes are efficiently immortalized by a Rho kinase inhibitor. *J Clin Invest*. 2010;120(7):2619-2626. doi:10.1172/JCI42297
151. Zhang Y, Nuglozeh E, Touré F, Schmidt AM, Vunjak-Novakovic G. Controllable expansion of primary cardiomyocytes by reversible immortalization. *Hum Gene Ther*. 2009;20(12):1687-1696. doi:10.1089/hum.2009.057
152. Li M, Chen Y, Bi Y, et al. Establishment and characterization of the reversibly

- immortalized mouse fetal heart progenitors. *Int J Med Sci.* 2013;10(8):1035-1046. doi:10.7150/ijms.6639
153. Fomby P, Cherlin AJ, Hadjizadeh A, et al. Stem cells and cell therapies in lung biology and diseases: Conference report. *Ann Am Thorac Soc.* 2010;12(3):181-204. doi:10.1002/term
154. Wang CY, Wen MS, Wang HW, et al. Increased vascular senescence and impaired endothelial progenitor cell function mediated by mutation of circadian gene Per2. *Circulation.* 2008;118(21):2166-2173. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.108.790469
155. Cho KA, Sung JR, Yoon SO, et al. Morphological adjustment of senescent cells by modulating caveolin-1 status. *J Biol Chem.* 2004;279(40):42270-42278. doi:10.1074/jbc.M402352200
156. Rubio MA, Kim SH, Campisi J. Reversible manipulation of telomerase expression and telomere length: Implications for the ionizing radiation response and replicative senescence of human cells. *J Biol Chem.* 2002;277(32):28609-28617. doi:10.1074/jbc.M203747200
157. García-Escudero V, García-Gómez A, Gargini R, et al. Prevention of senescence progression in reversibly immortalized human ensheathing glia permits their survival after deimmortalization. *Mol Ther.* 2010;18(2):394-403. doi:10.1038/mt.2009.268
158. Zhou X, Contreras-Trujillo H, Ying QL. New insights into the conserved mechanism of pluripotency maintenance. *Curr Opin Genet Dev.* 2015;34:1-9. doi:10.1016/j.gde.2015.06.002
159. Soto-Gamez A, Demaria M. Therapeutic interventions for aging: the case of cellular senescence. *Drug Discov Today.* 2017;22(5):786-795. doi:10.1016/j.drudis.2017.01.004
160. Takeuchi M, Takeuchi K, Kohara A, et al. Chromosomal instability in human mesenchymal stem cells immortalized with human papilloma virus E6, E7, and hTERT genes. *Vitr Cell Dev Biol - Anim.* 2007;43(3-4):129-138. doi:10.1007/s11626-007-9021-9
161. Banga SS, Peng L, Dasgupta T, Palejwala V, Ozer HL. PHF10 is required for cell proliferation in normal and SV40-immortalized human fibroblast cells. *Cytogenet Genome Res.* 2010;126(3):227-242. doi:10.1159/000251960
162. Cochemé HM, Murphy MP. Complex I is the major site of mitochondrial superoxide production by paraquat. *J Biol Chem.* 2008;283(4):1786-1798. doi:10.1074/jbc.M708597200
163. Dostal V, Wood SD, Thomas CT, Han Y, Lau E, Lam MPY. Proteomic signatures of acute oxidative stress response to paraquat in the mouse heart. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-12. doi:10.1038/s41598-020-75505-8
164. Torán JL, Aguilar S, López JA, et al. CXCL6 is an important paracrine factor in the pro-angiogenic human cardiac progenitor-like cell secretome. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-14. doi:10.1038/s41598-017-11976-6
165. Park CY, Choi SC, Kim JH, et al. Cardiac stem cell secretome protects cardiomyocytes from hypoxic injury partly via monocyte chemoattractant protein-1-dependent mechanism. *Int J Mol Sci.* 2016;17(6):1-17. doi:10.3390/ijms17060800

166. Miao L, Li J, Li J, et al. Notch signaling regulates Hey2 expression in a spatiotemporal dependent manner during cardiac morphogenesis and trabecular specification. *Sci Rep*. 2018;8(1):1-14. doi:10.1038/s41598-018-20917-w
167. O'Sullivan TE, Johnson LR, Kang HH, Sun JC. BNIP3- and BNIP3L-Mediated Mitophagy Promotes the Generation of Natural Killer Cell Memory. *Immunity*. 2015;43(2):331-342. doi:10.1016/j.immuni.2015.07.012
168. Marín-Juez R, El-Sammak H, Helker CSM, et al. Coronary Revascularization During Heart Regeneration Is Regulated by Epicardial and Endocardial Cues and Forms a Scaffold for Cardiomyocyte Repopulation. *Dev Cell*. 2019;51(4):503-515.e4. doi:10.1016/j.devcel.2019.10.019
169. García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguero E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature*. 2016;529(7584):37-42. doi:10.1038/nature16187
170. Moretti A, Laugwitz K, Dorn T. Pluripotent Stem Cell Models of Human Heart Disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a014027. doi:10.1001/jama.289.2.236-a
171. Brito-Martins M, Harding SE, Ali NN. β 1- and β 2-adrenoceptor responses in cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells: Comparison with failing and non-failing adult human heart. *Br J Pharmacol*. 2008;153(4):751-759. doi:10.1038/sj.bjp.0707619
172. Sheikh Abdul Kadir SH, Ali NN, Mioulane M, et al. Embryonic stem cell-derived cardiomyocytes as a model to study fetal arrhythmia related to maternal disease. *J Cell Mol Med*. 2009;13(9 B):3730-3741. doi:10.1111/j.1582-4934.2009.00741.x
173. Chapman EJ, Kelly G, Knowles MA. Genes involved in differentiation, stem cell renewal, and tumorigenesis are modulated in telomerase-immortalized human urothelial cells. *Mol Cancer Res*. 2008;6(7):1154-1168. doi:10.1158/1541-7786.MCR-07-2168
174. Mummery C. Harnessing the power of cardiac stem cells. *Cell Gene Ther Insights*. 2016;2(3):391-396. doi:10.18609/cgti.2016.041
175. Ismail H, Andrin C, McDonald D, Hendzel MJ. BMI1-mediated histone ubiquitylation promotes DNA double-strand break repair. *J Cell Biol*. 2010;191(1):45-60. doi:10.1083/jcb.201003034
176. Puschendorf M, Terranova R, Boutsma E, et al. PRC1 and Suv39h specify parental asymmetry at constitutive heterochromatin in early mouse embryos. *Nat Genet*. 2008;40(4):411-420. doi:10.1038/ng.99
177. Li L, Olvera JM, Yoder KE, et al. Role of the non-homologous DNA end joining pathway in the early steps of retroviral infection. *EMBO J*. 2001;20(12):3272-3281. doi:10.1093/emboj/20.12.3272
178. Wei P, Li L, Qi H, Zhou HX, Deng CY, Li FR. Reversible immortalization of Nestin-positive precursor cells from pancreas and differentiation into insulin-secreting cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;418(2):330-335. doi:10.1016/j.bbrc.2012.01.021
179. May T, Hauser H, Wirth D. Transcriptional control of SV40 T-antigen expression allows a complete reversion of immortalization. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(18):5529-5538. doi:10.1093/nar/gkh887
180. Li YJ, Duan CL, Liu JX. Salvianolic acid A promotes the acceleration of neovascularization in the ischemic rat myocardium and the functions of endothelial progenitor cells. *J*

- Ethnopharmacol.* 2014;151(1):218-227. doi:10.1016/j.jep.2013.10.019
181. Deng L, Pollmeier L, Zhou Q, et al. Gene expression in immortalized versus primary isolated cardiac endothelial cells. *Sci Rep.* 2020;10(1):1-9. doi:10.1038/s41598-020-59213-x
 182. Wells SP, Waddell HM, Sim CB, et al. Cardiomyocyte functional screening: Interrogating comparative electrophysiology of high-throughput model cell systems. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2019;317(6):C1256-C1267. doi:10.1152/ajpcell.00306.2019
 183. Yamasaki K, Kawasaki S, Young RD, et al. Genomic aberrations and cellular heterogeneity in SV40-immortalized human corneal epithelial cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2009;50(2):604-613. doi:10.1167/iovs.08-2239
 184. Kaiser B, Böttner M, Wedel T, et al. Establishment and Characterization of an SV40 Large T Antigen-Transduced Porcine Colonic Epithelial Cell Line. *Cells Tissues Organs.* 2017;203(5):267-286. doi:10.1159/000453394
 185. Chang ZS, Xia JB, Wu HY, et al. Forkhead box O3 protects the heart against paraquat-induced aging-associated phenotypes by upregulating the expression of antioxidant enzymes. *Aging Cell.* 2019;18(5):1-14. doi:10.1111/accel.12990
 186. Shen H, Wu N, Wang Y, et al. Toll-like receptor 9 mediates paraquat-induced acute lung injury: an in vitro and in vivo study. *Life Sci.* 2017;178:109-118. doi:10.1016/j.lfs.2017.03.021
 187. Ölschläger V, Schrader A, Hockertz S. Comparison of Primary Human Fibroblasts and Keratinocytes with Immortalized Cell Lines Regarding their Sensitivity to Sodium Dodecyl Sulfate in a Neutral Red Uptake Cytotoxicity Assay. *Arzneimittelforschung* 2009;59(3):146-152
 188. Karbach S, Jansen T, Horke S, et al. Hyperglycemia and oxidative stress in cultured endothelial cells - A comparison of primary endothelial cells with an immortalized endothelial cell line. *J Diabetes Complications.* 2012;26(3):155-162. doi:10.1016/j.jdiacomp.2012.03.011
 189. Bergmann O, Bhardwaj RD, Bernard S, et al. Linked references are available on JSTOR for this article : Renewal in Humans Evidence for Cardiomyocyte. *Natl institutes Heal.* 2017;324(5923):98-102. doi:10.1126/science.1164680.Evidence
 190. Galvez BG, Sampaolesi M, Barbuti A, et al. Cardiac mesoangioblasts are committed, self-renewable progenitors, associated with small vessels of juvenile mouse ventricle. *Cell Death Differ.* 2008;15(9):1417-1428. doi:10.1038/cdd.2008.75
 191. Rabieian R, Boshtam M, Zareei M, Kouhpayeh S, Masoudifar A, Mirzaei H. Plasminogen Activator Inhibitor Type-1 as a Regulator of Fibrosis. *J Cell Biochem.* 2018;119(1):17-27. doi:10.1002/jcb.26146
 192. Xu Z, Castellino FJ, Ploplis VA. Plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) is cardioprotective in mice by maintaining microvascular integrity and cardiac architecture. *Blood.* 2010;115(10):2038-2047. doi:10.1182/blood-2009-09-244962
 193. Bassiouni W, Ali MAM, Schulz R. Multifunctional intracellular matrix metalloproteinases: implications in disease. *FEBS J.* Published online 2021:1-21. doi:10.1111/febs.15701
 194. Veeranki S, Tyagi SC. Mdivi-1 induced acute changes in the angiogenic profile after ischemia-reperfusion injury in female mice. *Physiol Rep.* 2017;5(11):1-15.

- doi:10.14814/phy2.13298
195. Shu J, Liu Z, Jin L, Wang H. An RNA-sequencing study identifies candidate genes for angiotensin II-induced cardiac remodeling. *Mol Med Rep.* 2018;17(1):1954-1962. doi:10.3892/mmr.2017.8043
 196. Braille M, Marcella S, Cristinziano L, et al. VEGF-A in cardiomyocytes and heart diseases. *Int J Mol Sci.* 2020;21(15):1-18. doi:10.3390/ijms21155294
 197. Zhao T, Zhao W, Chen Y, et al.. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF)-A: Role on Cardiac Angiogenesis following Myocardial Infarction. *Microvasc Res.* 2010 September ; 80(2): 188–194. doi:10.1016/j.mvr.2010.03.014
 198. Shao Y, Li G, Huang S, et al. Effects of Extracellular Matrix Softening on Vascular Smooth Muscle Cell Dysfunction. *Cardiovasc Toxicol.* 2020;20(6):548-556. doi:10.1007/s12012-020-09580-8
 199. Tombetti E, Hysa E, Mason JC, Cimmino MA, Camellino D. Blood Biomarkers for Monitoring and Prognosis of Large Vessel Vasculitides. *Curr Rheumatol Rep.* 2021;23(3). doi:10.1007/s11926-021-00980-5
 200. Irion CI, Dunkley JC, John-Williams K, et al. Nuclear Osteopontin Is a Marker of Advanced Heart Failure and Cardiac Allograft Vasculopathy: Evidence From Transplant and Retransplant Hearts. *Front Physiol.* 2020;11(August):1-11. doi:10.3389/fphys.2020.00928
 201. Kusuma GD, Carthew J, Lim R, Frith JE. Effect of the Microenvironment on Mesenchymal Stem Cell Paracrine Signaling: Opportunities to Engineer the Therapeutic Effect. *Stem Cells Dev.* 2017;26(9):617-631. doi:10.1089/scd.2016.0349
 202. Tang J, Wang J, Zheng F, et al. Combination of chemokine and angiogenic factor genes and mesenchymal stem cells could enhance angiogenesis and improve cardiac function after acute myocardial infarction in rats. *Mol Cell Biochem.* 2010;339(1-2):107-118. doi:10.1007/s11010-009-0374-0
 203. Izarra A, Moscoso I, Levent E, et al. MiR-133a enhances the protective capacity of cardiac progenitors cells after myocardial infarction. *Stem Cell Reports.* 2014;3(6):1029-1042. doi:10.1016/j.stemcr.2014.10.010
 204. Muramoto GG, Chen B, Cui X, Chao NJ, Chute JP. Vascular Endothelial Cells Produce Soluble Factors That Mediate the Recovery of Human Hematopoietic Stem Cells after Radiation Injury. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2006;12(5):530-540. doi:10.1016/j.bbmt.2005.12.039
 205. Gude N, Joyo E, Toko H, et al. Notch activation enhances lineage commitment and protective signaling in cardiac progenitor cells. *Basic Res Cardiol.* 2015;110(3). doi:10.1007/s00395-015-0488-3
 206. García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguero E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature.* 2016;529(7584):37-42. doi:10.1038/nature16187
 207. Ney PA. Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2015;1853(10):2775-2783. doi:10.1016/j.bbamcr.2015.02.022
 208. Dey A, Mustafi SB, Saha S, Kumar Dhar Dwivedi S, Mukherjee P, Bhattacharya R. Inhibition of BMI1 induces autophagy-mediated necroptosis. *Autophagy.*

- 2016;12(4):659-670. doi:10.1080/15548627.2016.1147670
209. Bertrand C, Valet P, Castan-Laurell I. Apelin and energy metabolism. *Front Physiol.* 2015;6(MAR):1-5. doi:10.3389/fphys.2015.00115
210. Ratnayake D, Nguyen PD, Rossello FJ, et al. Macrophages provide a transient muscle stem cell niche via NAMPT secretion. *Nature.* 2021;591(7849):281-287. doi:10.1038/s41586-021-03199-7
211. Nicolás-Ávila JA, Lechuga-Vieco A V., Esteban-Martínez L, et al. A Network of Macrophages Supports Mitochondrial Homeostasis in the Heart. *Cell.* 2020;183(1):94-109.e23. doi:10.1016/j.cell.2020.08.031
212. Madonna R, Van Laake LW, Botker HE, et al. ESC working group on cellular biology of the heart: Position paper for Cardiovascular Research: Tissue engineering strategies combined with cell therapies for cardiac repair in ischaemic heart disease and heart failure. *Cardiovasc Res.* 2019;115(3):488-500. doi:10.1093/cvr/cvz010
213. Pavo N, Zimmermann M, Pils D, et al. Long-acting beneficial effect of percutaneously intramyocardially delivered secretome of apoptotic peripheral blood cells on porcine chronic ischemic left ventricular dysfunction. *Biomaterials.* 2014;35(11):3541-3550. doi:10.1016/j.biomaterials.2013.12.071

ANEXOS

Tabla Suplementaria 1: Listado de oligonucleótidos empleados durante la presente Tesis Doctoral.

Primers	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')
GusB	ACTCCTCACTGAACATGCGA	ATAAGACGCATCAGAAGCCG
T-SV40	GGTGGGTAAAGGAGCATGA	AGGCTATCAACCCGCTTTTT
TK	CTCACCCCTCATCTTCGACCG	CCTGCAGATACCCGACCGTA
Bmi1	CAGCAATGACTGTGATGC	CTCCAGCATTTCGTAGTC
Cxcl12	TTTCAGATGCTTGACGTTGG	GCGCTCTGCATCAGTGAC
Cxcr4	ACTCACACTGATCGGTTCCA	AGGTGCAGGTAGCAGTGACC
VegfA	AATGCTTTCTCCGCTCTGAA	GCTTCTACAGCACAGCAGA
VegfB	GTGAAGCAGGGCCATAAAAG	GAGCTCAACCCAGACACCTG
VegfC	AGACGGACACACATGGAGGT	AAAGACTCAATGCATGCCAC
VegfR1	AAGAGAGTCTGGCTGCTTG	CTGCTCGGGTGTCTGCTT
VegfR3	CCCCGGTGTCAATCACATA	CTCTGCCTCGGACTCCTC
Pdgfrα	AGAAAATCCGATACCCGGAG	AGAGGAGGAGCTTGAGGGAG
Cx43	GGACCTTGCCAGCAGCTT	TCCAAGGAGTTCACCACTT
Tpm1	TCCAACCTCCTCAACCAG	CTCCGAGGCTCTCAAAGATG
Bcl2	ACATCCCAGCTTACATAACCC	CCATCCCAGAAAGAGTTCATTAC
Cat	CCCCTATTGCCGTTCCGATTCT	TTCAGGTGAGTCTGTGGGTTT
Gpx1	CGTTTTCGTACCATCGACATC	GGCCCGCCTTAGGAGTTG
Prdx1	GCCGCTCTGTGGATGAGATTA	AGCTGGACACACTTCACCAT
Prdx4	AGAGGAGTGCCACTTCTACG	GGAAATCTTCGCTTTGCTTAGGT
Hmox1	CACAGATGGCGTCACTTCGTC	GTGAGGACCCACTGGAGGAG
Notch1	AGCCTCTCCACCAATACCTT	GGCTGGAGCTGTAAGTTCT
Notch2	CAGAGATGAAGAAGACAACAC	ACACTACACAGGTCAAGAAT
Notch3	TTCTACTCATCATCTTCA	CTATGTCCTTGTGTAATG
Notch4	AGAGGACGGGACTACACCT	CCTTTTATCCCTGGCTCCTA
Dll4	GGACTCTATGTACCAATCAG	CCTGCCTTATACCTCTGT
Jag1	ACACAGGGATTGCCCACTTC	AGCCAAAGCCATAGTAGTGGTCAT
Jag2	GACGCCAATGAGTGTGAA	ACAGTAATAGCCGCCAATC
Hey1	CTCTGCCTTCTCATTCTT	TAGTCACAACACATCAATACA
Hes1	AAGCCTATCATGGAGAAGAG	GGAGCTATCTTTCTTAAGATGC
Hey2	TGAGTTCTCCTGATGCTA	GCTATATCCTTCTGATCTTGT
EphB4	GCCATCAAGATGGAAGATA	CACACTGGCCAAGATTTTCT
EfnB2	CCCTTTGTGAAGCCAAATCCAGGT	TCCTGATGCGATCCCTGCGAATAA
Atg5	AACCCGACCGAGCGGCTTTC	CAACCAAAGCCAAACCGAGGTGC
Atg7	TCTGGGAAGCCATAAAGTCAGG	GCGAAGGTCAGGAGCAGAA
Atg12	GGCCTCGGAACAGTTGTTTA	CAGCACCGAAATGTCTCTGA
Atg13	GTGGGCACCCCTCACTCTTTC	GGGATAGGGACGGTCAACAA
Map1lc3a	CGTCTGGACAAGACCAAGT	ATTGCTGTCCCGAATGTCTC
Map1lc3b	CCCCACCAAGATCCCAGT	CGCTCATGTTACAGTGGT
Beclin	CTTGGAGGAGGAGAGGCTGA	TGTGGAAGGTGGCATTGAAG
Bnip3	TCCTGGGTAGAAGTGCACCTC	GCTGGGCATCCAACAGTATTT
Apellin	GGCCTTCTCCGTCTTTGTGC	CCCTCTTGTGCTTCTATCTCTCC
Ppargc1a	AAAAGCTTGACTGGCGTCAT	TGCTACTCCATACAGAGTCTGG
Atp5j	TTCGGTCAGCAGTCTCTGTG	GCCTGTGCTTTGATTTGTA
Mgn	GGTGTGTAAGAGGAAGTCTGTG	TAGGCGCTCAATGTAAGTGGAT
Ki67	ACCGTGGAGTAGTTTATCTGGG	TGTTTCCAGTCCGCTTACTTCT
p21	CCAGGCCAAGATGGTGTCTT	TGAGAAAGGATCAGCCATTGC
Ulk1	CACTGCGTGGCTCACCTAAG	AGCCAAACAGGGTCAGCAAAT

Tabla Suplementaria 2: Listado de anticuerpos empleados durante la presente Tesis Doctoral.

	Anticuerpos	Dilución Empleada	Distribuidor	Número de Catálogo
Western Blot	α Tubulina	1/ 1000	Calbiochem	CP06-100UG
	SV40 Tlarge	1/ 100	Calbiochem	DP02
	Ab Policlonal Rabbit- HPRT Anti-Mouse IgG	1/ 1000	Dako Denmark	P0260
FACS	Sca1-PE	1/100	BD Pharmingen	553336
	cKit-PE	1/100	Beckman	734243
	Control Isotipo Rat IgG2a-PE	1/100	Southern	0117-09
	CD45	1/100	BD Pharmingen	30-F11
	Control Isotipo Rat IgG2b	1/100	Inmunotech	PNIM3040
	CD31	1/50	BD Pharmingen	553370
	PDGFR α	1/50	eBioscience	14-1401-82
	Control Isotipo Rat IgG2a	1/50	Serotech	MCA1212
	Ab 2 ^a Goat Anti- Rat IgG2-PE	1/50	Southern	3052-9

		Homeostasis	Daño	Homeostasis vs Daño
CXCL12	Bmi1-CPC Tomato	0.94	0.57	↓ 39%
	Bmi1-CPC YFP ^{Inm}	0.88	1.07	↑ 21%
SERPIN E1	Bmi1-CPC Tomato	0.76	0.67	↓ 12%
	Bmi1-CPC YFP ^{Inm}	0.8	0.81	=
MMP3	Bmi1-CPC Tomato	0.66	0.2	↓ 69%
	Bmi1-CPC YFP ^{Inm}	0.84	1.09	↑ 30%
Factor Coag. III	Bmi1-CPC Tomato	0.64	0.2	↓ 69%
	Bmi1-CPC YFP ^{Inm}	0.26	0.53	↑ 100%
VEGF-A	Bmi1-CPC Tomato	0.63	0.46	↓ 27%
	Bmi1-CPC YFP ^{Inm}	0.47	0.69	↑ 47%
OPN	Bmi1-CPC Tomato	0.58	0.68	↑ 17%
	Bmi1-CPC YFP ^{Inm}	0.68	0.8	↑ 18%
PIGF-2	Bmi1-CPC Tomato	0.12	0.21	↑ 18%
	Bmi1-CPC YFP ^{Inm}	0.7	0.7	=

Figura Suplementaria 1: Representación comparativa de los datos obtenidos en los *arrays* de angiogénesis realizados sobre el medio condicionado de las células Bmi1-CPC-Tomato o Bmi1-CPC-YFP^{Inm} en condiciones de homeostasis o daño oxidativo inducido por PQ 5mM 12h. Los círculos (Rojos; Bmi1-CPC-Tomato/ Amarillos; Bmi1-CPC-YFP^{Inm}) representan los valores de intensidad relativa para los principales factores identificados en cada una de las condiciones testadas. En la última columna se representa el porcentaje de aumento o disminución de cada uno de los factores al comparar la intensidad relativa observada en condiciones de daño frente a los valores detectados en homeostasis.

Publicaciones Relacionadas:

Herrero D, Cañón S, **Albericio G**, Carmona RM, Aguilar S, Mañes S, Bernad A. Age-related oxidative stress confines damage-responsive Bmi1⁺ cells to perivascular regions in the murine adult heart. *Redox Biol.* 2019;22(March):101156. doi:10.1016/j.redox.2019.101156.

Albericio G[#], Aguilar S[#], Jose Luis Torán JL, Rosa Yañez R, López JA, Vázquez J, Mora C, Bernad A. Comparative proteomic analysis of nuclear and cytoplasmic compartments in human cardiac progenitor cells. Functional evaluation of IL1A and IMP3. (2020) *Sci. Rep.* (En Revisión)