



Departamento de Fisiología Médica y Biofísica

Facultad de Medicina

Universidad de Sevilla

REMODELADO DE LA ENTRADA DE CALCIO EN LA
ANGIOGÉNESIS:

PAPEL DE LAS PROTEÍNAS ORAI1 Y SARAF

Trabajo de investigación presentado por

Isabel María Galeano Otero

Para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla

Sevilla, 2022



El Dr. Tarik Smani Hajami, Profesor Titular de la Universidad de Sevilla adscrito al Departamento de Fisiología Médica y Biofísica e Investigador Responsable del Grupo de Fisiopatología Cardiovascular del Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBiS), certifica que:

Dña. Isabel María Galeano Otero, con DNI 49075135N, Graduada en Biotecnología por la Universidad de Cádiz con Máster en Investigación Biomédica por la Universidad de Sevilla, ha realizado bajo su supervisión y dirección el trabajo titulado: “Remodelado de la entrada de calcio en la angiogénesis: Papel de las proteínas Orai1 y SARAF” que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Sevilla con mención internacional.

Y para que así conste, firman el presente documento en Sevilla el 20 de abril del 2022.

Fdo. Tarik Smani Hajami

FINANCIACIÓN

Este trabajo de investigación ha sido posible gracias a la Ayuda Predoctoral de Personal Investigador en Formación del VI Plan Propio de la Universidad de Sevilla, y a los siguientes proyectos de Investigación concedidos en convocatorias públicas:

- Remodelado de la entrada de calcio en la angiogénesis (2016-2019). Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (Plan Estatal). Categoría: Investigadora. BFU2016-74932-C2-2-P. IP: Tarik Smani Hajami.
- Detección precoz de cardiotoxicidad por antraciclinas: Imagen y marcadores circulantes para la detección precoz del daño miocárdico (2019-2021). Junta de Andalucía. Categoría: Investigadora. PI-0193-2018. IP: Eva Calderón Sánchez
- Remodelado de la Expresión de Stim y Orai y de sus Mecanismos Reguladores en la Angiogénesis (2020-2023). Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades. Categoría: Investigadora. PID2019 104084GBC22/AEI/10.13039/501100011033. IP: Tarik Smani Hajami.



DIVULGACIÓN CIENTÍFICA

Durante la elaboración de la Tesis Doctoral, parte de los resultados obtenidos y otros datos fruto de otras investigaciones, han sido publicados en revistas internacionales y comunicados en congresos nacionales e internacionales.

Producción científica:

1. Raquel Del Toro*, **Isabel Galeano-Otero***, Elisa Bevilacqua*, Francisco Guerrero-Márquez, Debora Falcon, Agustín Guisado-Rasco, Luis Díaz-de la Llera, Gonzalo Barón-Esquivias, Tarik Smani, Antonio Ordóñez-Fernández. “Predicted Value of MicroRNAs, Vascular Endothelial Growth Factor, and Intermediate Monocytes in the Left Adverse Ventricular Remodeling in Revascularized ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Patients”. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 2022, 9: 777717. doi: 10.3389/fcvm.2022.777717.
2. Isabel Mayoral-González, Eva M Calderón-Sánchez*, **Isabel Galeano-Otero***, Marta Martín-Bórnez, Encarnación Gutiérrez-Carretero, María Fernández-Velasco, Nieves Domenech, María Generosa Crespo-Leiro, Ana María Gómez, Antonio Ordóñez-Fernández, Abdelkrim Hmadcha, Tarik Smani. “Cardiac protection induced by urocortin-2 enables the regulation of apoptosis and fibrosis after ischemia and reperfusion involving miR-29a modulation”. *Molecular Therapy-Nucleic Acids* 2022, 27:838-853. doi: 10.1016/j.omtn.2022.01.003.
3. **Isabel Galeano-Otero**, Raquel Del Toro, Abdel-Majid Khatib, Juan Antonio Rosado, Antonio Ordóñez-Fernández, Tarik Smani. “SARAF and Orai1 Contribute to Endothelial Cell Activation and Angiogenesis”. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* 2021, 9:639952. doi: 10.3389/fcell.2021.639952.
4. Marta Martín Bórnez*, **Isabel Galeano Otero***, Raquel del Toro, Tarik Smani. “TRPC and TRPV Channels’ Role in Vascular Remodeling and Disease”. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, 21(17):6125. doi: 10.3390/ijms21176125.

5. Tarik Smani*, Isabel Mayoral-Gonzalez*, **Isabel Galeano-Otero***, Isabel Gallardo-Castillo, Juan A Rosado, Antonio Ordoñez, Abdelkrim Hmadcha. "Non-coding RNAs and Ischemic Cardiovascular Diseases". *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2020, 1229:259-271. doi: 10.1007/978-981-15-1671-9_15.
6. **Isabel Galeano-Otero***, Raquel Del Toro*, Agustín Guisado, Ignacio Díaz, Isabel Mayoral-González, Francisco Guerrero-Márquez, Encarnación Gutiérrez-Carretero, Sara Casquero-Domínguez, Luis Díaz-de la Llera, Gonzalo Barón-Esquivias, Manuel Jiménez-Navarro, Tarik Smani, Antonio Ordóñez-Fernández. "Circulating miR-320a as a Predictive Biomarker for Left Ventricular Remodelling in STEMI Patients Undergoing Primary Percutaneous Coronary Intervention". *Journal of Clinical Medicine* 2020, 9(4):1051. doi: 10.3390/jcm9041051.
7. Débora Falcón*, **Isabel Galeano-Otero***, Marta Martín-Bórnez, María Fernández-Velasco, Isabel Gallardo-Castillo, Juan A Rosado, Antonio Ordóñez, Tarik Smani. "TRPC Channels: Dysregulation and Ca²⁺ Mishandling in Ischemic Heart Disease". *Cells* 2020, 9(1):173. doi: 10.3390/cells9010173.
8. Javier Ávila-Medina*, Isabel Mayoral-González*, **Isabel Galeano-Otero***, Pedro C Redondo, Juan A Rosado, Tarik Smani. "Pathophysiological significance of store-operated calcium entry in cardiovascular and skeletal muscle disorders and angiogenesis". *Advances in Experimental Medicine and Biology* 2019, 1131:489-504. doi: 10.1007/978-3-030-12457-1_19.
9. Debora Falcón*, **Isabel Galeano-Otero***, Eva Calderón-Sánchez*, Raquel Del Toro, Marta Martin-Bornez, Juan A Rosado, Abdelkrim Hmadcha, Tarik Smani. "TRP Channels: Current Perspectives in the Adverse Cardiac Remodeling". *Frontiers in Physiology* 2019, 10:159. doi: 10.3389/fphys.2019.00159.

Comunicaciones a Congresos:

1. **Isabel María Galeano-Otero**, Raquel Del Toro, Isabel Mayoral-González Antonio Ordóñez-Fernández, Tarik Smani. "Deciphering

the role of Store Operated Ca^{2+} entry in post-ischemic angiogenesis". *Frontiers in Cardiovascular Medicine* 2022. Budapest, Hungría. Póster.

2. **Isabel Galeano-Otero**, Raquel del Toro, Tarik Smani. "Emergent role of SARAF and Store Operated Ca^{2+} entry in angiogenesis". *International symposium on calcium signaling and excitation-contraction coupling in cardiac, skeletal and smooth muscle* 2021. Online. Póster.
3. **Isabel María Galeano-Otero**, Raquel Del Toro, Isabel Gallardo-Castillo, Tarik Smani. "Store Operated Ca^{2+} entry and Angiogenesis". *Red Española de Canales Iónicos* 2019. Cáceres, Extremadura, España. Póster.
4. Raquel Del Toro-Estévez, Francisco José Guerrero-Márquez, **Isabel Galeano-Otero**, Agustín Guisado-Rasco, Luis Díaz-de la Llera, Gonzalo Barón-Esquivias, Tarik Smani, Antonio Órdoñez-Fernández. "Caracterización de las subpoblaciones de monocitos inflamatorios en el infarto de miocardio con elevación del segmento ST revascularizado: Implicaciones en el pronóstico del remodelado ventricular adverso". *Sociedad Española de Cardiología* 2018. Sevilla, Andalucía, España. Póster.
5. Raquel Del Toro-Estévez, Francisco José Guerrero-Márquez, **Isabel Galeano-Otero**, Agustín Guisado-Rasco, Luis Díaz-de la Llera, Gonzalo Barón-Esquivias, Tarik Smani, Antonio Órdoñez-Fernández. "Analysis of pro-inflammatory monocyte subsets in ventricular adverse remodeling. Implications in heart failure". *XXXIX Congress of the Spanish Society for Physiological Sciences (SECF)* 2018. Cádiz, Andalucía, España. Comunicación Oral.
6. Raquel Del Toro-Estévez, **Isabel Galeano-Otero**, Ignacio Díaz, Agustín Guisado-Rasco, Manuel Jiménez-Navarro, Tarik Smani, Antonio Órdoñez-Fernández. "Circulating miRNAs associated with acute myocardial infarction treated with primary percutaneous coronary intervention". *Frontiers in Cardiovascular Biology* 2018. Viena, Austria. Póster.

Índice

Índice Figuras y Tablas	v
Abreviaturas.....	xi
Resumen	xv
<i>Abstract</i>	xix
Introducción	1
1. Formación de los vasos sanguíneos	3
1.1. Vasculogénesis y angiogénesis en el desarrollo.....	3
1.1.1. Células <i>tip</i>	7
1.1.2. Células <i>stalk</i>	9
1.1.3. Células phalanx.....	12
2. Las CE en la arquitectura del árbol vascular: angiogénesis.....	14
2.1. Angiogénesis como respuesta patológica: Cáncer	16
2.2. Angiogénesis post-isquémica como medida de supervivencia	17
3. Vía de señalización de VEGF	20
4. Vía de señalización de Notch	23
5. Señalización de calcio en las CE	26
6. Store Operated Ca ²⁺ Entry (SOCE)	27
6.1. Mecanismo de activación y componentes moleculares de SOCE	27
6.2. Papel de SARAF en SOCE	30
6.3. Papel de TRPs en SOCE y CE	32

Objetivos/Objectives.....	35
Materiales y métodos.....	39
1. Estudio en pacientes	41
1.1. Criterios de inclusión	41
1.2. Extracción sanguínea	42
1.3. Inmunoabsorción ligada a enzimas (ELISA)	43
2. Estudios con modelo animal	45
2.1. Modelo animal de Isquemia/Reperusión (I/R)	45
2.2. Análisis de angiogénesis en retina de ratón neonato.....	46
2.3. Ensayo de <i>sprouting</i> en anillo aórtico de rata.....	48
3. Estudios experimentales de angiogénesis <i>in vitro</i>	51
3.1. Cultivo celular.....	51
3.2. Ensayos de transfección con siARNs.....	52
3.3. Cultivo 3D: Mimetitas <i>assay</i>	53
3.4. Formación de tubo de las células endoteliales	56
3.5. Ensayo de proliferación celular	57
3.6. Ensayo de migración en células endoteliales	59
4. Ensayo de microfluorimetría de Ca²⁺.....	60
4.1. FURA-2 como fluoróforo.....	60
4.2. Sistema de microfluorimetría de Calcio.....	61
4.3. Protocolo del experimento	62
5. Inmunofluorescencia	65
5.1. Inmunofluorescencia de proteínas.....	65
5.2. <i>Proximity Ligation Assay</i> (PLA)	66
6. Extracción de ARN y cuantificación por PCR cuantitativa	68
6.1. Extracción y cuantificación de ARN	68
6.2. Retrotranscripción de ARN	69
6.3. PCR cuantitativa y cuantificación relativa.....	69
7. Western Blot y extracción de proteínas.....	72
7.1. Extracción de proteínas a partir de cultivo celular	72

7.2.	Cuantificación de proteínas mediante WB	73
8.	Análisis de los datos	75
Resultados		77
1.	Caracterización de papel de SOCE en la angiogénesis	79
1.1.	El bloqueo de SOCE afecta a la angiogénesis mediada por <i>sprouting</i>	79
1.2.	La inhibición de SOCE atenúa la formación de tubos y la migración de las HUVEC	81
1.3.	La inyección de GSK irrumpe el desarrollo de los vasos de la retina en el ratón neonato	83
2.	VEGF induce SOCE en las HUVEC	87
3.	SARAF y Orai1 como mediadores clave en la angiogénesis	89
3.1.	Orai1 participa en la entrada de Ca ²⁺ mediada por VEGF en las HUVEC.....	89
3.2.	SARAF es crucial para la entrada de Ca ²⁺ mediada por VEGF en las HUVEC.....	91
3.3.	Rol de las proteínas SARAF y Orai1 en la formación de tubos, proliferación y migración de las HUVEC.....	93
3.4.	Orai1 y SARAF colocalizan en las HUVEC	96
4.	Angiogénesis post-isquémica	98
4.1.	Estudio de citoquinas en el suero de los pacientes STEMI	98
4.2.	El suero isquémico induce mayor formación de tubos	99
4.3.	El suero isquémico promueve la migración de las HUVEC	102
4.4.	El suero de paciente tras infarto de miocardio estimula la migración de las células <i>tip</i> en el modelo de angiogénesis en 3D.....	105
4.5.	El suero isquémico no afecta a la proliferación de las HUVEC	106
4.6.	El suero de pacientes STEMI exacerba el influjo de Ca ²⁺ inducida por el vaciado de los reservorio	107
5.	Papel de Orai1 en la angiogénesis post-isquémica	109
5.1.	Orai1 es crucial para la migración de las células <i>tip</i>	109

5.2. Orai1 media la activación de MEF2A inducida por el suero isquémico en las HUVEC	112
5.3. Orai1 y otras rutas de señalización importantes para la angiogénesis post-isquémica: Notch1 y VEGF	113
5.4. El suero de ratas del modelo de isquemia y reperfusión (I/R) activa las rutas de señalización Orai1, Notch1 y VEGF	118
Discusión	121
1. Nuevas dianas para controlar la angiogénesis	122
2. SOCE y sus componentes en angiogénesis	124
3. Papel de SARAF en la fisiología de la célula endotelial	127
4. Angiogénesis post-isquémica.....	130
5. Orai1 en la angiogénesis post-isquémica.....	134
6. Orai1 y la activación de MEF2A durante la angiogénesis post-isquémica	136
7. Orai1 y la vía de Notch1 en la angiogénesis post-isquémica	138
Conclusiones/Conclusions	143
Referencias	149

Índice
Figuras y Tablas

An anatomical line drawing of a human heart, showing the four chambers (right and left atria and ventricles) and the major blood vessels (superior and inferior vena cava, aorta, and pulmonary artery and vein). The drawing is positioned behind the text.

INTRODUCCIÓN

Figura 1. Formación de los vasos sanguíneos en el embrión: vasculogénesis y angiogénesis.....	4
Tabla 1. Marcadores de las células endoteliales <i>tip</i> y <i>stalk</i>	5
Figura 2. Comunicación entre las células endoteliales: fenotipos <i>tip</i> y <i>stalk</i>	7
Figura 3. Inducción del fenotipo de célula <i>tip</i> en las células endoteliales.....	8
Figura 4. Características de los diferentes fenotipos de las células endoteliales: <i>tip</i> , <i>stalk</i> y <i>phalanx</i>	10
Figura 5. Disposición de las células endoteliales en el endotelio de los capilares sanguíneos.....	14
Figura 6. Angiogénesis post-isquémica en el corazón tras un infarto de miocardio.....	18
Figura 7. Ligandos y receptores de la familia del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).....	20
Figura 8. Rutas de señalización desencadenadas en las células endoteliales (CEs) tras la unión del factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A) a su receptor VEGFR2.....	22
Figura 9. Vía de señalización de Notch1.....	25
Figura 10. Parte de la ruta de entrada de Ca ²⁺ store-operated calcium entry (SOCE) vía canales Ca ²⁺ release activated Ca ²⁺ (CRAC).....	29
Figura 11. Papel dual de SOCE-associated regulatory factor (SARAF) en la vía store-operated calcium entry (SOCE)	31

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 12. Esquema de trabajo realizado para el estudio de los vasos de la retina de ratones neonatos.....	47
Figura 13. Esquema de trabajo para el ensayo de <i>sprouting</i> en anillos aórticos de rata.....	48
Tabla 2. Secuencia de siARNs utilizados durante el desarrollo de la tesis.....	53
Figura 14. Cultivo en 3D de HUVEC en placas OrganoPlate® (Mimetas).....	54
Figura 15. Protocolo de estimulación de Ca ²⁺ con VEGF.....	63
Figura 16. Protocolo del experimento problema de Ca ²⁺	63
Figura 17. Protocolo del experimento de Ca ²⁺ con taspigargina.....	64
Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados durante el desarrollo de la tesis doctoral.....	66
Figura 18. Fundamento del ensayo de inmunofluorescencia <i>proximity ligation assay</i> (PLA).....	67
Tabla 4. Sondas genes utilizadas durante el desarrollo de la tesis doctoral.....	70
Tabla 5. Anticuerpos primarios usados para Westen Blot (WB).....	75

RESULTADOS

Figura 19. GSK-7975A (GSK) reduce el <i>sprouting</i> a partir de anillos aórticos de rata...	79
Figura 20. La cuantificación con ImageJ revela que GSK-7975A (GSK) reduce el número de las ramificaciones vasculares a partir de anillos aórticos de rata.....	81
Figura 21. La presencia de GSK-7975A (GSK) disminuye la disposición en tubo de las HUVEC.....	82
Figura 22. GSK-7975A (GSK) retrasa la migración de las HUVEC en el ensayo de <i>wound healing</i>	83

Figura 23. GSK-7975A (GSK) altera la vascularización de la retina de ratón.....	84
Figura 24. La inyección intraperitoneal de concentraciones crecientes de GSK-7975A (GSK) afecta de forma cuantitativa al desarrollo de los vasos de la retina de ratón.....	85
Figura 25. GSK-7975A (GSK) altera la vascularización de la retina de ratón (II)	86
Figura 26. La inyección intraperitoneal de concentraciones crecientes de GSK-7975A (GSK) afecta de forma cuantitativa al desarrollo de los vasos de la retina de ratón II.....	87
Figura 27. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) induce la entrada store-operated calcium entry (SOCE) en las HUVEC.....	88
Figura 28. Papel de Orai1 en la entrada de Ca ²⁺ store-operated calcium entry (SOCE) inducida por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).....	90
Figura 29. Rol de SARAF en la entrada de Ca ²⁺ store-operated calcium entry (SOCE) inducida por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF).....	92
Figura 30. La inhibición mediada por siARNs de Orai y SARAF reduce la capacidad de formación de tubos de las HUVEC.....	94
Figura 31. El bloqueo de la expresión de Orai1 y SARAF reduce la tasa de proliferación de las HUVEC.....	95
Figura 32. Orai1 y SARAF son esenciales para la migración de HUVEC en el ensayo de <i>wound healing</i>	96
Figura 33. SARAF y Orai1 colocalizan en las HUVEC.....	97
Figura 34. SARAF y Orai1 colocalizan en las HUVEC (II).	98
Figura 35. El suero de los pacientes isquémicos tras la angioplastia posee mayor cantidad de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) e interleuquina 17A (IL-17A)	99
Figura 36. El suero de pacientes con STEMI estimula la formación de tubos en las HUVEC.....	100
Figura 37. El suero de rata operada de isquemia/reperfusión (I/R) promociona la disposición en tubo en las HUVEC.....	102
Figura 38. El suero post-isquémico de humano acelera la cicatrización de la herida en el ensayo de <i>wound healing</i>	103
Figura 39. El suero post-isquémico de rata acelera la cicatrización de la herida en el ensayo de <i>wound healing</i>	104
Figura 40. El suero post-isquémico de paciente acelera migración de las células <i>tip</i> en el ensayo de angiogénesis en 3D.....	105
Figura 41. El suero isquémico de paciente reduce el número de células, pero no la proliferación de las HUVEC.....	107
Figura 42. Las HUVEC pretratadas con suero isquémico de paciente presentan mayor entrada de Ca ²⁺ que las tratadas con suero control.....	108
Figura 43. La incubación con suero isquémico de paciente incrementa la expresión Orai1 tras 48 h.....	109
Figura 44. El bloqueo de Orai1 previene la migración de las células <i>tip</i> tras la adición de suero post-isquémico de paciente en el ensayo de angiogénesis en 3D.....	110
Figura 45. Orai1 lidera el frente de migración de las células <i>tip</i> en cultivo.....	111
Figura 46. El silenciamiento de Orai1 previene la activación de MEF2A inducida por suero isquémico en HUVEC.....	112
Figura 47. El bloqueo de Orai1 condiciona la expresión de Notch1, Hes1 y Hey1 en HUVEC tratadas con suero isquémico de paciente.....	115
Figura 48. El bloqueo de Notch1 previene la expresión de Orai1 en HUVEC tratadas con suero isquémico de paciente.....	116
Figura 49. El bloqueo de Orai1 condiciona la expresión de VEGF-A en HUVEC tratadas	

con suero isquémico de paciente.....	117
Figura 50. La incubación con suero isquémico de rata incrementa la expresión Orai1 tras 48 h.....	118
Figura 51. El bloqueo de Orai1 condiciona la expresión de VEGF, Notch1, Hes1 y Hey1 en HUVEC tratadas con suero isquémico de rata.....	120

DISCUSIÓN

Figura 52. Situaciones fisiológicas y patológicas donde tiene lugar la angiogénesis en el adulto.....	122
Figura 53. SOCE es esencial para la angiogénesis.....	125



Abreviaturas

- ACTP:** angioplastia coronaria transluminal percutánea
- Ang2:** angiopoyetina 2
- ARC:** entrada de Ca^{2+} regulada por ácido araquidónico
- BSA:** *bovine serum albumin*
- [Ca^{2+}]:** concentración del ion calcio intracelular
- CE:** células endoteliales
- CML:** células musculares lisas
- CRAC:** *Ca²⁺ release activated Ca²⁺*
- DII4:** *Notch delta-like 4*
- EBM-2:** *endothelial basal medium*
- ECC:** entrada capacitativa de calcio
- EGM-2™:** *endothelial growth medium BulletKit-2*
- ELISA:** inmunoabsorción ligada a enzimas
- FGF:** factor de crecimiento de fibroblastos
- GSK:** GSK-7975A
- HES:** *hairy/enhancer of split*
- HUVEC:** human umbilical vein endothelial cells
- IAM:** infarto agudo de miocardio
- IB4:** isolectina B4 biotinilada
- IL-17:** interleuquina 17
- IM:** infarto de miocardio
- KLF2:** factor 2 *Kruppel-like*
- MB:** membrana basal

MEF2: factor potenciador específico de miocito 2

MP: membrana plasmática

NICD: dominio intracelular de Notch1

PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas

PFA: paraformaldehído

PKC: proteína quinasa C

PLA: *proximity ligation assay*

PLC- γ : fosfolipasa C- γ

PIGF: factor de crecimiento placentario

RE: retículo endoplasmático

SARAF: *SOCE-associated regulatory factor*

SOCCs: *store-operated calcium channels*

SOCE: store-operated calcium entry

STEMI: IAM con elevación del segmento ST

STIM1: *stromal interacting molecule 1*

TNF- α : factor de necrosis tumoral- α

TRP: *transient receptor potential*

VEGF: factor de crecimiento vascular endotelial

VEGFR1: receptor de VEGF 1

VEGFR2: receptor de VEGF 2

WB: *western blot*

Resumen



La angiogénesis se define como el proceso llevado a cabo por las células endoteliales (CE) por el cual se forman nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes. Su regulación es precisa y está controlada por factores pro-angiogénicos, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). VEGF activa diferentes rutas de señalización que promueven el incremento de las concentraciones de calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$). Estudios recientes sugieren que el cambio de $[Ca^{2+}]_i$ regulado por SOCE, del inglés *store-operated calcium entry*, tiene un papel fundamental en el proceso de angiogénesis. Sin embargo, siguen siendo escasos los conocimientos sobre el papel que desempeñan en este proceso sus proteínas claves, entre ellas, SARAF, el emergente factor regulador de SOCE, y Orai1, la subunidad formadora del poro de los canales de SOCE.

En este estudio demostramos que la inhibición de SOCE usando GSK-7975A (GSK), bloquea el crecimiento de los brotes a partir de anillos de aorta de rata cultivados *ex vivo*, la migración y la formación de tubos de CE humanas derivadas de la vena umbilical (HUVEC); y afecta significativamente al desarrollo de los vasos de la retina de ratón neonato. Encontramos que Orai1 y SARAF colocalizan en HUVEC y están implicados en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ mediada por VEGF. En esta misma línea, encontramos que la supresión de la expresión de ambas proteínas, usando siARNs, reduce significativamente la formación de tubos, la proliferación y la migración de las HUVEC. Por otra parte, motivados por estudiar la angiogénesis desde un punto de vista traslacional, demostramos que el suero de pacientes que han padecido un infarto severo del corazón con elevación del segmento ST (STEMI) contiene elevados niveles de VEGF-A e interleuquina 17 A (IL-17A). Además, demostramos que el suero isquémico promueve la formación de tubos y la migración de las HUVEC, así como la atracción de las células *tip* en cultivo 3D de HUVEC. Igualmente, usando taspigargina como estímulo de vaciado de reservorios, observamos una exacerbación de SOCE en células tratadas con suero isquémico que se correlacionó con un aumento en la expresión proteica de Orai1. Finalmente, en presencia de suero isquémico, evidenciamos que la inhibición de Orai1 previene la activación de MEF-2A, la migración de las células *tip* y la expresión de *Notch1*, *Hes1*, *Hey1* y *VEGF-A* en HUVEC. Estos hallazgos se corroboraron utilizando suero de ratas sometidas a isquemia/reperfusión (I/R).

Nuestros resultados muestran por primera vez la interacción funcional entre SARAF y Orai1 en las CE, remarcan el rol de las proteínas en el proceso de angiogénesis, y relacionan a Orai1 y SOCE con el proceso de angiogénesis post-isquémica.



Angiogenesis is the process which is controlled by endothelial cells (EC) to form new blood vessels from preexisting vascular beds. This process is tightly regulated by pro-angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor (VEGF), which promote signaling pathways involving an increase in the intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$). Recent studies suggest that store-operated calcium entry (SOCE) might play a role in angiogenesis. However, little is known regarding the role of SOCE proteins, such as SARAF, the SOCE-associated regulatory factor, and Orai1, the pore-forming subunit of the store-operated calcium channel (SOCC), in this process.

In the present study, we demonstrate that SOCE inhibition using GSK-7975A (GSK) blocks *ex vivo* rat aorta sprouting, as well as human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) tube formation and migration. Likewise, the intraperitoneal injection of GSK drastically affects the development of mice retinal vasculature. Moreover, we find that Orai1 and SARAF colocalize in HUVEC and both are involved in VEGF-mediated $[\text{Ca}^{2+}]_i$. We also show that Orai1 and SARAF knockdown, using siRNA, impairs HUVEC tube formation, proliferation, and migration. Furthermore, in order to study angiogenesis from a translational perspective, we demonstrated that serum from patients with ST segment elevation myocardial infarction (STEMI) show high levels of VEGF and interleukin 17A (IL-17A). In the same vein, we find that ischemic serum promotes HUVEC tube formation and migration, as well as, tip cells attraction in 3D cell culture of HUVEC. Using thapsigargin to stimulate endoplasmic reticulum (RE) emptying, we observed an exacerbation of SOCE in HUVEC treated with ischemic serum which correlated with Orai1 overexpression. Finally, adding ischemic serum, we demonstrate that Orai1 knockdown prevents MEF-2A activation, tip cells migration and the expression of *Notch1*, *Hes1*, *Hey1* and *VEGF-A* in HUVEC. These findings were confirmed using serum from rats after heart ischemia/reperfusion (I/R).

Our data show for the first time a functional interaction between SARAF and Orai1 in EC and highlight their essential role in different processes of angiogenesis. In addition, we provided first evidence Orai1 function in angiogenesis induced by myocardial infarction.



Introducción

1. FORMACIÓN DE LOS VASOS SANGUÍNEOS

Los vasos sanguíneos son los conductos fisiológicos que permiten el tráfico de nutrientes, desechos, factores de crecimiento y de células inmunes por todo el organismo. Son, pues, cruciales para el mantenimiento de la homeostasis corporal. En los invertebrados más primitivos, estos canales carecían de células y se basaban en tubos huecos que eran suficientes para satisfacer las necesidades fisiológicas (Muñoz-Chápuli et al., 2005). Con el aumento progresivo de la complejidad de los organismos y, por ello, de la anticipación de las demandas metabólicas, los vasos sanguíneos se adaptaron y desarrollaron un revestimiento de células endoteliales (CE). Así, este cambio evolutivo supuso la dinamización de los conductos sanguíneos, puesto que permitía el crecimiento y/o retroceso de los mismos en todos los puntos de la vida del mamífero (Stapor et al., 2014).

1.1. VASCULOGÉNESIS Y ANGIOGÉNESIS EN EL DESARROLLO

El sistema circulatorio comienza a desarrollarse durante las primeras etapas del embrión. Concretamente, la formación de los vasos sanguíneos se lleva a cabo mediante dos fenómenos. Al principio, tiene lugar la vasculogénesis (Figura 1A), proceso donde los progenitores mesodérmicos de las CE (angioblastos) comienzan a expresar marcadores endoteliales (ej. receptor del factor de crecimiento vascular endotelial 2: VEGFR2) y se diferencian a CE con el fin de ensamblar la red vascular inicial (Kubis and Levy, 2003; Naito et al., 2021). La vasculogénesis se conoce también como síntesis *de novo* de los canales vasculares, y está estimulada principalmente por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2) y la proteína morfogénica 4 (BMP4) (Bruveris et al., 2021; Goldie et al., 2008).

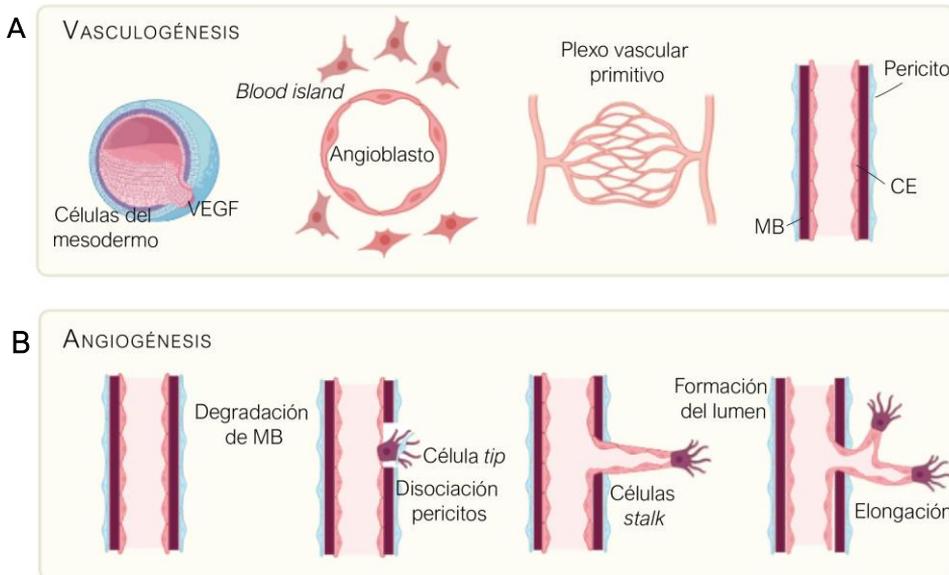


Figura 1. Formación de los vasos sanguíneos en el embrión: vasculogénesis y angiogénesis. **A.** La vasculogénesis se produce cuando los progenitores endoteliales mesodérmicos (angioblastos) comienzan a expresar marcadores endoteliales, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), y generan el plexo vascular primitivo, conformando los principales vasos del adulto. Estos conductos iniciales están compuestos por células endoteliales (CE) protegidos por una membrana basal (MB) recubierta a su vez por pericitos. **B.** El resto de vasos del árbol vascular se generan a partir de estos conductos primitivos mediante angiogénesis, generalmente mediante *sprouting*, como la que se representa. Diferentes señales angiogénicas, como el VEGF, producen, en primer lugar, la disgregación de los pericitos y de la MB que recubre el vaso y, en segundo lugar, la diferenciación de las CE en células *tips* que migran hacia el estímulo. A su vez, las células *tips* polarizan a sus CE colindantes hacia células *stalk*, encargadas de elongar al nuevo vaso. Figura creada con BioRender.com y Adobe Illustrator 2020.

Una vez que se estructura el plexo vascular, comienza el proceso de angiogénesis (Figura 1B), definido como la formación de vasos sanguíneos a partir de la aparición de nuevos brotes celulares (por *sprouting*) y/o de la escisión (intususceptiva) de los vasos pre-existentes. El proceso de angiogénesis intususceptiva, también conocida como *non-sprouting* angiogénesis, se puede llevar a cabo mediante la proliferación de las CE dentro del vaso y su posterior escisión, o bien mediante la fusión y corte de

los capilares generados (Werner Risau, 1997). La angiogénesis mediante *sprouting* (Figura 1B), que es a la que nos referiremos a partir de ahora, se desencadena por la disociación de los pericitos que recubren al vaso sanguíneo maduro y por la degradación de la membrana basal (MB) envolvente. Ambos procesos se inducen mediante señales angiogénicas, entre las que destaca el VEGF-A. A su vez, este factor induce la diferenciación de las CE de la superficie del vaso a nivel morfológico y funcional en fenotipos conocidos como células *tip*, encargadas de constituir los filopodios que se polarizan hacia el estímulo angiogénico, y células *stalk*, responsables de elongar la ramificación vascular (Blanco and Gerhardt, 2013; Gerhardt et al., 2003). De esta forma, la parte opuesta al filopodio de la célula *tip* permanece en continuo contacto con la *stalk* a fin de dar robustez a la nueva ramificación y evitar su desestabilización (Chen et al., 2019). Finalmente, tras el cese del estímulo angiogénico, las CE se diferencian hacia un tercer tipo celular denominado células *phalanx* definidas como CE quiescentes encargadas de dar soporte al nuevo vaso (Norton and Popel, 2016).

La caracterización de células *tip* y *stalk* ha sido ampliamente estudiada y se han establecido marcadores que determinan la firma molecular de cada uno de los fenotipos (Tabla 1).

Marcadores	CÉLULAS ENDOTELIALES	
	<i>Tip</i>	<i>Stalk</i>
Dll4	+	-
Notch1 - NICD	-	+
VEGFR1	-	+

VEGFR2	+	-
VEGFR3	+	-
Nrp-1	+	-
Ang2	+	-

Tabla 1. Marcadores de las células endoteliales *tip* y *stalk*. Dll4: *Delta like canonical Notch ligand 4*; NICD: *Notch intracelular domain*; VEGFR: receptor del factor de crecimiento vascular endotelial; Nrp-1: neuropilin-1; Ang2: angiopoyetina 2 (Blanco and Gerhardt, 2013; Gerhardt et al., 2003; MacK and Luisa Iruela-Arispe, 2018; Moya et al., 2012; Tammela et al., 2008; Del Toro et al., 2010).

Más detalladamente, se conoce que la presencia de VEGF-A estimula la sobreexpresión del ligando de Notch Delta-like 4 (Dll4) (*más detalle en 3. Vía de señalización de Notch*) en CE quiescentes, confiriéndoles la capacidad de liderar el brote celular al convertirse en célula *tip*. A su vez, el Dll4 expresados por las mismas activa la señalización de la vía de Notch1 de las CE colindantes, lo que les otorga un fenotipo más proliferativo, característico de las células *stalk* (Figura 2). La vía de Notch1, además, es la responsable del aumento en la expresión del receptor de VEGF 1 (VEGFR1) y de genes diana de la vía de Notch1, así como de la disminución de la expresión de VEGFR2 y de su co-receptor Neuropilin-1 (Nrp-1) en las células *stalk*. Contrariamente, la señalización de Notch1 no se induce en las células *tip* que sobreexpresan, por tanto, VEGFR2, Nrp-1, así como VEGFR3 (Blanco and Gerhardt, 2013; Gerhardt et al., 2003; MacK and Luisa Iruela-Arispe, 2018; Moya et al., 2012). Curiosamente, únicamente el endotelio linfático expresa VEGFR3 en el adulto, pero su expresión se reactiva cuando se produce angiogénesis, ya sea por motivo fisiológico o patológico (Kubo et al., 2000; Tammela et al., 2008). Por otra parte, se ha descrito que la expresión de la angiopoyetina 2 (Ang2) también es exclusiva de las células

tip frente a las *stalk*, sirviendo como marcador de las mismas (Del Toro et al., 2010). A continuación, profundizaremos en los diferentes fenotipos de las CE.

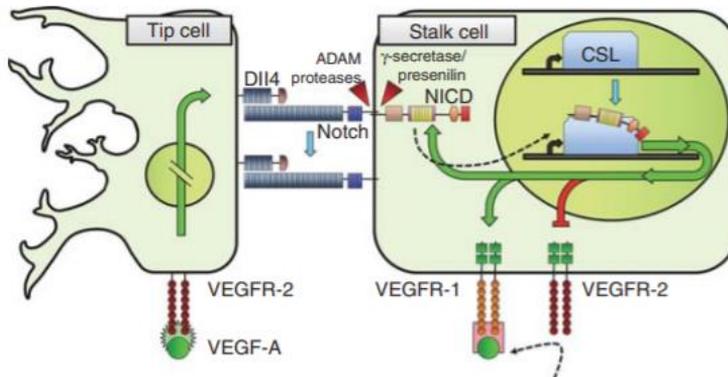


Figura 2. Comunicación entre las células endoteliales: fenotipos *tip* y *stalk*. Durante la angiogénesis, el factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A) produce la polarización de las células endoteliales (CE) hacia células *tip*, estimulando la sobreexpresión del ligando de Notch Delta-like 4 (Dll4) y del receptor de VEGF 2 (VEGFR2). A su vez, este Dll4 induce el corte del receptor de Notch1 de la CE adyacentes, activando la señalización de la vía de Notch1 de las CE vecinas, concediéndoles un fenotipo más proliferativo, característico de las células *stalk*. La activación de la vía de Notch1 supone una disminución en la expresión del VEGFR2 y un aumento de la expresión del receptor de VEGFR1. Esquema tomado de Tung y col. (Tung et al., 2012).

1.1.1. Células *tip*

Como hemos descrito con anterioridad, las células *tip* son las CE que dirigen al nuevo brote celular (Figura 3A). En relación a su metabolismo, éstas presentan una alta tasa de glucólisis provocada, en parte, por la regulación al alza del VEGF sobre la enzima 6-fosfofructo-2-quinasa / fructosa-2,6-bifosfatasa 3 (PFKFB3), activadora de la fosfofructoquinasa-1 (De Bock et al., 2013).

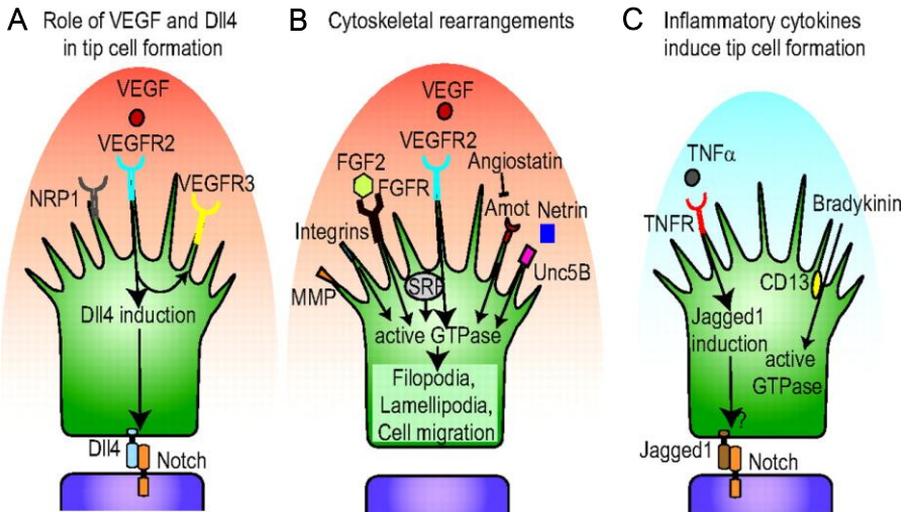


Figura 3. Inducción del fenotipo de célula *tip* en las células endoteliales. La diferenciación de las células endoteliales (CE) hacia células *tip* es llevada a cabo principalmente por **A.** el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), inductor de la producción de Dll4 en la célula. Además de VEGF, **B.** otras moléculas del nicho angiogénico, como la netrina o el factor de crecimiento vascular de fibroblastos 2 (FGF2) promocionan el fenotipo *tip* estimulando la actividad GTPasa de la célula, necesaria para la formación del filopodio y el lamelipodio y, por tanto, para la migración celular. **C.** En determinadas situaciones fisiológicas y patológicas donde existe activación de las células inflamatorias del sistema inmune, diferentes citoquinas, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la bradquinina, promueven también la inducción del fenotipo de célula *tip* en las CE. Modificada de Smet y col. (De Smet et al., 2009).

Entre otras características de las células *tip*, destaca su baja tasa de proliferación, en contraposición a su notable capacidad migratoria. Para desarrollarla, alterna su organización citoesquelética entre dos estructuras dinámicas: el lamelipodio y el filopodio. El lamelipodio se conforma por disposiciones en velo de fibras con un alto contenido de actina que se localizan en la proximidad de la membrana plasmática (MP). Los filopodios, por su parte, son prolongaciones en pico de la MP donde los filamentos de actina (F-actina), generados a partir del lamelipodio, se encuentran formando haces paralelos. Ambas se organizan tras los primeros minutos de

la estimulación, y son capaces de sensar señales atractivas o repulsivas de guía. En este sentido, las señales de atracción, como el VEGF-A, estimulan la polimerización de la F-actina y, con ello, el avance del filopodio, mientras que las señales repulsivas provocan la despolimerización de la fibra y, por consiguiente, la retracción de la estructura (Huber et al., 2003; De Smet et al., 2009). En general, la regulación de la alternancia entre filopodio y lamelipodio se lleva a cabo por los miembros de la familia Rho GTPasas (Figura 3B), principalmente, por RhoA, Rac1 y Cdc42. Estas proteínas se activan tras la estimulación de diferentes receptores de membrana, como los que están acoplados a proteína G. En esta misma línea, se ha demostrado que estas moléculas actúan también aguas abajo del receptor VEGFR2, de tipo tirosina quinasa (Fantin et al., 2015; Ispanovic et al., 2008; Lamalice et al., 2004; Shen et al., 2021).

Además de la polarización de la célula *tip* y de la consecuente migración del filopodio producida por VEGF-A, existen otras moléculas atrayentes capaces ejercer un efecto similar sobre las CE. Entre otras, destaca el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) (Figura 3C), citoquina inflamatoria que induce la expresión de los marcadores *tip* PDGF-BB y VEGFR2. Igualmente, el péptido inflamatorio bradquinina es capaz de estimular la formación del filopodio vía Cdc42 (De Smet et al., 2009).

1.1.2. Células *stalk*

Como ya se mencionó anteriormente, las células *stalk* conforman el soporte de las *tip* en la nueva ramificación y, a diferencia de éstas, no poseen la capacidad de desarrollar filopodios. Por su parte, sus funciones incluyen elongar la nueva ramificación mediante proliferación, la generación del

lumen del vaso y la conexión al sistema circulatorio (Siemerink et al., 2013; De Smet et al., 2009) (Figura 4).

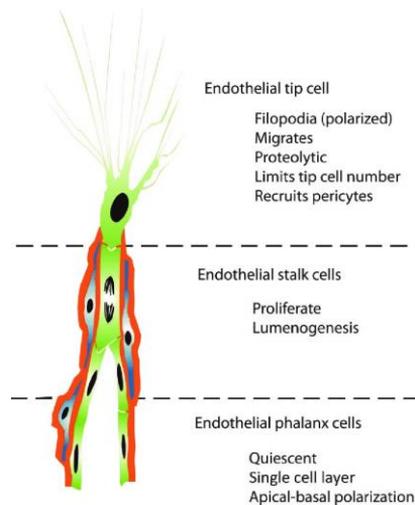


Figura 4. Características de los diferentes fenotipos de las células endoteliales: *tip*, *stalk* y *phalanx*. Durante el proceso de angiogénesis mediante *sprouting*, las células endoteliales (CE) se diferencian en un número limitado de células *tip*; que se caracterizan por liderar el brote vascular mediante la formación del filopodio, por poseer una alta actividad proteolítica, así como por reclutar a los pericitos; en células *stalk* con un fenotipo altamente proliferativo encargadas del proceso de tubulogénesis; y una vez finalizado el proceso, en células quiescentes o *phalanx* que constituyen el nuevo vaso. Imagen tomada de Siemerink y col. (Siemerink et al., 2013).

El destino de la célula *stalk* está determinado por la señalización Dll4/Notch1, activada por la célula *tip* adyacente, que desencadena la escisión, a través de la acción de una γ -secretasa, del dominio intracelular de Notch1 (NICD) que actúa como factor de transcripción. Entre otras dianas, NICD promueve la expresión del VEGFR1(Fit1) y de la proteína de repetición de anquirina (Nrarp), e inhibe la expresión de VEGFR2, VEGFR3, Nrp1 y del correceptor de quimioquinas CXCR4 (CXCR4). A su vez, la Nrarp estimula la señalización de Wnt en las células *stalk*, promoviendo, entre otros eventos, la proliferación de la CE y la estabilización de las nuevas conexiones

endoteliales durante la angiogénesis (Phng et al., 2009). En esta misma línea, la señalización Dll4/Notch también promueve la expresión de genes de migración (ej. VCAM1) y la activación de proteínas de adhesión (ej. β 1-integrinas) (Blanco and Gerhardt, 2013).

Acerca del metabolismo celular de las células *stalk*, al contrario que las células *tip* presentan una baja tasa glucolítica. La señalización de Notch1 vía Dll4 también provoca una disminución de la glucólisis dado que reduce la actividad de la enzima PFKFB3 (Zecchin et al., 2017).

Por otra parte, como muestra de la regulación tan minuciosa que se produce durante la morfogénesis, se ha descrito que el VEGFR1, sobreexpresado por las células *stalk*, puede ser procesado por la γ -secretasa que cataliza el corte de Notch1, liberándose tras ello la parte soluble del receptor (sFlt1). De este modo, sFlt1 actúa captando el VEGF-B y el factor de crecimiento placentario (PlGF) del medio a fin de restringir las respuestas de las CE al VEGF del medio (Failla et al., 2018; Fischer et al., 2008).

Una vez generada la ramificación gracias a la acción coordinada de las células *tip* y *stalk*, el siguiente paso es conformar el lumen del nuevo vaso, proceso conocido como tubulogénesis. Este proceso es clave para la generación de un vaso tubular funcional que permita el paso del flujo sanguíneo. Existen diferentes modelos que explican este fenómeno, ya que, aunque está consensuado que es necesaria la polarización apicobasal, las interacciones con la matriz extracelular y la reorganización del citoesqueleto, sigue sin esclarecerse el mecanismo para su producción (Tung et al., 2012) En sus inicios se propuso el modelo del “*cell hollowing*” basado en la unión de vesículas pinocíticas dentro de la propia célula *stalk*, con el fin de generar

el lumen. Una vez que se produce este “ahuecamiento” celular, la vesícula resultante se dirige hacia un extremo intercelular y se funde con la de la célula adyacente mediante exocitosis. Se genera así un vaso *seamless*, es decir, sin uniones celulares, que es un boceto del futuro vaso maduro. Por otra parte, el modelo alternativo propone el modelo del “*cord hollowing*” donde las vesículas dentro de la célula, no se funden sino que se polarizan hacia el extremo apical y se fusionan con la de las células adyacentes a fin de generar el futuro lumen (Davis and Camarillo, 1996; Davis et al., 2007; Folkman and Haudenschild, 1999; J.R. and Bar, 1972; Kamei et al., 2006).

1.1.3. Células *phalanx*

Una vez formada la nueva ramificación, las CE se vuelven quiescentes (células *phalanx*) y solo un reducido porcentaje conservan la capacidad de dividirse en el individuo adulto (Figura 4). Así, en condiciones normales, la función del vaso se limita a proporcionar nutrientes, biomoléculas, células inmunes, oxígeno a los tejidos, así como a eliminar desechos, usando como medio el flujo sanguíneo, siendo éste crucial para el mantenimiento del fenotipo *phalanx* (Zecchin et al., 2017).

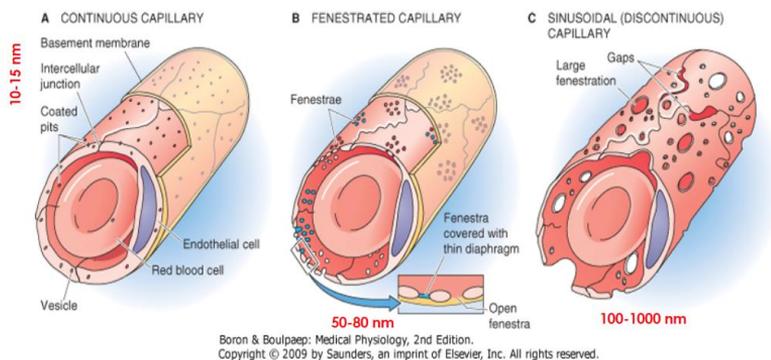
Sobre el metabolismo de este fenotipo celular no se tiene demasiada información. Al permanecer en un estado quiescente, se sospecha que las CE poseen una baja tasa de glucólisis (Kierans and Taylor, 2021). Recientemente, se ha propuesto que es el propio flujo laminar el que reduce la absorción de la glucosa a través del factor 2 *Kruppel-like* (KLF2). De hecho, la eliminación KLF2 restaura la capacidad de absorción. Igualmente, tanto el esfuerzo de cizalladura (*shear stress*) que provoca el flujo como el KLF2 reducen la actividad del PFKFB3, disminuyendo, por tanto, la actividad glucolítica (Doddaballapur et al., 2015).

A continuación, tras la formación del conducto inconcluso, conformado únicamente por CE, se procede a la maduración del vaso a fin de lograr que éste sea funcional. Para ello, se requiere tanto el reclutamiento de los pericitos, como la deposición de la matriz extracelular que conformará la futura MB, ambos procesos controlados por una serie de señales celulares. Principalmente, se ha descrito que el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) es el responsable de atraer a los pericitos y a las células musculares lisas (CML) que se asocian con los brotes endoteliales, aportándoles estabilidad y previniendo la regresión de los mismos (Abramsson et al., 2003; Kobayashi et al., 2006; Song et al., 2009). A continuación, actúan las Ang1 y 2 producidas por las CML que fortalecen la interacción entre los tres tipos celulares: pericitos, CML y CE; y las debilitan al mismo tiempo desestabilizando los vasos, respectivamente. Ambas, Ang1 y 2, son ligandos del mismo receptor Tie-2, por lo que el equilibrio se debe polarizar hacia la Ang1 con el fin de promocionar la maduración del vaso. Aunque no se ha profundizado demasiado en cómo se compensa esta balanza, todo apunta a que son las propias CE las que activan la producción de Ang1 en las CML a través del factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) (Brudnoa et al., 2013). Curiosamente, se conoce que los factores de maduración del vaso, PDGF y Ang1, son también inhibidores de la angiogénesis temprana (Greenberg et al., 2017; Maisonpierre et al., 1997) lo que remarca una vez más la regulación tan fina que existe en este proceso a nivel de señalización celular. Por otra parte, recientemente, se ha demostrado que la expresión del receptor Tie2 no está restringida a CE. Teicher y *col.* han manifestado que los pericitos presentan expresión del receptor que, aunque reducida, es fundamental para el correcto balance de la formación y la maduración del vaso (Teichert et al., 2017).

Como resumen, antes de pasar al siguiente apartado, cabe resaltar que los primeros vasos que se generan en el embrión, como la arteria aorta y las venas cardinales, se forman mediante vasculogénesis. Y a partir de estos conductos principales se generan, mediante angiogénesis, el resto del árbol vascular que conforma el sistema vascular del adulto (Risau and Flamme, 1995).

2. LAS CE EN LA ARQUITECTURA DEL ÁRBOL VASCULAR: ANGIOGÉNESIS

El sistema vascular del adulto se compone por una red de arterias, venas y capilares que se encuentran interconectados formando lo que conocemos como estructura en árbol. Las CE se encuentran en el lumen de los vasos sanguíneos y regulan el intercambio de los nutrientes a las células. Curiosamente, las CE exhiben unas propiedades moleculares y funcionales diferentes dependiendo del órgano al que pertenezcan, lo que confiere heterogeneidad al árbol vascular. Además, presentan diferente distribución (Figura 5).



Uniones estrechas

Cerebro
m. esquelético

Endotelio fino y perforado

Gastrointestinal
riñón

Grandes fenestraciones

Hígado
bazo

Figura 5. Disposición de las células endoteliales en el endotelio de los capilares sanguíneos. En función del territorio al que pertenezcan las células endoteliales se disponen de forma continua (ej. cerebro, músculo esquelético), fenestrada (ej. endotelio gastrointestinal, riñón) o discontinua (ej. hígado, bazo). Tomada de Fisiología Médica de Boron y Boulpaep (Boron and Boulpaep).

En el caso del endotelio de arterias y venas las CE constituyen una continua monocapa, mientras que en el caso del endotelio de los capilares éstas pueden estar continuas, fenestradas o discontinuas atendiendo a las necesidades del tejido. Estas CE reciben, a su vez, las señales y los nutrientes de la MB, la cual manifiesta también diferente composición a lo largo del lecho vascular (Eelen et al., 2020).

Como vimos anteriormente, las CE no proliferan continuamente en el organismo adulto, sino que permanecen en un estado quiescente (células *phalanx*) durante prolongados periodos de tiempo. Sin embargo, siguen poseyendo la habilidad para, en determinadas situaciones, finalizar el letargo e iniciar la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes, proceso, como hemos definido con anterioridad, conocido como angiogénesis (Stapor et al., 2014). La angiogénesis ocurre en respuesta a situaciones donde existe una escasez de oxígeno, o bien de suministro sanguíneo, es decir, en numerosas situaciones, incluyendo la proliferación del endometrio durante los ciclos de menstruación (Girling and Rogers, 2005), la reproducción (Logsdon et al., 2014) o la reparación fisiológica, como por ejemplo en la regeneración del corazón después de un infarto de miocardio (Ingason et al., 2018); y en diferentes patologías, como en la retinopatía diabética (Li et al., 2011a) y el cáncer (Folkman, 1971). Consecuentemente, existe un remodelado continuo del árbol vascular en función a las demandas funcionales de los órganos (Naito et al., 2021).

2.1. ANGIOGÉNESIS COMO RESPUESTA PATOLÓGICA: CÁNCER

A pesar de que el término de angiogénesis no se describió hasta 1971 (Folkman, 1971), John Hunter (1728-1793) fue el primer científico que advirtió de la estrecha relación que existía entre los requerimientos metabólicos y la formación de los nuevos vasos sanguíneos (Adair and Montani, 2010). Años más tarde, esta hipótesis, sumada a otros estudios posteriores, supusieron la base del trabajo de Judah Folkman “*Tumor angiogenesis: therapeutic implications*”. En él, el oncólogo afirmaba que “el crecimiento de las neoplasias sólidas estaba siempre acompañado de una neovascularización” y que, a su vez, esta formación de vasos sanguíneos era indispensable para la supervivencia del tumor (Bielenberg and D’Amore, 2008; Folkman, 1971). Desde entonces, numerosos estudios han reafirmado que estos nuevos vasos son importantes para la proliferación y desarrollo de metástasis, así como para eliminar residuos y suministrar oxígeno y nutrientes al tumor (Nishida et al., 2006). Es por ello que el propio tejido tumoral es capaz de estimular la generación de nuevos conductos mediante la expresión de factores angiogénicos, principalmente VEGF y su receptor VEGFR (Hira Lal Goel and Mercurio, 2013).

Se ha descrito que el proceso angiogénico está motivado por la hipoxia que se genera entre el tumor y los vasos, vía factor inducible por hipoxia 1α (HIF- 1α) (Shi and Fang, 2004). Además, se produce un bloqueo de diferentes factores anti-angiogénicos con el fin de promocionar la angiogénesis. A causa de esto, el nivel de agresividad del tumor se ha relacionado directamente con la expresión de factores angiogénicos (Grépin and Pagès, 2009). Como consecuencia, numerosas investigaciones se han centrado en desarrollar terapias administrando bien factores anti-

angiogénicos, o bien inhibidores de los proangiogénicos, con el fin de mejorar el pronóstico de la enfermedad. No obstante, la eficacia de estos tratamientos sigue en debate en la actualidad debido a que requieren de la combinación de quimio o inmunoterapéuticos. Aunque actualmente incluso se están usando nanomoléculas para el diseño de terapias más localizadas y dirigidas, todo apunta a que se requieren nuevas dianas, más allá de las clásicas, para controlar la angiogénesis y con ello mejorar el pronóstico del tumor (Teleanu et al., 2020).

2.2. ANGIOGÉNESIS POST-ISQUÉMICA COMO MEDIDA DE SUPERVIVENCIA

En el caso del infarto de miocardio (IM), se conoce que la cicatrización del tejido cardíaco tras el período isquémico estimula una respuesta angiogénica que comienza en la zona del borde y se extiende por toda la zona necrótica del núcleo infartado (Figura 6). En modelos experimentales de ratón, se ha demostrado, además, que cuando esta angiogénesis ocurre de forma coordinada, está asociada con un menor tamaño del infarto, un menor desarrollo de remodelado, una mejor función del corazón y por ello, con un mejor pronóstico. Así, parece que la vascularización temprana ofrece nuevas vías para la difusión de nutrientes y eliminación de desechos, así como para la entrada de las células inflamatorias, mejorando, en definitiva, la supervivencia de los cardiomiocitos (Seidel et al., 2016; Wu et al., 2021). En esta misma línea, en otras enfermedades se ha descrito que los factores de crecimiento derivados de las CE promueven la regeneración tisular y la cicatrización (Bao et al., 2009).

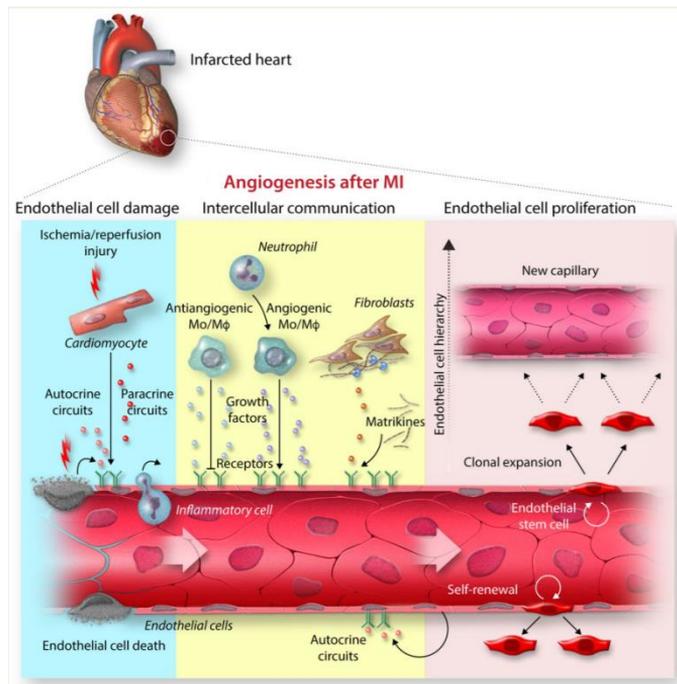


Figura 6. Angiogénesis post-ischémica en el corazón tras un infarto de miocardio. El daño por isquemia/reperfusión del miocardio induce la producción de diferentes señales autocrinas y paracrinas en los cardiomiocitos que provocan la muerte de alguna de las células endoteliales (CE) del corazón. Otras, perduran gracias a diferentes factores secretados por las propias CE que resisten al daño y por las diferentes poblaciones inflamatorias que acuden al corazón tras el infarto. De este modo, estas señales de supervivencia estimulan la renovación y expansión clonal de las CE que generan los nuevos capilares sanguíneos mediante angiogénesis. Esquema tomado de Wu y col. (Wu et al., 2021).

Además de la inducción angiogénica causada por la falta de oxígeno derivada del período isquémico, diferentes estudios avalan que después de la primera semana tras el infarto, la mayoría de las poblaciones del corazón (monocitos, macrófagos, fibroblastos, cardiomiocitos células derivadas del epitelio cardíaco, incluso las CE) de ratas y ratones sometidos a IM, expresan VEGF-A. Paralelamente, las CE de la región infartada de estos animales, mostraron un aumento en la expresión de VEGFR2 (Ferraro et al., 2019; Howangyin et al., 2016; Kobayashi et al., 2017; Kurotsu et al., 2018;

Li et al., 1996; Zhao et al., 2013). No obstante, en otros estudios se ha mostrado que en los ratones y ratas no infartadas también existe un aumento en la expresión de ambos, VEGF y VEGFR (Wu et al., 2021). Esto sugiere que, además de la estimulación por VEGF-A y la hipoxia, existen otros coestimuladores en el medio que favorecen la angiogénesis. Esta hipótesis se ve respaldada por otros estudios donde se han identificado diferentes señales angiogénicas de acción para y autocrina en la región infartada del corazón (Carmeliet et al., 2001; Howangyin et al., 2016; Korf-Klingebiel et al., 2015; Meloni et al., 2010; Robbers et al., 2013). Al mismo tiempo, además de los factores de crecimiento y citoquinas clásicas, se ha detectado un tráfico de microvesículas liberadas desde las diferentes poblaciones del corazón, que contienen nuevas proteínas, péptidos y pequeños ARN codificantes y no codificantes, como microARNs (miARNs), cuyas funciones están por dilucidar (Cheng et al., 2019; Liu et al., 2020; Loyer et al., 2018).

Por otra parte, existe una estrecha relación entre la inflamación y la angiogénesis, dado que como vimos para la polarización a célula *tip*, determinadas citoquinas expresadas por las poblaciones inflamatorias son capaces de desencadenar el proceso angiogénico (De Smet et al., 2009). Curiosamente, en un estudio usando un modelo de ratón de IM con una deleción hemicigota global o restringida de *Notch1*, se detectó un menor nivel de VEGF-A, así como de nuevos vasos, en el corazón del animal infartado. Así, estos resultados aportan evidencias robustas de que la activación de la vía de Notch1 es indispensable para el reclutamiento de las células mieloides tras el infarto (Li et al., 2011c). En esta misma línea, otro ensayo ha demostrado que la inyección de un anticuerpo activador de la vía de Notch1 estimula la angiogénesis en la región infartada y a la larga, atenúa

el desarrollo de remodelado ventricular izquierdo (RVI) en el ratón (Kratsios et al., 2010).

3. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE VEGF

El factor de crecimiento VEGF es esencial para la proliferación, migración, diferenciación, control de la permeabilidad, comportamiento y, por tanto, para la supervivencia de las CE. A continuación, profundizaremos en las vías de señalización reguladas por las diferentes isoformas de VEGF y de sus receptores VEGFR identificados en mamíferos (Figura 7).

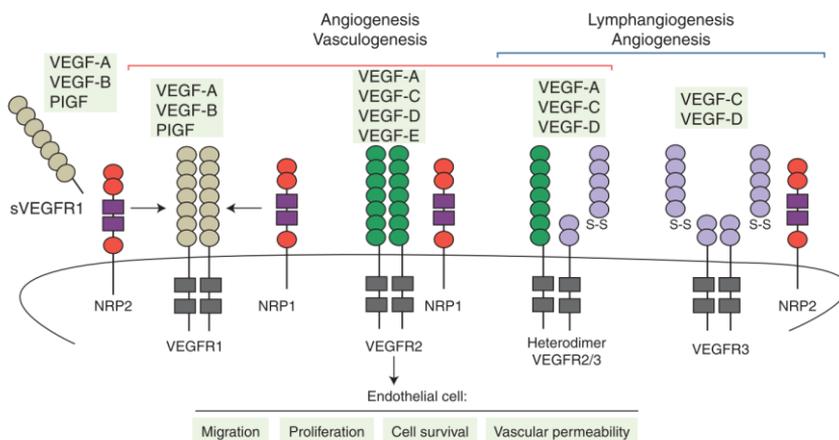


Figura 7. Ligandos y receptores de la familia del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). La familia de los factores de crecimiento VEGF está compuesta a 6 glicoproteínas diméricas: VEGF-A, -B, -C, -D, -E y PIGF, que se secretan por diferentes tipos celulares y tejidos y poseen diferente afinidad por los receptores tirosina quinasa VEGFR1, 2 y 3. Modificada de Blanco and Gerhardt y *col.* (Blanco and Gerhardt, 2013).

La familia de VEGF engloba a 6 glicoproteínas diméricas: VEGF-A, -B, -C, -D, -E y PIGF, que se secretan por diferentes tipos celulares y tejidos. Estas glicoproteínas presentan diferente afinidad por los receptores tirosina quinasa VEGFR1, 2 y 3, los dos primeros mayoritariamente expresados por

las CE, aunque también presentes en neuronas y células mieloides (Bellon et al., 2010; Clauss et al., 1996; Muramatsu et al., 2010). El VEGFR3, por su parte, solo se expresa en el endotelio linfático, en las CE que forman los vasos durante el desarrollo embrionario y cuando se reactiva la angiogénesis en el adulto, ya sea de forma fisiológica o patológica (Tammela et al., 2008).

Todas las isoformas de VEGF coinciden en que al unirse al VEGFR inducen la dimerización del receptor, provocando la autofosforilación de los residuos de tirosina que, a su vez, transactivan a las proteínas intracelulares que contienen el dominio SH2 mediante fosforilación (Mac Gabhann and S. Popel, 2009). Las vías de señalización que se activan tras esto regulan la supervivencia, así como la migración, la proliferación y las interacciones célula-célula en las CE (Blanco and Gerhardt, 2013).

En general, cuando se habla de VEGF, se alude al VEGF-A que es el factor pro-angiogénico por excelencia. Su expresión está regulada por los factores de hipoxia HIF α -1/2, citoquinas, otros factores de crecimiento, oncogenes y genes supresores de tumores (Dvorak, 2005). Durante el *splicing*, se generan diferentes variantes de VEGF-A que determinan la afinidad con la matriz de proteoglicanos y con la superficie celular, determinando así la distribución tisular de las isoformas (Park et al., 1993). En relación a la afinidad por el receptor, a pesar de que VEGF-A se une tanto a VEGFR1 como al 2, exhibe una mayor afinidad por el primero, siendo el segundo el principal mediador del *sprouting* durante la angiogénesis. Sin embargo, VEGFR1 presenta menor actividad tirosina quinasa que VEGFR2 (Mamer et al., 2020; Peach et al., 2018). En el caso concreto de la dimerización de VEGFR2 inducida por VEGF-A, se promueve la activación

de diferentes proteínas que se engloban en diversas vías de señalización (Figura 8).

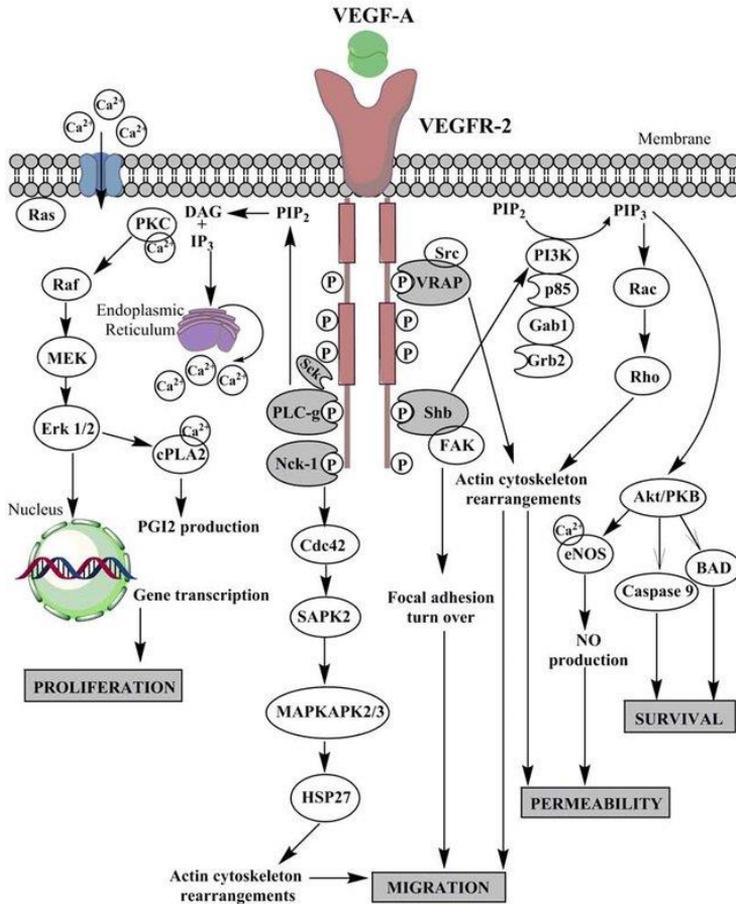


Figura 8. Rutas de señalización desencadenadas en las células endoteliales (CE) tras la unión del factor de crecimiento vascular endotelial A (VEGF-A) a su receptor VEGFR2. La dimerización del receptor tras la unión con el factor de crecimiento, estimula la activación de diferentes proteínas que participan en diferentes vías de señalización, entre otras, la fosfolipasa C- γ (PLC- γ), la proteína quinasa C (PKC), la proteína quinasa B (PKB/AKT), las proteínas quinasas activadas por el mitógeno p38 (p38MAPK), la quinasa de adhesión focal (FAK), el sustrato de la toxina botulínica C3 relacionada con Ras (RAC), RhoGTPasas, las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) y mTOR. La activación de estas rutas de señalización es esencial para la proliferación, migración, permeabilidad y supervivencia de las CE. Imagen tomada de Chekhonin y *col.* (Chekhonin et al., 2013).

Entre otras vías, destacan las que incluyen la fosfolipasa C- γ (PLC- γ), la proteína quinasa C (PKC), la proteína quinasa B (PKB/AKT), las proteínas quinasas activadas por el mitógeno p38 (p38MAPK), la quinasa de adhesión focal (FAK), el sustrato de la toxina botulínica C3 relacionada con Ras (RAC), RhoGTPasas, las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) y mTOR (Blanco and Gerhardt, 2013). La activación simultánea de esta gran variedad de vías de señalización refleja la interconexión que debe existir entre todas ellas para modular el proceso de angiogénesis (Abhinand et al., 2016).

4. VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE NOTCH

Para entender los diferentes fenotipos de CE se ha descrito parte de la vía de Notch1, aunque es necesario profundizar sobre la misma antes de continuar con el siguiente apartado.

Fundamentalmente, los componentes estrella de la vía de Notch son sus receptores y sus ligandos. En relación a los receptores, se han descrito 4 tipos de Notch (1-4) en los vertebrados. En el caso de los ligandos de Notch transmembrana se conocen 5: Jagged1, Jagged2, Dll1, Dll3 y Dll4 (Blanco and Gerhardt, 2013; Fiúza and Arias, 2007; Lindsay et al., 1995; Mailhos et al., 2001; Shutter et al., 2000).

La señalización comienza cuando una célula vecina aproxima uno de los ligandos al receptor de Notch, desencadenando un corte en el receptor a nivel de S2 por ADAM10 (Figura 9). La parte extracelular de Notch unida al ligando es entonces endocitada por la célula que presentó al ligando. A continuación, la parte remanente del receptor que queda en la membrana es cortada por el complejo γ -secretasa, donde se escinde la

NICD (Mumm and Kopan, 2000). Seguidamente, NICD se transloca al núcleo donde interacciona con el factor CBF1/RBPjk/Su(H)/Lag1 (CSL) (Kao et al., 1998). De forma basal, CSL funciona como represor en colaboración con un complejo correpresor conformado por histonas deacetilasas, que mantienen la cromatina cerrada. Tras su unión con NICD, CSL recluta coactivadores para el complejo de activación, como histonas acetiltransferasa, capaces de abrir la cromatina, sustituyendo así a los correpresores anteriores (Krejčí and Bray, 2007). Una vez constituido el complejo coactivador, se induce la transcripción de diferentes genes. Entre ellos, destacan los pertenecientes a la “vía canónica de Notch” que sirven, a su vez, como marcadores de la vía: *Hairy/enhancer of split* (Hes) y las proteínas relacionadas con Hes (Hey/HRT/HERP). Además, la mayoría de los genes que son diana de Notch codifican a reguladores de la transcripción que, al mismo tiempo, modulan a otros factores de transcripción u otras dianas moleculares, como es el caso de NF- κ B (Fischer and Gessler, 2007; Liu et al., 2003), de ahí su interés biológico.

Curiosamente, cabe señalar que cada NICD escindido genera una unidad de señal, lo que resalta la regulación tan precisa que existe entre el receptor y el ligando (Moya et al., 2012).

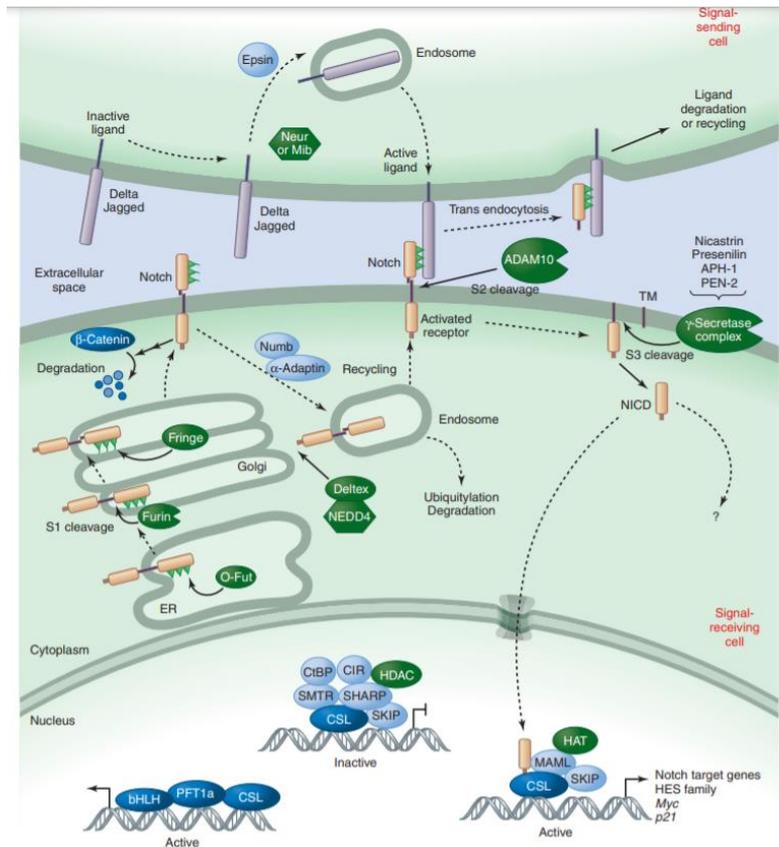


Figura 9. Vía de señalización de Notch1. La ruta comienza cuando el ligando de Notch1 Delta-like 4 (DII4) de la célula adyacente desencadena el corte por ADAM10 a nivel de S2 del receptor de Notch1. La parte extracelular del mismo, junto con su ligando se recicla por la célula vecina. A su vez, el receptor es procesado de nuevo por un complejo γ -secretasa a nivel de S3 liberando la parte intradominio de Notch1 (NICD) que va al núcleo y recluta a CSL, antiguo componente del complejo represor, y a diferentes coactivadores como a histonas acetiltransferasas (HAT), conformando el complejo de activación, responsable de la transcripción de genes diana de la vía de Notch1, por ejemplo, de la familia de *Hes*, de *p21*, y de *Myc*, entre otros. Esquema tomado de Kopan y col. (Kopan, 2012).

Se ha descrito que la vía de Notch1 tiene sinergia con otras rutas de señalización, y puede ser regulada, por ejemplo, por el factor potenciador específico de miocito 2 (MEF2). MEF2 forma parte de una familia de factores de transcripción con un creciente interés para la fisiología celular. Cuando

se describió esta familia de factores, se pensó que su función estaba restringida a las diferentes células musculares. Actualmente, se conoce que existe una estrecha relación entre MEF2 y procesos que son marcadores en el cáncer, como son la proliferación y la invasión (Chen et al., 2017). De hecho, se ha descrito que MEF2 y Notch actúan conjuntamente para desencadenar la proliferación masiva y el fenotipo metastásico en cáncer de mama (Pallavi et al., 2012). En esta misma línea, se conoce que la familia de MEF2 regula las modificaciones epigenéticas y controla la expresión génica que promueve la angiogénesis mediante *sprouting* a través de Notch1, la expresión de Dll4 y la transcripción de VEGF-A en CE (Lu et al., 2021). Generalmente, la familia de MEF2 actúa como un efector de señales intra y extracelulares, especialmente, de las provenientes de las rutas de señalización de Ca^{2+} (Chen et al., 2017).

5. SEÑALIZACIÓN DE CALCIO EN LAS CE

El ion calcio regenta numerosos procesos en los diferentes tipos celulares que conforman nuestro organismo. En el caso concreto de las CE ocurre lo mismo, ya que gran mayoría de sus funciones celulares dependen de los cambios en la concentración del ion calcio intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) (Tran et al., 2000; Yokota et al., 2015).

Hay diferentes moléculas capaces de alterar las $[Ca^{2+}]_i$ en las CE. Entre otras, encontramos péptidos (ej. bradiquinina), hormonas (ej. serotonina), neurotransmisores (ej. acetilcolina, serotonina) y factores de crecimiento (ej. VEGF, EGF). Los péptidos, las hormonas y los neurotransmisores, se unen a sus receptores acoplados a proteína G en la membrana de las CE y, consecuentemente, activan la ruta de la PLC- β 1 (Tran et al., 2000). Igualmente, la unión de los factores de crecimiento a su

receptor, como se expuso en el caso de la dimerización de VEGFR2 inducida por VEGF-A, provoca en último término la activación de la PLC- γ (Blanco and Gerhardt, 2013). Ambas, PLC- β 1 y PLC- γ , hidrolizan al fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) en diacilglicerol (DAG) y en inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) (Sekiya, 2013). Además, la PLC- γ también activa la quinasa de IP₃ que, aguas abajo, conduce a la activación de Akt (Wu et al., 2000). En esta misma línea, los estímulos mecánicos, como el *shear stress*, también estimulan la producción de IP₃ (A. Bhargyalakshmi et al., 1992). Independientemente del origen del estímulo, IP₃ se dirige hacia el retículo endoplasmático (RE) donde se une a su receptor (IP₃R), provocando simultáneamente la liberación de calcio desde el RE y el incremento de [Ca²⁺]_i del citoplasma (Tran et al., 2000). Esta liberación de Ca²⁺ activa a las proteínas de una ruta de entrada de calcio llamada entrada capacitativa de calcio (ECC), conocida también como SOCE por las siglas en inglés store-operated calcium entry, sobre la que trataremos en el siguiente apartado (Moccia et al., 2019). Aunque se ha demostrado que determinadas CE expresan canales dependientes de voltaje (CCDV) tipo N y T (Kuo et al., 2011; Nishida et al., 2013) y canales de calcio no selectivos, la entrada principal de Ca²⁺ en las CE, así como en el resto de células no excitables, es SOCE (Abdullaev et al., 2008a; Lodola et al., 2012; Trebak, 2008).

6. STORE OPERATED CA²⁺ ENTRY (SOCE)

6.1. MECANISMO DE ACTIVACIÓN Y COMPONENTES MOLECULARES DE SOCE

En 1986, Putney y *col.* definieron la ECC como el mecanismo de entrada de Ca²⁺ activado por la depleción de los depósitos del ion del RE, que, a su vez, fue definido como el “capacitor o condensador”, sugiriendo

que el Ca^{2+} entraba desde el exterior atravesando a éste (Putney, 1986). Sin embargo, ensayos posteriores demostraron que el incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se producía antes de que se vaciara el RE, hecho que hizo reformular su hipótesis inicial. No obstante, seguía sin dilucidarse por qué mecanismo se activaba la entrada del Ca^{2+} a través de la membrana tras la salida de Ca^{2+} del RE. Así, años más tarde esta ECC fue renombrada como SOCE para referirse más explícitamente en su denominación al modo de activación, para poder ser diferenciada de la entrada de Ca^{2+} activada por receptor, ligando o voltaje (Putney, 2011).

Hallazgos posteriores en el campo de la electrofisiología identificaron a los *store-operated calcium channels* (SOCCs) como los canales que mediaban la entrada SOCE (Prakriya and Lewis, 2015). Continuó la investigación en el campo y fue en 2005 cuando se identificó la *stromal interacting molecule 1* (STIM1) como la molécula sensora de Ca^{2+} situada en la membrana del RE, capaz de oligomerizarse cuando éste disminuye y traslocarse a la MP para interactuar con los SOCCs para activarlos y estimular la entrada del ion (Roos et al., 2005) (Figura 10).

Un año más tarde, se identificó a Orai1 como la subunidad formadora del poro de los canales *Ca²⁺ release activated Ca²⁺* (CRAC), los principales SOCCs en mamíferos (Feske et al., 2006; Zhou et al., 2010). Derivadas del estudio de Orai1 y STIM1, se han encontrado otras isoformas de STIM (STIM2, STIM1L) y de Orai (Orai2 y Orai3). Recientemente, se ha descrito que, a su vez, existen incluso dos isoformas de Orai1, Orai1 α y Orai1 β , generadas por traducción alternativa del mismo gen (Fukushima et al., 2012) con funciones diferentes (Sanchez-Collado et al., 2019, 2022). En la actualidad, se conoce que los canales CRAC son hexámeros de Orai que

se entrelazan en proporción 1:1 con moléculas de STIM1 para activar al canal. Generalmente, las corrientes de CRAC son provocadas por subunidades de Orai1 activadas por STIM1. No obstante, existen estudios que evidencian que Orai2 y 3 se heteromerizan con Orai1 para regular la actividad de CRAC en condiciones basales. Igualmente, investigaciones recientes sugieren que cuando la estimulación por agonista es débil, STIM2 facilita el reclutamiento de STIM1 para la activación de CRAC (Zhang et al., 2020). Curiosamente, se ha descrito que en determinados tipos celulares, como monocitos y algunas células tumorales, STIM2, Orai2 y Orai3 median parte de la entrada SOCE de forma basal, independientemente de Orai1 y STIM1 (Bird and Putney, 2018; Rosado et al., 2016).

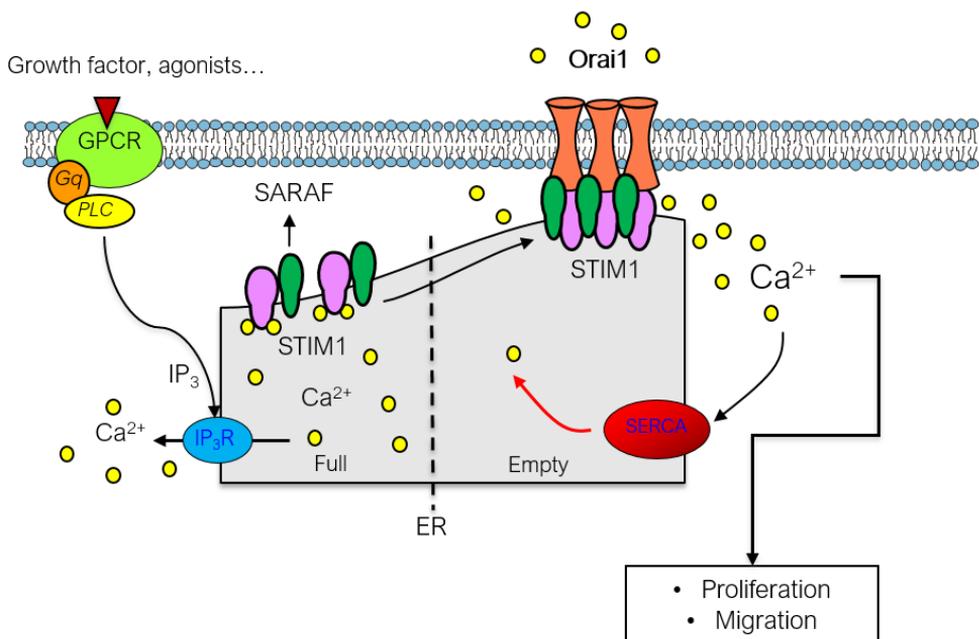


Figura 10. Parte de la ruta de entrada de Ca^{2+} store-operated calcium entry (SOCE) vía canales Ca^{2+} release activated Ca^{2+} (CRAC). Determinados agonistas y factores de crecimiento poseen receptores de tipo tirosina quinasa o acoplados a proteína G, que desencadenan la fosforilación y activación de la fosfolipasa C (PLC). La

acción catalítica de la enzima genera la liberación de diacilglicerol y de inositol trifosfato (IP_3), que encuentra su receptor (IP_3R) en el retículo endoplasmático (RE), provocando la liberación de Ca^{2+} desde el reservorio. Esta disminución en el Ca^{2+} en el RE es sensada por la molécula *stromal interacting molecule 1* (STIM1), acoplada y regulada por *SOCE-associated regulatory factor* (SARAF), que se desplaza por la membrana del RE para unirse a Orai1, que conforma el poro del canal CRAC, provocando el cambio conformacional del canal y la entrada de Ca^{2+} desde el exterior celular. Parte del Ca^{2+} que accede a la célula por el canal CRAC es recuperado por el RE gracias a la acción de la ATP-asa de Ca^{2+} SERCA, y es sensado de nuevo por STIM1 que vuelve a su estado de reposo. El resto del Ca^{2+} captado actúa como segundo mensajero o como activador en diferentes rutas de señalización, siendo esencial para la proliferación, migración y supervivencia de la célula. Modificado de Ávila-Medina y *col.* (Ávila-Medina et al., 2018).

Además de en SOCE, Orai1, Orai3 y STIM1 participan en la entrada de Ca^{2+} regulada por canales de ácido araquidónico (ARC), hecho que reafirma los mecanismos tan sensibles y coordinados que se requieren para regular los $[Ca^{2+}]_i$ en la célula (Mignen et al., 2009).

6.2. PAPEL DE SARAF EN SOCE

Desde que se tuvo constancia de que SOCE regula numerosas funciones celulares y que está implicado en una serie de patologías, ha habido un auge de estudios sobre nuevas moléculas que pudiesen modular la actividad de sus proteínas principales, Orai1 y STIM1 (Jardin et al., 2021). Entre éstas, destaca *SOCE-associated regulatory factor* (SARAF), codificada por el gen *tmem66* y expresada mayormente por la membrana del RE (Albarran et al., 2016a). En sus inicios, fue descrita por Palty y *col.* como reguladora de la actividad de STIM1 en reposo, siendo capaz de prevenir la activación simultánea de la molécula y de facilitar su deoligomerización tras la recuperación de Ca^{2+} del RE. Sin embargo, hallazgos posteriores revelaron que esta función la desempeña en células con una alta expresión de STIM1, como HEK-293, Jurkat o HeLa (Palty et al., 2012). En células con baja expresión de STIM1, como las células

derivadas de las líneas tumorales MEG01, MCF7, NG115-401L, SARAF puede interactuar directamente con Orai1 para activar CRAC y potenciar la entrada de Ca^{2+} (Albarran et al., 2016a; Dagan and Palty, 2021; Jardin et al., 2021) (Figura 11). Recientemente, el grupo del propio Dr. Palty confirmó, en los mismos tipos celulares donde fue definida, que SARAF es fundamental tanto para la activación como para la inactivación de CRAC, resaltando el papel dual de la proteína (Zomot et al., 2021).

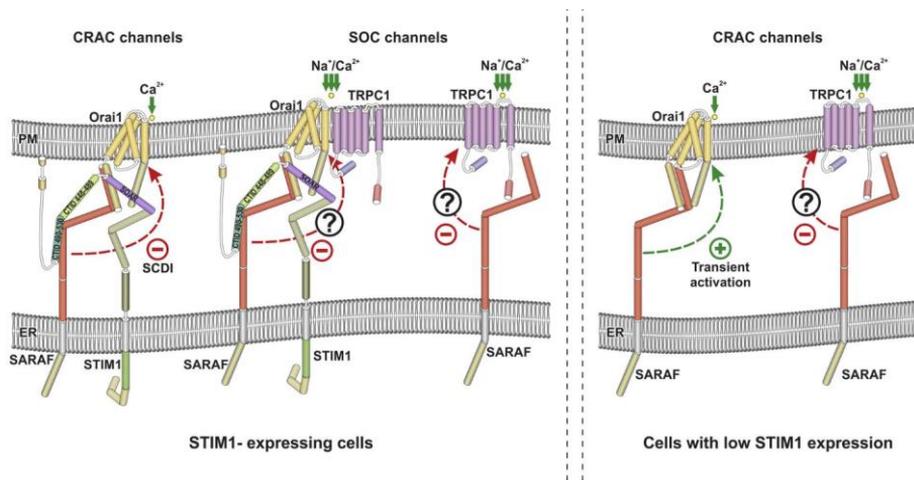


Figura 11. Papel dual de *SOCE-associated regulatory factor* (SARAF) en la vía *store-operated calcium entry* (SOCE). La molécula reguladora de SOCE, SARAF, puede actuar de dos formas completamente opuestas en las células excitables y no excitables en función del tipo celular y de la cantidad de *stromal interacting molecule 1* (STIM1) expresado por la célula. En células que poseen una elevada expresión de STIM1, SARAF tiene un papel represor de la actividad de la molécula en reposo, evitando una activación continua de los canales que componen SOCE. Sin embargo, en células que presentan una expresión de STIM1 disminuida, SARAF puede interactuar directamente con Orai1, independientemente de STIM1, para activar a SOCE. Figura tomada de Jardín y col. (Jardín et al., 2018).

Por otra parte, Albarran y col. dilucidaron que, además de controlar CRAC, SARAF modula la activación de los canales ARC, lo que apoya su

papel como regulador clave de la entrada de Ca^{2+} mediada por STIM1 y Orai1 (Albarran et al., 2016b).

A pesar de que SOCE es la principal entrada de Ca^{2+} en las CE, solo un escaso número de estudios se ha centrado en conocer la relación entre SOCE y la angiogénesis. Abdullaev y *col.*, así como otros investigadores, han demostrado que Orai1 y STIM1 son esenciales para las corrientes CRAC y la proliferación de las CE (Abdullaev et al., 2008a; Antigny et al., 2011a; Zhou et al., 2014). En esta misma línea, se ha probado que la inhibición de Orai1 y STIM1, usando siARNs en Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) y en progenitores de CE, afecta a la angiogénesis *in vitro* (Li et al., 2011a; Lodola et al., 2012). Por otra parte, hasta la fecha, no tenemos conocimiento de ningún trabajo donde se estudie el papel de SARAF en la fisiología de las CE y la angiogénesis.

6.3. PAPEL DE TRPs EN SOCE Y CE

Posteriormente, se relacionaron los canales *transient receptor potential* (TRP) con SOCE (Lopez et al., 2020). Los canales TRP representan a una superfamilia muy heterogénea de canales catiónicos, la mayoría de ellos permeables a Ca^{2+} , que poseen una estructura común. Todos contienen 6 dominios transmembrana, donde el bucle entre el dominio 5 y 6 conforma el poro donde se halla la región permeable a cationes. Se clasifican atendiendo a su función y analogía de secuencia en: TRPC (canónicos, 1-7), TRPV (vaniloideos 1-6), TRPM (melastatina 1-8), TRPA (anquirina 1), TRPML (mucopolipina 1-3) y TRPP/PKD2 (policistina 1-3). En concreto, se ha descrito que diferentes canales TRPC (TRPC1, TRPC4, TRPC5) se activan por la depleción de los reservorios de Ca^{2+} , modulando junto con Orai1 y STIM1 en la entrada de SOCE mediada por los canales no

selectivos (SOCs) (Ju and Allen, 2007; Saleh et al., 2008). Así, estudios recientes usando cardiomiocitos han demostrado además que la estimulación prolongada con angiotensina II, taspargina, fenilefrina, endotelina-1 o aldosterona genera una respuesta SOCE exacerbada que se correlaciona con un incremento en la expresión/activación de TRPC1, TRPC4 y/o TRPC5 (Camacho Londoño et al., 2015; Domínguez-Rodríguez et al., 2018; Makarewich et al., 2014; Sabourin et al., 2016). Aparte de su relación con SOCE, se ha demostrado que los canales TRP poseen un papel fundamental en numerosas funciones, como la vasodilatación y la permeabilidad vascular, de las CE (Smani et al., 2018a).



Objetivos / Objectives

El objetivo principal de esta tesis doctoral fue explorar los mecanismos moleculares implicados en la angiogénesis, centrándonos en los relacionados con el remodelado de la entrada de Ca^{2+} regulada por los reservorios. Por consiguiente, se propusieron los siguientes objetivos:

1. Estudiar la relación entre la entrada capacitativa de Ca^{2+} , en inglés *store-operated calcium entry* (SOCE), y la angiogénesis.
2. Determinar el rol de Orai1 y SARAF en la entrada de Ca^{2+} inducida por VEGF en las células endoteliales (CE).
3. Explorar el papel funcional de Orai1 y SARAF en la proliferación, migración y formación de tubos de las CE.
4. Examinar la habilidad del suero isquémico humano para inducir angiogénesis.
5. Investigar el rol de Orai1 en la señalización que se produce durante la angiogénesis post-isquémica, focalizándonos en la vía de Notch1.

The main objective of this PhD thesis was to explore the molecular mechanisms which promote new blood vessels formation related to Ca^{2+} entry remodeling. Therefore, we aimed the next specific objectives:

1. To study the relationship between the store operated calcium entry (SOCE) and angiogenesis.
2. To determine the role of Orai1 and SARAF in VEGF-induced Ca^{2+} entry in endothelial cells (EC).
3. To explore the function of Orai1 and SARAF in EC proliferation, migration and tube formation.
4. To examine the ability of human ischemic serum to induce angiogenesis.
5. To decipher the role of Orai1 in post-ischemic angiogenesis signaling, focusing on Notch signaling pathway.

Materiales y métodos



Esta tesis doctoral se rige por los principios éticos para las investigaciones biomédicas en seres humanos recogidos en la Declaración de Helsinki y en el informe de Belmont (año 1979). Este estudio se ha realizado bajo la autorización y consentimiento informado de los pacientes/controles que se prestaron a participar de forma voluntaria. Dicho documento dispone del visto bueno del Comité de Ética del Hospital Universitario “Virgen del Rocío” de Sevilla (código de CEI: 2013PI/096) y enumera la hipótesis, los objetivos propuestos y las tareas a realizar en el proyecto. Los datos de los participantes del estudio se trataron con confidencialidad de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999 de propiedad de los datos del paciente.

En referencia al modelo animal, siempre se siguieron las directrices del uso de animales para la investigación biosanitaria, garantizándose el uso del menor número de animales necesarios y evitando al mismo tiempo el dolor, sufrimiento y estrés. Además, se tuvieron en consideración las recomendaciones del Real Decreto 53/2013 de acuerdo con la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y se contó con el visto bueno del Comité de Investigación Animal de la Universidad de Sevilla.

1. ESTUDIO EN PACIENTES

1.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Los pacientes incluidos en el estudio (<75 años) fueron ingresados en el Hospital Universitario Virgen del Rocío con un infarto agudo de miocardio (IAM) con elevación del segmento ST (STEMI) y tras 2-6 h del inicio de los síntomas, fueron tratados con angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) a fin de restablecer el flujo. La oclusión

coronaria estaba localizada a la altura de la arteria descendente anterior (ADA) con una puntuación de riesgo coronario (TIMI *Risk Score*) de 0-1. Se excluyeron del estudio aquellos pacientes que poseían una historia previa de cardiopatía isquémica, una insuficiencia renal con filtrado glomerular menor de 30 ml/min o que se negaron a participar en el ensayo.

Con esta base, se reclutaron un total de 28 controles y 44 pacientes que habían padecido un STEMI y habían sido tratados con ACTP. Los controles (46 ± 11 años; 57.14% hombres) fueron individuos sanos que no sufrían ni hipertensión arterial, ni dislipidemia, ni diabetes mellitus tipo II. Además, ninguno de ellos declaró ser fumador, por lo que no tenían riesgos aparentes de debutar con una enfermedad cardiovascular. En el caso de los pacientes STEMI (58 ± 10 años; 92.10% hombres), el 36.84% fueron hipertensos, el 47.37% padecían dislipidemia, el 18.42% sufrían diabetes mellitus tipo II y el 47.37 % afirmaron ser fumadores, lo que coincide con los principales factores de riesgo de adolecer un IM.

Toda la información relativa a la clínica, a los datos demográficos, hemodinámicos, angiográficos y electrocardiográficos se registraron en el momento de la admisión al hospital en todos los casos. Posterior a la ACTP, estos pacientes recibieron terapia farmacológica recomendadas por las guías clínicas actuales.

1.2. EXTRACCIÓN SANGUÍNEA

Tras 6-12 horas de la ACTP, se tomó una muestra sanguínea a partir de una de las venas situadas en la fosa cubital del brazo (cefálica, media, basilíca). Igualmente, se tomaron muestras de individuos sanos sin enfermedad conocida que se usaron como controles del estudio a fin de

poder comparar los resultados obtenidos. Todas las recolecciones se realizaron por los enfermeros responsables del área de Hemodinámica del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla. Estas muestras se almacenaron en dos tubos sin EDTA (anticoagulante) BD Vacutainer® SST™ II Advance (BD, EEUU) para, por una parte, estudiar la bioquímica y la hematología rutinaria del paciente; y por otra, recoger el suero. Para conseguir este último, se centrifugaron los tubos a 3000 rpm durante 15 min. A partir de la fase acuosa situada en la zona superior del tubo, se tomaron 3 ml de suero y se almacenaron en diferentes *ependorf*® de 1.5 ml que se mantuvieron a -80°C hasta su posterior uso.

1.3. INMUNOABSORCIÓN LIGADA A ENZIMAS (ELISA)

Se evaluaron los niveles de 27 citoquinas : factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF basic), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interferón γ (IFN- γ), interleuquina 17 (IL-17), interleuquina 1 β (IL-1 β), antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1Ra), interleuquina 4 (IL-4), interleuquina 8 (IL-8), interleuquina 9 (IL-9), proteína 10 inducida por interferón gamma (IP-10), proteína inflamatoria de macrófagos 1 α (MIP-1 α), proteína inflamatoria de macrófagos 1 β (MIP-1 β), factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), usando el kit Bio-Plex Pro™ Human Cytokine 27-plex Assay (Bio-Rad, EEUU) en el suero de un subgrupo de 13 pacientes con STEMI antes y después del tratamiento con ACTP. Se ejecutó el protocolo siguiendo las recomendaciones del kit.

Posteriormente, se examinaron los niveles de VEGF, IL-17A y TNF- α en el suero de todos los pacientes usando kits ELISA (VEGF: BMS277-2, IL-17A: BMS2017; TNF- α : KHC3011 Thermo Fisher Scientific, EEUU) para placas de 96 pocillos siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Brevemente, se lavaron los pocillos dos veces con *Wash Buffer* y se preparó la curva estándar en duplicado para cada una de las citoquinas usando *Sample Diluent* (SD) como diluyente para las muestras. Se añadió entonces 100 μ l de SD a cada pocillo usado como “blanco”. A continuación, se incluyeron 50 μ l de SD junto con 50 μ l de muestra (factor de dilución 1:2) a cada pocillo problema por duplicado y se incubó la placa durante 2 h a T^a ambiente en agitación. Tras éstas, se lavaron los pocillos 6 veces con *Wash Buffer*, se añadieron 100 μ l de *Biotin-Conjugate* a todos los pocillos y se incubó la placa durante 1 h a T^a ambiente en agitación. De nuevo, se lavaron los pocillos 6 veces con *Wash Buffer*, se añadieron 100 μ l de *Streptavidin-HRP* a todos los pocillos y se incubó la placa durante 1 h a T^a ambiente en agitación. Finalmente, se volvieron a lavar 6 veces los pocillos con *Wash Buffer*, se añadieron 100 μ l de solución de sustrato TMB a todos los pocillos, se incubó 30 min a T^a ambiente, se añadieron 100 μ l de *Stop Solution* y se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 450 nm. El rango de detección del kit de VEGF-A fue de 15.6-1000 pg/mL siendo 7.9 pg/ml la mínima concentración detectable con un coeficiente de variación inter/intraensayo de 6.2/4.3%. En el caso del IL-17A, el rango de detección del kit fue de 1.6-100 pg/mL siendo 0.5 pg/mL la mínima concentración detectable, con un coeficiente de variación inter/intraensayo de 7.1/9.1%. Finalmente, para el TNF- α , el rango de detección del kit fue de 15.6-1000 pg/mL siendo 1.7 pg/mL la mínima concentración detectable, con un coeficiente de variación inter/intraensayo de 7.5/4.4%.

2. ESTUDIOS CON MODELO ANIMAL

2.1. MODELO ANIMAL DE ISQUEMIA/REPERFUSIÓN (I/R)

Para reproducir el IAM y posterior ACTP de pacientes en un modelo animal, se realizaron intervenciones quirúrgicas en ratas *Wistar* macho de 250-300 g con el fin de ocluir la ADA. Esta oclusión se realizaba de forma reversible, ya que se colocaba un tubo de \emptyset reducido entre el hilo de sutura y el corazón, permitiendo la posterior reperfusión de la arteria. Las operaciones fueron realizadas por la Dra. Isabel Mayoral y la Dra. Eva Calderón siguiendo las directrices recogidas en el artículo de Domínguez-Rodríguez *et al.* (Domínguez-Rodríguez *et al.*, 2018). Brevemente, las ratas se anestesiaron con una mezcla de ketamina (50 mg/kg)-xilacina (8 mg/kg) y se mantuvieron intubadas con O₂/sevoflurano durante toda la operación. Igualmente, a través de esta intubación, se conectaban a un aparato de ventilación mecánica (vol. Tidal 1.5-2.0 ml, 75-80 ventilaciones/min; Harvard Apparatus, EEUU). Se controló la temperatura (37°C) gracias a una manta eléctrica, así como las pulsaciones, fuerza y ritmo del corazón mediante electrocardiograma (ECG). Para conseguir visualizar el corazón, se realizó una toracotomía izquierda. La ligadura se efectuó entonces usando un hilo de sutura de seda de 6-0 Prolene™ (Ethicon, EEUU), que atravesó el corazón mediante un punto a la altura de la ADA que fue cerrado sobre el tubo auxiliar. Después de 45 min de isquemia, se cortó el punto de sutura, se eliminó el tubo y se cerró el tórax del animal. Para comprobar que se había producido el IAM y la reperfusión, se vigiló la elevación y la normalización del segmento ST en el ECG, respectivamente. Se mantuvo la anestesia gaseosa hasta que el animal presentó signos de haber recuperado los reflejos. Finalmente, se administró meloxicam (1 mg/kg) vía subcutánea

a modo de analgésico post-operatorio. En el caso de las ratas *sham*, se efectuó la misma intervención quirúrgica a excepción de la ligación de la ADA. Estas ratas se utilizaron como control para el estudio.

Tras 24 h de la operación, las ratas fueron sacrificadas, obteniéndose el corazón y sangre del animal. La sangre se recolectó en tubos sin EDTA BD Vacutainer® SST™ II que se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min con el fin de obtener el suero del animal. Este suero se almacenó a -80°C hasta su posterior uso. A partir del corazón del animal, se obtuvo las proteínas usando bolas metálicas, el triturador TissueLyser (Qiagen, Alemania) y 300 µl de buffer de lisis compuesto por 224.14 µl NP40, 42.86 µl inhibidor de proteasa (Roche, Suiza), 3 µl PMSF (Sigma-Aldrich, EEUU) y 30 µl Phosphostop (Thermo Fisher Scientific, EEUU).

2.2. ANÁLISIS DE ANGIOGÉNESIS EN RETINA DE RATÓN NEONATO

Los ratones se sacrificaron en el día P6 y se obtuvieron las retinas siguiendo el protocolo propuesto por la Dra. del Toro y *col.* (Del Toro et al., 2010), con algunas modificaciones. Brevemente, los ojos se extrajeron de las órbitas con ayuda de pinzas y una cuchara pequeña, y se fijaron en 4% paraformaldehído (PFA) a T^a ambiente durante 30 min. Seguidamente, la retina se aisló debajo de la lupa (Olympus SZ61) en tampón fosfato salino (PBS 1X) usando microtijeras y dos pinzas. A continuación, se incubó con solución de permeabilización y bloqueo (TNB Blocking Buffer: 0.1 M Tris-HCl, pH 7.5; 0.15 M NaCl; 0.5% (p/v) *blocking reagent* (PerkinElmer) con 0.3 % Triton X-100 (Sigma-Aldrich, EEUU)) durante 2 h a 4°C. Transcurridas éstas, las retinas se incubaron a 4°C durante toda la noche con 1:50 isolectina B4 biotinilada (IB4; Sigma, EEUU) en solución de bloqueo. Al día siguiente, las retinas se volvieron a incubar durante 2 h a T^a ambiente, esta

vez con 1:200 Streptavidina Cy3 (Jackson Immuno Research, EEUU) en solución de bloqueo. Finalmente, antes del montaje con *Dako Fluorescence Mounting medium* (Dako; Agilent Technologies, EEUU), la retina se fijó nuevamente con PFA durante 20 min. Las imágenes de fluorescencia se captaron por el microscopio de fluorescencia Olympus BX-61 (objetivo 4X).

Para el estudio de la neovascularización de la retina (Figura 12), se inyectaron de forma intraperitoneal (i.p.) ratones neonatos (SV129) durante los días P3, P4 y P5 con concentraciones crecientes de GSK-7975A (2.6, 4.0, 7.9, 15.9 y 31.8 mg/kg; GSK; Aobious, EEUU) o con la cantidad equivalente en μl del vehículo de la droga (DMSO, grupo control; Sigma-Aldrich, EEUU).

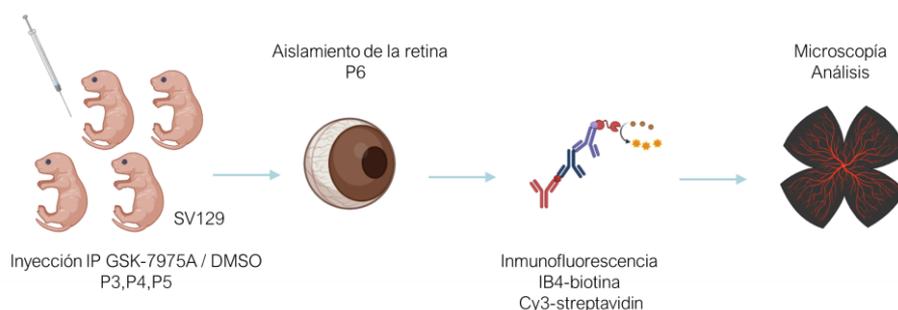


Figura 12. Esquema de trabajo realizado para el estudio de los vasos de la retina de ratones neonatos. Los ratones se inyectaron con concentraciones crecientes del inhibidor de la entrada de Ca^{2+} store-operated calcium entry (SOCE), GSK-7975A, o con el volumen de DMSO (vehículo) correspondiente a la concentración máxima de GSK añadido, los días 3, 4 y 5 tras el nacimiento. Los neonatos se sacrificaron entonces en el día 6 desde el nacimiento, y se aisló la retina para poder realizar el protocolo de inmunofluorescencia con isolectina B4 (IB4), a fin de poder visualizar los vasos y analizar mediante microscopía y el *software* de imagen (AngioTool), el estado de los mismos. Figura creada con BioRender.com y Adobe Illustrator 2020.

Se usó la herramienta AngioTool (Zudaire et al., 2011) a fin de evaluar los diferentes parámetros que sirven como marcadores de

angiogénesis, como el número total de vasos, la longitud de los mismos, el número de puntos de unión y la lacunaridad. La lacunaridad se define como el índice que mide y describe la distribución del tamaño de los vacíos o lagunas dentro del vaso de la retina (GOULD et al., 2011).

2.3. ENSAYO DE *SPROUTING* EN ANILLO AÓRTICO DE RATA

Con objeto de evaluar la formación de ramificaciones *ex vivo*, se realizó el ensayo de *sprouting* a partir de anillos aórticos (Baker et al., 2012), con algunas modificaciones (Figura 13).

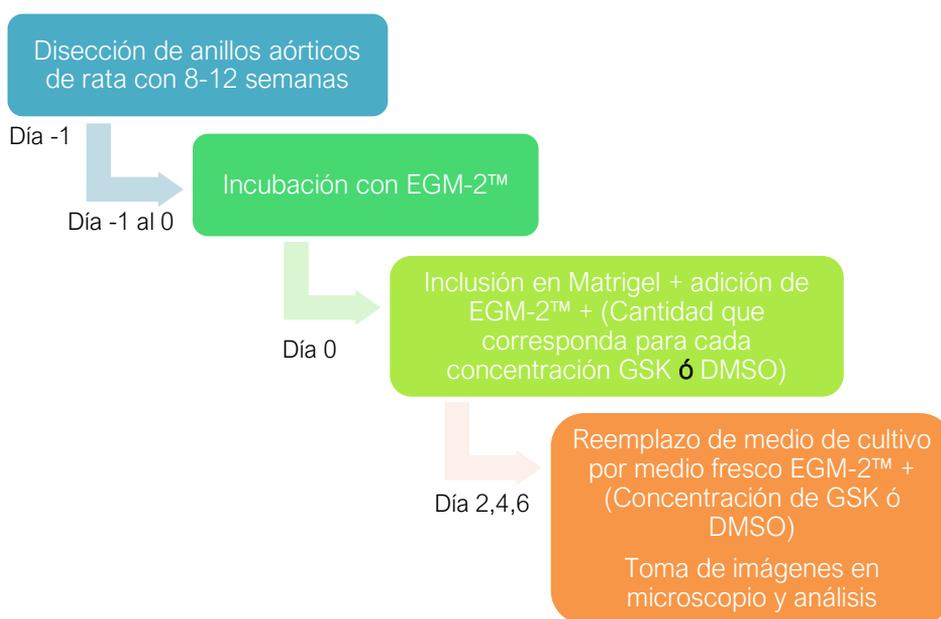


Figura 13. Esquema de trabajo para el ensayo de *sprouting* en anillos aórticos de rata. En el día anterior al comienzo del ensayo, la aorta se diseccionó del roedor con 8-12 semanas y se cortó en pequeños anillos de tamaño 0.5-1 mm, que se incubaron durante una noche con medio Endothelial Growth Medium BulletKit-2 (EGM-2™). En el día 0 del estudio, los anillos se incluyeron en Matrigel™, que estaba embebido a su vez en medio EGM-2™ con concentraciones crecientes del inhibidor de la entrada de Ca²⁺ store-operated calcium entry (SOCE), GSK-7975A, o bien, con el volumen de DMSO (vehículo) correspondiente a la concentración máxima de

GSK añadido. Se renovó el medio junto con GSK-7975A o con DMSO y se tomaron fotografías en un microscopio de contraste de fase en los días 2,4 y 6 desde el inicio del ensayo, para el posterior análisis de los vasos en el *software* ImageJ. Esquema realizado con Microsoft® PowerPoint 2016.

Las aortas se obtuvieron de ratas *Wistar* macho con 8-12 semanas 250-300 g de peso. En primer lugar, se sacrificó la rata con una sobredosis de anestésico, tiopental sódico (1 ml). Inmediatamente, se abrió la cavidad torácica mediante la incisión con unas tijeras en la región de la pared abdominal que colinda con el final del esternón, ayudándonos con pinzas para levantar esta pared a fin de que no se dañaran las vísceras. Opcionalmente, se podía extraer el corazón, los pulmones y el esófago para facilitar la visión de la arteria aorta. Ésta se encontraba localizada sobre la columna vertebral, comenzando en el callado aórtico, punto de conexión con el corazón, descendiendo por el tórax y terminando a la altura del abdomen. Una vez divisada, se clampó por un extremo y se escindió del cuerpo cortando muy cerca de la columna vertebral, usando unas tijeras de un tamaño menor al usado para la incisión torácica. Se conservó entonces la aorta en PBS 1X a 4°C hasta su limpieza.

En la lupa (Olympus SZ61), con ayuda de unas pinzas pequeñas y unas tijeras, se limpió la aorta hasta eliminar todos los restos de grasa adheridos a la misma. Usando un patrón con cuadrados de 1 x 1 mm, se cortó la aorta con un bisturí estéril en anillos de 0.5 a 1 mm de ancho. Los anillos aórticos obtenidos se guardaron en un *eppendorf*® con PBS 1X a 4°C. Seguidamente, en esterilidad, se trasladaron a un nuevo *eppendorf*® con Endothelial Growth Medium BulletKit-2 (EGM-2™ BulletKit; Lonza, Suiza) (*Ver 3. Cultivo celular*) y se colocaron en un incubador a 5% CO₂ 37°C durante toda la noche.

Al día siguiente, los anillos aórticos se incluyeron en el Corning™ Matrigel™ Matrix (Corning, EEUU). De este modo, el día anterior se cambió una alícuota de la misma del congelador de -20°C a 4°C para una correcta y progresiva descongelación de la matriz gelatinosa. Asimismo, para evitar que la matriz solidificara, se trabajó siempre con alícuotas del gel y el material en frío. De este modo, en esterilidad, se añadieron 50 µl de Matrigel™ a cada pocillo de ensayo de una placa de 24 pocillos (Thermo Fisher Scientific, EEUU) y se incubó durante 15 min a 37°C. Transcurridos éstos, se embebieron los anillos en la matriz solidificada y se sellaron con 50 µl de Matrigel. La placa se volvió a incubar durante otros 15 min y, tras éstos, se añadieron 1 ml de EGM-2™ a cada pocillo de ensayo.

Para evaluar el papel de SOCE en el *sprouting*, se añadieron concentraciones crecientes (10, 30, 50, 70, 100 µM) de GSK-7975A diluido en DMSO, o bien, el volumen de DMSO (vehículo) correspondiente a la concentración máxima de GSK añadido. El medio se reemplazó por medio fresco cada 48 h y fue en este momento donde se añadieron las drogas mencionadas. Se tomaron imágenes inmediatamente y cada 48 h hasta el día 6 en un microscopio de contraste de fase Olympus IX-71 (objetivo 10X). El *sprouting* fue evaluado usando la siguiente serie de comandos en Fiji ImageJ:

```
Image> Type> 8-bit
```

```
Image> Adjust> Brightness/Contrast...
```

```
Image> Adjust> Threshold...
```

```
Process> Binary> Make binary
```

```
Process> Binary> Fill holes
```

Process> Binary> Skeletonize

Analyze> Skeleton> Analyze Skeleton (2D/3D)

3. ESTUDIOS EXPERIMENTALES DE ANGIOGÉNESIS *IN VITRO*

3.1. CULTIVO CELULAR

Se eligieron las Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC, Lonza, Suiza) como modelo de CE. Estas células se cultivaron en *flasks* de 25-cm² (Sarstedt, EEUU) con 5 ml de medio EGM-2™ enriquecido con EGM™-2 SingleQuots™ (2% FBS, hidrocortisona, hFGF-B, VEGF, R3-IGF-1, hEGF, ácido ascórbico, gentamicina/ampicilina y heparina; Lonza, Suiza) en un incubador a 37°C y 5% CO₂. Los viales “madre” de cultivo primario se descongelaron siguiendo las recomendaciones sobre la densidad de siembra desde la criopreservación, incluidas en el manual de *Lonza: Clonetics™ Endothelial Cell System. Technical Information Instructions* disponible en su página web. Tras 24 h, se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco. Después de este primer cambio de medio, la renovación del mismo se realizó cada 48 h. Una vez alcanzada una confluencia comprendida entre el 90-100 %, se realizaron pases con objeto de mantener la línea de cultivo. De este modo, a las células se les retiraba el medio, se lavaban con 3 ml de PBS 1X, se añadían 2 ml de 0.025% 1X Trypsin-EDTA (Gibco, EEUU) la cual se dejaba actuar a 37°C. Dado que una prolongada acción de la tripsina compromete a la viabilidad celular, transcurridos 3 min, se daban unos pequeños golpes sobre el *flask* para asistir a aquellas células que aún estaban adheridas a la placa. Inmediatamente, se paralizaba la reacción enzimática añadiendo 4 ml de EGM-2™ (medio completo con suero) al *flask*, y todo el contenido de éste se trasladaba a un tubo *falcon* de

15 ml para ser centrifugado durante 5 min a 300 G. Finalmente, se retiraba el sobrenadante y el pellet se resuspendía de nuevo en EGM-2™ para ser sembrado en placas de 3-cm ó 6-cm Ø en el caso de que se fuesen a realizar ensayos, *flask* de 25 cm² con objeto de mantener la línea, o bien, viales de congelación para criopreservarla. Así, los experimentos se realizaron usando células en los pases 3-10.

3.2. ENSAYOS DE TRANSFECCIÓN CON SIARNs

A fin de conocer el efecto de la ausencia o disminución de la expresión de ciertas proteínas clave, las HUVEC se transfectaron usando Lipofectamine® RNAiMAX Transfection Reagent (Thermo Fisher Scientific, EEUU) y los siARNs *scramble*, *Orai1*, *SARAF* y *Notch1* (Ambion, EEUU; Tabla 2) siguiendo las instrucciones del protocolo aportado en el kit del agente de transfección. Brevemente, una vez que las células sembradas en las placas de 3-cm Ø alcanzaban el 70% de la confluencia, se preparaban dos *mix* diferentes: A, que incluía 5 µl de lipofectamina con 150 µl de medio bajo en suero Optimem® (Gibco, EEUU), y B, que incluía 3 µl a 10 µM del siARN y otros 150 µl de medio bajo en suero Optimem® (Gibco, EEUU). Seguidamente, ambas preparaciones (A+B), se combinaban en otro *eppendorf*® en proporción 1:1 y se incubaba la mezcla durante 5 min a T^a ambiente. Transcurridos éstos, se les retiraba el medio a las placas de 3-cm Ø, se añadían 300 µl del *mix* y se incubaban durante 2 h a 37°C y 5 % CO₂. Finalmente, exceptuando los ensayos con suero, se añadían 1.5 ml de EGM-2™ y en función del siguiente experimento, las placas permanecían en el incubador durante las siguientes 24-48 h. En el caso concreto de los ensayos de silenciamiento de *Orai1* y *Notch1* usando suero del animal o humano como estímulo, se añadió 1.5 ml de EBM-2 tras las 2 h de

transfección que fue sustituido al día siguiente por medio EBM-2 fresco con un 5% o un 2.5% de suero de rata o humano, respectivamente.

siARN	Sentido	Antisentido	Casa comercial
siOrai1	5'-CCUGUUUGCGCUC AUGAUC-3'	5'-GAUCAUGAGCGCAAACAGG-3'	Ambion, Thermo (EEUU)
siSARAF	5'-GGUAAAGGUC AAAUUUUUC-3'	5'-GAAAAUUUGACCUUUACC-3'	Ambion, Thermo (EEUU)
siNotch1	5'-GGGAGCAUGUGUAACAUCA-3'	5'-UGAUGUUACACAUGCUC-3'	Ambion, Thermo (EEUU)
siControl (scramble)	5'-CAUAGCAAUCAUUACCAU-3'	5'-AUGGUA AUGAUUGCUAUUG-3'	Ambion, Thermo Fisher (EEUU)

Tabla 2. Secuencia de siARNs utilizados durante el desarrollo de la tesis.

3.3. CULTIVO 3D: MIMETAS ASSAY

Con objeto de acercarnos a la formación de nuevos vasos sanguíneos a nivel fisiológico, hicimos uso de un modelo de angiogénesis en 3D con las placas OrganoPlate® y el sistema OrganoFlow® de la compañía Mimetas (Mimetas, Países Bajos). De forma simplificada, estas placas permiten la formación de una estructura cilíndrica que simula un “vaso sanguíneo” en el pocillo superior del *chip*, que se soporta gracias a una matriz gelatinosa que se sitúa en el pocillo central, adyacente al canal inferior donde se añaden estímulos proangiogénicos para motivar la migración de las células *tip* a través del gel (Figura 14A).

Para la siembra y la adición de estímulos, se siguió el protocolo del fabricante. Brevemente, antes de comenzar se añadió PBS 1X en los pocillos de los *chips* denominados como “ventana de observación” (Filas 2,5,8...23) de la placa. A continuación, se añadió al pocillo *gel inlet* 2 μ l (Figura 14B) de “la matriz extracelular” (ECM) gelatinosa conformada por 1:1:8 de 1M HEPES, 37 g/L de NaHCO_3 y colágeno 5 mg/ml, respectivamente, atendiendo a las precauciones advertidas por el protocolo. Se comprobó gracias a la ventana de observación la correcta disposición del gel por el pocillo y se dejó polimerizar a la matriz durante 15 min en el incubador (37°C 5% CO_2). Una vez solidificada, se añadió PBS1X en el pocillo para evitar que se seque (Panel 2, Figura 14C).

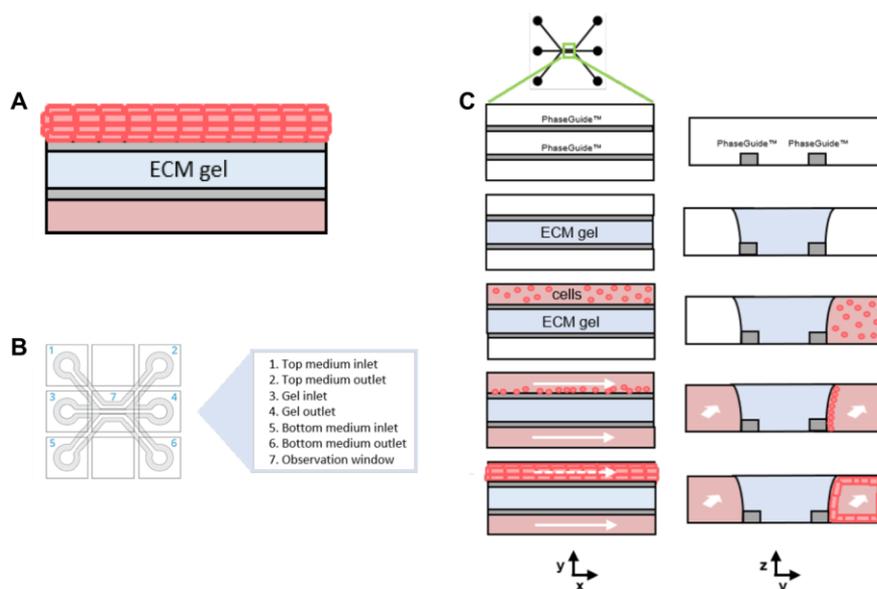


Figura 14. Cultivo en 3D de HUVEC en placas OrganoPlate® (Mimetas). **A.** Ilustración de células formando un vaso (canal superior) y creciendo sobre una matriz extracelular (ECM) de gel (canal intermedio) adyacente a un pocillo con estímulos angiogénicos (canal inferior). **B,C.** Representación esquemática de un *chip* (**B**) y del cultivo tubular contra el gel de ECM en el OrganoPlate® (**C**). Montaje

de imágenes tomadas del protocolo OrganoPlate® 3-lane *tubule seeding* (Mimetas, Países Bajos).

A continuación, las HUVEC se tripsinizaron y se sembraron (2 μ l) en los pocillos *top medium inlet* (Figura 14B) a una concentración de 10.000 células/ μ l. Seguidamente, se añadieron 50 μ l de medio sin suero EBM-2 al pocillo *top medium inlet* y se colocó el OrganoPlate® en una plataforma con 75° de inclinación durante 6 h para permitir que las células se adhirieran al gel (Figura 14C). Tras éstas, se añadieron 50 μ l al pocillo *top medium inlet* y *outlet* (Figura 14B) y se desplazó la placa al OrganoFlow® con 7° de inclinación a cada lado en intervalos de 8 minutos colocado en un incubador con 5% CO₂ 37°C para promover la formación del tubo (Figura 14C). Se cambió el medio cada 48 h y se refrescó con medio con factores de crecimiento (EGM-2). Para el estudio del papel de Orai1 en el proceso de migración de las células *tip*, las HUVEC se transfectaron con *scramble* y siOrai1 antes de ser tripsinizadas y sembradas en la placa.

Una vez conformado el vaso, alrededor del día 4 desde la siembra, se reemplazó el medio EGM-2 de los pocillos *top medium inlet* y *outlet* por medio EBM-2 sin factores. Entonces, se añadió 50 μ l de EBM-2 con 2.5% de suero de pacientes controles e isquémicos a los pocillos *bottom medium inlet* y *outlet* (Figura 14B). Cada 48 h se le cambió el medio siguiendo el siguiente patrón: 2.5% de suero en los días 0-5, 5% de suero en los días 5-7 y 10% de suero en los días 7-10. Se tomaron imágenes usando el microscopio Olympus IX-71 (objetivo 10X) en los días 0, 1, 3, 5 y 10 desde la adición del estímulo.

Finalizado el estudio de migración, el día 10 del ensayo se fijaron las células con 4% de PFA durante 15 min a T^a ambiente para realizar el

protocolo de inmunofluorescencia. De forma resumida, tras lavados con PBS1X, las células se permeabilizaron 10 min con 0.3% Triton X-100 en PBS1X, se bloquearon 45 min usando 2% FBS 2% BSA 0.1% Tween20 PBS1X y se incubaron con 1:200 de anticuerpo primario *rabbit* anti-Orai1 (Sigma, EEUU) durante 3 días para que llegase a todas las partes del gel. A continuación, se incubó durante 2 días con el anticuerpo secundario Goat anti-*Rabbit* Alexa Fluor® 488 (1:400). Finalmente, se incubó durante un día con 1:1000 de DAPI (4', 6- 218 diamidino -2-phenylindole, DAPI; Sigma-Aldrich, EEUU) y se visualizó en el microscopio Olympus BX-61 (objetivo 10X). En todas las incubaciones la placa OrganoPlate® estuvo sobre el OrganoFlow® con 5° de inclinación a cada lado en intervalos de 3 min a Tª ambiente.

3.4. FORMACIÓN DE TUBO DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES

La formación de tubos de las células endoteliales se utiliza como modelo de angiogénesis *in vitro*. En este caso, se estudió la capacidad de las HUVEC para disponerse en mallas sobre la matriz Corning™ Matrigel™ Matrix. Como en el ensayo de anillos aórticos, y para una correcta y progresiva descongelación de la matriz gelatinosa, el día anterior al ensayo se pasó una alícuota de Matrigel del congelador de -20°C a 4°C. Asimismo, para evitar que la matriz solidificase, se trabajó con una alícuota y el material en frío. En este caso, se utilizaron las placas μ -Slide Angiogenesis ibi Treat 15 wells de ibidi® (Ibidi, Alemania) y se realizó el protocolo incluido con el kit, con pequeñas modificaciones. Primero se añadieron 10 μ l de Matrigel a cada pocillo de la placa. Inmediatamente, la placa se incubó durante 30 min a 37°C para permitir la polimerización del gel. Transcurridos éstos, se añadieron $1 \cdot 10^4$ de HUVEC resuspendidas en 50 μ l de EGM-2™ a cada

pocillo, y se dejó la placa en el incubador a 37°C y 5% CO₂ durante 18-24 h. En el caso especial de los experimentos con estímulo de suero, las células se resuspendieron en un volumen total de 50 µl de EBM-2 con 2.5% y 5 % de suero de pacientes/controles y de rata, respectivamente. Se capturaron entonces imágenes en el microscopio invertido de contraste de fase Olympus IX-71 (objetivo 4X). Tras obtener estas fotografías, con objeto de mejorar la visualización de las mallas, se descartó el sobrenadante, se añadieron 6.25 µg/ml de Calcein-AM (Sigma-Aldrich, EEUU) en 50 µl de medio libre de suero EBM-2 y se incubó la placa durante 30 min a T^a ambiente en oscuridad. Entonces, se volvió a eliminar el sobrenadante, se realizaron 2 lavados con PBS 1X, se añadían 50 µl de PBS 1X y se volvió a tomar fotografías en el mismo microscopio, esta vez con el canal de fluorescencia del 488 (FITC). Para analizar el efecto de la inhibición mediada por siARNs, las células se transfectaron 24 h antes del experimento. Si por el contrario se quería analizar el efecto de la inhibición de SOCE mediante la adición de GSK-7975A, la droga o el vehículo (DMSO) se incluían después de la siembra de las células en las placas µ-Slide. La formación de mallas se analizó usando el macro Angiogenesis Analyzer del ImageJ (Gilles, 2020).

3.5. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CELULAR

Con el fin de estudiar la proliferación celular, se analizó la presencia del marcador Ki67 por inmunofluorescencia (Sun and Kaufman, 2018). Para ello, las HUVEC se sembraron sobre cubres en placas de 3-cm Ø. Si el fin era estudiar cómo afectaba la ausencia de las proteínas bajo estudio (Orai1 y SARAF), las HUVEC se transfectaban 48 h antes de realizar el ensayo (~70% de confluencia). Si el objetivo era evaluar la proliferación estimulada

tras la adición de suero humano, 48 h antes de fijar las células, se añadía medio libre de suero (EBM-2) y 24 h antes, el suero de los controles/pacientes (2.5 %). En ambos casos, las células se fijaron con formalina (20 min), se permeabilizaron con PBS 1X 0.5% Triton X-100 (20 min) (Sigma-Aldrich, EEUU) y se bloquearon con PBS 1X + 1% Bovine Serum Albumin (BSA; Sigma-Aldrich, EEUU) y 0.5% TWEEN® 20 (Sigma-Aldrich, EEUU) (30 min). A continuación, las HUVEC se incubaron con el anticuerpo *mouse* anti-Ki67 (1:50; Cat. No. PA5-24237; ThermoFisher Scientific (EEUU)) en solución de bloqueo durante 2 h a T^a ambiente. A partir de este punto, todos los pasos se realizaron en oscuridad. Tras esto, se incubaron con el anticuerpo secundario 1:400 Goat anti-Mouse Alexa Fluor® 594 (H+L) a T^a ambiente durante 45 min. Seguidamente, las células se incubaron con DAPI (Sigma-Aldrich, EEUU) diluido en PBS 1X durante 5 min, con objeto de poder visualizar los núcleos. Finalmente, los cubres se montaron sobre portas (Thermo Fisher Scientific, EEUU) usando el medio de montaje Dako. Las células se fotografiaron usando el microscopio de fluorescencia Olympus BX-61 (objetivo 10X). Para el análisis de la proliferación, se consideraron las células Ki67⁺, o “en proliferación”, aquellas cuyos *merge* (solapamiento de imágenes) entre ambos canales (canal rojo: Ki67, canal azul: DAPI) coincidían dando lugar a un color rosa fucsia. Estas células Ki67⁺ se contaron gracias a la herramienta CellCounter incluida en Fiji ImageJ. De este modo, se determinaba para un mismo campo el número de células Ki67⁺ (A) y el número de células total (T), siendo el porcentaje de proliferación de la imagen la división entre A y T multiplicada por 100 ($A/T \times 100$).

3.6. ENSAYO DE MIGRACIÓN EN CÉLULAS ENDOTELIALES

La capacidad de migración de las HUVEC se evaluó mediante el ensayo de cicatrización *wound healing* (Rodríguez et al., 2005). En este caso, tras tripsinizar las células durante un pase, las HUVEC se sembraron en placas de 6 pocillos (Thermo Fisher Scientific, EEUU) y se cultivaron hasta alcanzar el 95-99% de confluencia. Fue entonces cuando se realizó una herida en línea recta en el centro de la placa usando una punta de pipeta de 2-200 μ l. Seguidamente, se lavó con PBS 1X para eliminar cualquier resto celular que se pudiese haber generado tras la acción mecánica de la punta, y se añadió 2 ml de EGM-2™. En los experimentos donde se evaluó el silenciamiento de proteínas, las HUVEC se transfectaron 48 h antes de realizar la herida, cuando se tenía en torno a un 70% de confluencia. En el caso de los ensayos donde se estudió el efecto de la adición de GSK-7975A o el vehículo (DMSO), ambos se añadían después de realizar la herida. Por otra parte, para evaluar el efecto del suero de ratas y pacientes sobre la migración, las HUVEC se privaron de suero 24 h antes del ensayo usando medio EBM-2. Así, tras la generación del daño se añadía medio EBM-2 con 5 % del suero del animal o bien 2.5% de suero humano. Las imágenes se tomaron con un microscopio invertido de contraste de fase Olympus IX-71 (objetivo 10X) tanto en el momento de realizar la herida, como 12 h y 24 h después, en el caso de los ensayos de transfección; o bien 8, 24 y 32 h después, en los estudios cuyo objetivo era evaluar el efecto del suero isquémico. El área libre de células se midió usando Fiji ImageJ siguiendo la siguiente serie de comandos:

```
Image> Type> 8-bit
```

```
Process> FFT> Bandpass Filter...
```

Image> Adjust> Threshold...

Process> Filters> Minimum...(*)



(**)> Analyze> Measure

(*) 0h Radius 20.0 pixels; 12 h Radius 15.0 pixels; 24 h Radius 10.0 pixels

(**) Selecciona el área libre de células

4. ENSAYO DE MICROFLUORIMETRÍA DE Ca^{2+}

4.1. FURA-2 COMO FLUORÓFORO

Los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de HUVEC se estudiaron mediante técnicas microfluorimétricas usando FURA-2AM (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Este fluorocromo posee unas características ideales para la cuantificación de Ca^{2+} , ya que además de no verse afectado por mínimas fluctuaciones del pH fisiológico, actúa como quelante del Ca^{2+} mediante la unión del mismo con los grupos carboxilos (-COOH) siendo altamente específico y selectivo para este ion divalente. La forma que se comercializa, FURA-2AM, es una forma esterificada del FURA-2 permeable a través de la membrana plasmática. Una vez que atraviesa la membrana, las esterasas de la célula son capaces de hidrolizar al FURA-2AM, quedando el fluoróforo (FURA-2) libre en el citosol para unirse al Ca^{2+} intracelular.

Otra característica especial del FURA-2 es que tiene la capacidad de ser excitado a dos longitudes de onda diferentes (λ , 340 y 380 nm), que se relacionan de forma directa (excitación a 340 nm), o indirectamente proporcional (excitación a 380 nm) a partir del punto isobético, con la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Así, la ratio (R) de ambas intensidades de fluorescencia (F380/F340 nm), emitidas a 510 nm, aporta una estimación de los cambios en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

El uso de esta ratio facilita además que se minimice el efecto de una distribución irregular del FURA-2.

4.2. SISTEMA DE MICROFLUORIMETRÍA DE CALCIO

Para la medida del F340/F380 se usó un sistema de microfluorimetría compuesto por la fuente de excitación, el monocromador, un microscopio invertido y una cámara CCD como sistema de detección. La fuente de excitación del sistema fue una lámpara de xenón, cuya ancha gama de λ se redujo con el uso de un monocromador (Polychrome V, Till Photonics, Munich, Alemania), considerándose éste como nuestro sistema de excitación. La fluorescencia fue registrada usando el microscopio invertido Leica (Leica, Alemania) equipado con un objetivo 20X (0,75 NA), un espejo dicróico de 510 nm y filtros de emisión para la misma longitud de onda. Así, la luz se incidía sobre las HUVEC y la fluorescencia emitida se recolectaba gracias a la cámara CCD (Cooke PixelFly, EEUU) dotada con 12 bits y sensible a la luz acoplada del microscopio invertido.

Por otra parte, el registro fue controlado con el software HP (Hamamatsu Photonic; Japón), capaz de mostrar el examen simultáneo de la fluorescencia emitida por las dos λ de excitación (340 y 380 nm) y a su vez la R durante el experimento, permitiendo la estimación de los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$. La λ emitida se recolectó a 510 nm.

Además, con el fin de que las células se sometieran a diferentes estímulos en un mismo habitáculo o cámara, contamos con un sistema de jeringas con diferentes soluciones que, ayudadas de la aspiración al vacío, permitieron que las diferentes drogas fluyesen a través de las células.

4.3. PROTOCOLO DEL EXPERIMENTO

Como se comentó con anterioridad, para este ensayo las HUVEC se sembraron en cubres sobre placas de 3-cm Ø. En el caso de los ensayos de silenciamiento, las células se transfectaron 48 h antes del experimento. El día del ensayo, se añadió 2-5 μM de FURA-2AM en 2 ml de medio de cultivo de las células endoteliales, EGM-2™, y se incubó durante 30 min a 37°C. No se requirió la privación de suero en este caso, debido a que el medio contenía un bajo contenido en el mismo (2 % FBS). La composición de la solución de Ca^{2+} (pH = 7.4) fue 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 2.5 mM CaCl_2 , 1 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES y 10 mM Glucosa. La composición de la solución 0Ca^{2+} (pH = 7.4) fue 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4 mM MgCl_2 , 10 mM HEPES, 10 mM Glucosa y 0.5 Mm EGTA. Para verificar la capacidad del factor de crecimiento VEGF para inducir SOCE, se realizó un set de experimentos usando VEGF-A y anti-VEGF-A (Cat. No. MAB293-SP; R&D, EEUU) en proporción 1:1. En este caso, se usaron las HUVEC al 60-70% de la confluencia. Así, el diseño del experimento fue el siguiente: A) 2 min en solución 0Ca^{2+} , 2 min en solución 0Ca^{2+} con VEGF-A (30 ng/ml; Sigma-Aldrich, EEUU), 4 min Ca^{2+} (2.5 mM) con VEGF-A (30 ng/ml) (Figura 15A); B) 2 min en solución 0Ca^{2+} , 2 min en solución 0Ca^{2+} con VEGF-A (30 ng/ml) + anti-VEGF (30 ng/ml), 4 min Ca^{2+} (2.5 mM) con VEGF-A (30 ng/ml) + anti-VEGF (30 ng/ml) (Figura 15B).

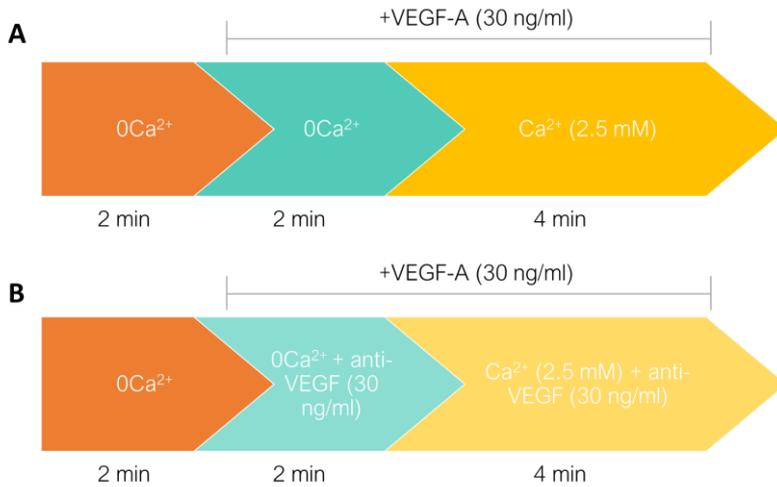


Figura 15. Protocolo de estimulación de Ca²⁺ con VEGF. A,B. Para comprobar la capacidad del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) para inducir la entrada de Ca²⁺ store operated calcium entry (SOCE) en las HUVEC, se usaron al 60-70% de confluencia y se realizó el siguiente protocolo de incubaciones: **A.** 2 min en solución 0Ca²⁺, 2 min en solución 0Ca²⁺ con VEGF-A (30 ng/ml) y 4 min en solución de Ca²⁺ (2.5 mM) con VEGF-A (30 ng/ml) y **B.** 2 min en solución 0Ca²⁺, 2 min en solución 0Ca²⁺ con VEGF-A (30 ng/ml) y anti-VEGF (30 ng/ml), 4 min Ca²⁺ (2.5 mM) con VEGF-A (30 ng/ml) y anti-VEGF (30 ng/ml). Esquema realizado con Microsoft® PowerPoint 2016.

Una vez comprobada la cualidad de VEGF para inducir SOCE, el diseño del experimento problema fue el siguiente: 2 min en solución 0Ca²⁺, 2 min en solución 0Ca²⁺ con VEGF-A (30 ng/ml), 4 min Ca²⁺ (2.5 mM) con VEGF-A (30 ng/ml) y, hasta que la curva bajó a un valor cercano al basal, Ca²⁺ (2.5 mM) con VEGF-A (30 ng/ml) y 10 μM de GSK-7975A (Figura 16).

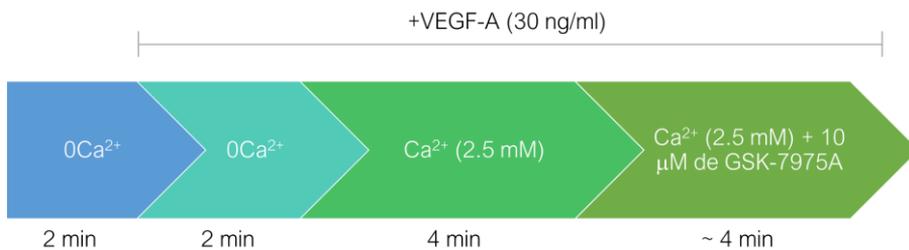


Figura 16. Protocolo del experimento problema de Ca^{2+} . Para estudiar si la ausencia de las proteínas Orai1 y SARAF afectaban a la entrada de Ca^{2+} store operated calcium entry (SOCE) inducida por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en las HUVEC, se usaron al 60-70% de confluencia se usaron al 60-70% de confluencia y se siguió el siguiente protocolo de incubaciones: 2 min en solución 0Ca^{2+} , 2 min en solución 0Ca^{2+} con VEGF-A (30 ng/ml), 4 min Ca^{2+} (2.5 mM) con VEGF-A (30 ng/ml) y, hasta que la curva bajase a un valor cercano al basal, Ca^{2+} (2.5 mM) con VEGF-A (30 ng/ml) y $10\ \mu\text{M}$ de GSK-7975A. Esquema realizado con Microsoft® PowerPoint 2016.

Finalmente se realizaron ensayos usando tapsigargina para activar SOCE como se presenta en la Figura 17, siguiendo la siguiente secuencia: 2 min en solución 0Ca^{2+} , 2 min en solución 0Ca^{2+} tapsigargina ($10\ \mu\text{M}$) y 4 min Ca^{2+} (2.5 mM).



Figura 17. Protocolo del experimento de Ca^{2+} con tapsigargina. Para estudiar la entrada de Ca^{2+} store operated calcium entry (SOCE) en las HUVEC, éstas se usaron al 60-70% de confluencia y se siguió el siguiente protocolo de incubaciones: 2 min en solución 0Ca^{2+} , 2 min en solución 0Ca^{2+} con tapsigargina ($10\ \mu\text{M}$) y 4 min Ca^{2+} (2.5 mM). Esquema realizado con Microsoft® PowerPoint 2016.

Todos los ensayos se realizaron a T^a ambiente con el sistema de microfluorimetría y perfusión explicado en el apartado anterior usando las soluciones 0Ca^{2+} y Ca^{2+} precalentadas a 37°C . Además, en cada día de ensayo y por cada placa, se realizó un experimento control sin el agonista (VEGF) a fin de estudiar el *leakage*, es decir, la entrada de calcio basal sin la activación de SOCE.

Para la medición, nos basamos en la ratio R ($R = F340/F380$), aportada por el *software* HP, la cual se veía alterada por los estímulos VEGF

y Ca^{2+} extracelular. De este modo, se realizó la diferencia entre el pico máximo de ratio dentro de los 2 primeros min después de añadir el estímulo y el valor basal de R antes de la adición del mismo (Δratio). Para calcular la pendiente de subida se divide el Δratio entre el valor basal de R antes del estímulo.

5. INMUNOFLUORESCENCIA

5.1. INMUNOFLUORESCENCIA DE PROTEÍNAS

Con objeto de realizar el estudio de localización celular mediante inmunofluorescencia, las HUVEC se sembraron sobre cubres en placas de 3-cm Ø. Las células se fijaron entonces con formalina (20 min), se permeabilizaron con PBS 1X 0.5% Triton X-100 (20 min) y se bloquearon con PBS 1X + 1% BSA y 0.5% TWEEN® 20 (30 min). A continuación, las HUVEC se incubaron con el anticuerpo *mouse* anti-Orai1, *rabbit* anti-SARAF o *rabbit* anti-MEF2A (Tabla 3) durante 2 h a T^a ambiente. A partir de este punto, todos los pasos se realizaron en oscuridad. Tras esto, se incubaron con los anticuerpos secundarios Goat anti-*Mouse* Alexa Fluor® 594 (H+L) y Goat anti-*Rabbit* Alexa Fluor® 488 (1:400) a T^a ambiente durante 1 h. Seguidamente, las células se incubaron con DAPI diluido en PBS 1X durante 5 min con objeto de poder visualizar los núcleos. Finalmente, los cubres se montaron sobre portas usando el medio de montaje Dako. Se tomaron imágenes de las células usando el microscopio confocal Nikon A1R+ laser 143 scanning (objetivo 40X). El coeficiente de correlación de Pearson se calculó usando el *plugin* Jacob del *software* ImageJ (Bolte and Cordelières, 2006).

Anticuerpo primario	Concentración de trabajo	Referencia
<i>Mouse anti-Orai1</i>	1:200	Cat.No. ab175040 Abcam (Reino Unido)
<i>Rabbit anti-SARAF</i>	1:200	Cat. No. PA5-24237 ThermoFisher Scientific (EEUU)
<i>Rabbit anti-MEF2A</i>	1:200	Cat. No. GTX101286 Genetex (EEUU)

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados durante el desarrollo de la tesis doctoral.

5.2. PROXIMITY LIGATION ASSAY (PLA)

Además de por inmunofluorescencia clásica, la colocalización de las proteínas Orai1 y SARAF se estudió mediante el ensayo *Proximity Ligation Assay* (PLA). Este método tiene como fundamento el uso de la ligación por proximidad *in situ* para la detección de proteínas que se encuentren colocalizadas. Así, se añaden en primer lugar anticuerpos primarios que se unen a las proteínas problema, y tras la incubación con anticuerpos secundarios unidos a sondas PLA (oligonucleótidos), las enzimas ligasa y polimerasa hibridan oligonucleótidos que se unen a las primera sondas y oligonucleótidos que se unen a las siguientes marcadas fluorescentemente. De este modo, se pueden detectar puntos fluorescentes producto de la unión de los oligonucleótidos marcados con el amplicón, que nos indican que las proteínas se encuentran a menos de 4Å de distancia (Figura 18).

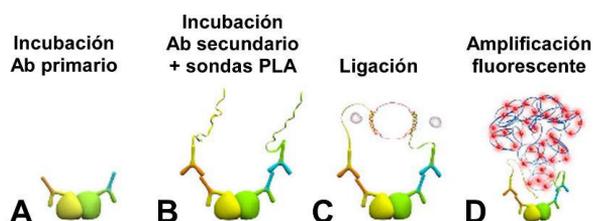


Figura 18. Fundamento del ensayo de inmunofluorescencia *proximity ligation assay* (PLA). A-D. Tras la fijación, permabilización y bloqueo de las muestras, se incubaron con los anticuerpos primarios (A), se incubaron con los anticuerpos secundarios acoplados a sondas PLA (B), se ligaron aquellas sondas de diferentes anticuerpos localizadas a menos de 40 nm de distancia (C), y se amplificó la señal de fluorescencia para poder ser detectada en un microscopio de fluorescencia (D). Imagen tomada del protocolo del kit Duolink in situ PLA detection (Sigma-Aldrich, EEUU).

Para llevarlo a cabo, se utilizó el kit Duolink in situ PLA detection (Sigma-Aldrich, EEUU) y se siguió el protocolo recomendado por el fabricante con algunas modificaciones. Las HUVEC se sembraron en ibidi μ -Slide VI^{0.4} ibitreat (Ibidi, Alemania) y a las 24 h se fijaron con formalina durante 25 min. Las células se bloquearon con PBS 1X + 1% BSA 0.5% TWEEN® 20 durante 30 min y se incubaron con los anticuerpos *mouse* anti-Orai1 y *rabbit* anti-SARAF 2h (Tabla 3) a T^a ambiente. Tras ello, las células se incubaron con las sondas Duolink PLA anti-*Rabbit* PLUS y anti-*Mouse* MINUS (incluidas en el kit) durante 1 h a 37°C. Seguidamente, para el paso de la ligación, se añadió el mix de oligonucleótidos y la enzima ligasa, y se incubaron las HUVEC 30 min a 37°C. Transcurrido el tiempo, las células se incubaron con la enzima polimerasa diluida en el buffer de amplificación durante 100 min a 37°C. Cabe remarcar que estas tres incubaciones se llevaron a cabo en oscuridad en una cámara húmeda precalentada. Finalmente, las células se lavaron con las soluciones A y B (incluidas en el kit) en los tiempos indicados en el kit y se incubaron con DAPI para la

visualización de núcleos. Las células se fotografiaron utilizando el microscopio de fluorescencia Olympus IX-71 (objetivo 20X).

6. EXTRACCIÓN DE ARN Y CUANTIFICACIÓN POR PCR CUANTITATIVA

6.1. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN

Para extraer el ARN a partir de las HUVEC en cultivo, usamos el miRNeasy kit (Qiagen, Alemania) y se siguió el protocolo recomendado por el fabricante. Brevemente, tras los lavados con PBS 1X, se añadió 1 ml de QIAzol Lysis Reagent (incluido en el kit) y, usando *Cell Scrapers*, se recogieron las células contenidas en la placa. Tras añadir 200 µl de cloroformo (Sigma-Aldrich, EEUU) y mezclar en el vórtex, el lisado celular se centrifugó durante 15 min a 4°C a 12000 G. Finalmente, tras la recolección y los lavados de la fase acuosa con etanol, diferentes *buffers* y las columnas incluidas en el kit, se eluyó el contenido de ácidos ribonucleicos de la columna con 30 µl de agua libre de ADNasas y ARNasas. Como paso adicional, a fin de obtener una mejor calidad del ARN, las muestras se precipitaron usando 2 µl glicógeno, 10 µl acetato de sodio y 2.5 vol de 100% de etanol frío. En el caso de que se quisiera ver el efecto del silenciamiento de alguna molécula, las células se transfectaron 24 h antes de recolectar el ARN. Por otra parte, para evaluar el efecto del suero animal y humano sobre las HUVEC, 48 h antes de la extracción de ARN se cambió el medio EGM-2™ por EBM-2, y 24 h antes se añadía 5% de suero de rata, o bien 2.5 % de suero de paciente/control al medio de cultivo.

Para cuantificar el ARN total usamos el Nanodrop™ y se midió la concentración a 260 nm. Se consideró que la muestra era pura si la relación de ácidos nucleicos y proteínas (A260/A280) era de 2 ± 0.10 .

6.2. RETROTRANSCRIPCIÓN DE ARN

Antes de realizar la PCR cuantitativa, se procedió a retrotranscribir 500-1000 ng de ARN usando el kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (BioRad, EEUU) con los siguientes volúmenes por muestra: 4 μ l 5x reverse-transcription reaction mix y 1 μ l iScript reverse transcriptase. La reacción se llevó a cabo siguiendo los siguientes ciclos de temperatura: *priming* 5 min a 25°C, transcripción reversa 20 min a 46°C e inactivación de la RT 1 min a 95°C.

6.3. PCR CUANTITATIVA Y CUANTIFICACIÓN RELATIVA

A partir del ADNc retrotranscrito, se procedió a realizar una qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction). El ADNc se diluyó 10 veces antes de ser cargado en la placa de 384 pocillos (Invitrogen, EEUU). Se preparó un *mix* para cada uno de los genes que se querían estudiar, conteniendo por pocillo: 5 μ l of iTaq Universal SYBR Green Supermix, 0.5 μ l 10 μ M de primer forward (Tabla 4), 0.5 μ l 10 μ M de primer reverse (Tabla 4) y 1.5 μ l de agua libre de ARNasa. Se repartieron los *mix* gracias a una pipeta automática, y se añadieron a cada pocillo 2.5 μ l de cada ADNc diluido (en triplicado para cada uno de los genes). Se consideró como NTC (*non template control*) aquellos pocillos que contenían el *mix*, pero el material genético se había remplazado por agua. La placa se agitó gracias a un vórtex específico para placas durante 15 s y se centrifugó a 3000 rpm durante 1 min en la centrífuga *eppendorf*® 2100R. Finalmente, se siguieron los siguientes ciclos

de temperatura en el termociclador Applied Biosystems Viia7: 95°C 20 s, 40 ciclos a 95°C durante 1 min y 60°C durante 20 s.

Oligonucleótidos	Secuencia	Casa comercial
<i>Orai1</i> Forward	5'-CCATAAGACGGACCGACAGT-3'	Sigma-Aldrich (EEUU)
<i>Orai1</i> Reverse	5'-GGGAAGGTGAGGACTTAGGC-3'	Sigma-Aldrich (EEUU)
<i>SARAF</i> Forward	5'-CAGTGGGAATGTAAGACGGACTT-3'	Sigma-Aldrich (EEUU)
<i>SARAF</i> Reverse	5'-ACTCATAGCCTTCACAGCTCACC-3'	Sigma-Aldrich (EEUU)
<i>Notch-1</i> Forward	5'-AAGCTGCATCCAGAGGCAAAC-3'	Sigma-Aldrich (EEUU)
<i>Notch-1</i> Reverse	5'-TGGCATAACACTCCGAGAACAC-3'	Sigma-Aldrich (EEUU)
<i>Hes1</i> Forward	5'-AGCACAGAAAGTCATCAAA-3'	Sigma-Aldrich (EEUU)
<i>Hes1</i> Reverse	5'-ATTCTTGCTCTTCGTCTTTT-3'	Sigma-Aldrich (EEUU)
<i>Hey1</i> Forward	5'-CGAGCTGGACGAGCCCAT-3'	Sigma-Aldrich (EEUU)
<i>Hey1</i> Reverse	5'-GGAACCTAGAGCCGAACTCA-3'	Sigma-Aldrich (EEUU)
<i>VEGF-A</i> Forward	5'-AGCCTTGCCTTGCTGCTCTA-3'	Sigma-Aldrich (EEUU)
<i>VEGF-A</i> Reverse	5'-TGATGATTCTGCCCTCCTCC-3'	Sigma-Aldrich (EEUU)

18S Forward	5'-AACGAGACTCTGGCATGCT-3'	Sigma-Aldrich (EEUU)
18S Reverse	5' -GCCACTTGTCCTCTAAGA-3'	Sigma-Aldrich (EEUU)

Tabla 4. Sondas genes utilizadas durante el desarrollo de la tesis doctoral.

Para analizar los resultados obtenidos en la qPCR se utilizó el método de cuantificación relativa $\Delta\Delta C_T$ (Schmittgen and Livak, 2008), basado en el uso de un gen de referencia o endógeno cuya expresión se mantiene inalterada en la célula independientemente de la condición de estudio. El *software* del termociclador ViiA7 aporta información sobre el ciclo umbral o *Cycle-threshold* (C_T) de los diferentes genes para cada una de las muestras. Así, este valor nos aporta información sobre el número de ciclo al cual la intensidad de emisión del fluoróforo aumenta con respecto al ruido de fondo. De este modo, el cálculo correspondiente al *fold change* es el siguiente:

$$\text{fold change} = 2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(\Delta C_T \text{ gen muestras problema} - \Delta C_T \text{ gen muestras control})}$$

Donde

$$\Delta C_T \text{ gen muestras problema} = C_T \text{ gen interés} - C_T \text{ gen endógeno}$$

$$\Delta C_T \text{ gen muestras control} = C_T \text{ gen interés} - C_T \text{ gen endógeno}$$

El gen endógeno seleccionado fue GAPDH. La representación en gráfico de barras se realizó utilizando el *fold change* o el logaritmo en base 10 del *fold change*.

7. WESTERN BLOT Y EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

7.1. EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS A PARTIR DE CULTIVO CELULAR

Para los ensayos donde se perseguía cuantificar las proteínas a través de la técnica Western Blot (WB), las HUVEC se sembraron en placas de 6-cm Ø. En el caso de que se quisiera ver el efecto del silenciamiento de alguna molécula, las células se transfectaron 48 h antes de recolectar las proteínas. Por otra parte, para evaluar el efecto del suero del animal/humano sobre las CE, 72 h antes de la extracción de proteínas se cambió el medio EGM-2™ por EBM-2, y 48 h antes se añadía 5% ó 2.5% de suero de rata o humano, respectivamente. Concretamente, para estudiar la activación de la vía de Notch mediante la detección de NICD, las proteínas se recogieron 2 h después de la adición de este suero.

Para la extracción proteica, las células se lavaron 2 veces con PBS 1X a 4°C. Así, las placas se mantuvieron en hielo a fin de preservar la integridad de las proteínas. Seguidamente, se añadieron 300 µl de Buffer de lisis compuesto por 224.14 µl NP40, 42.86 µl inhibidor de proteasa (Roche, Suiza), 3 µl PMSF (Sigma-Aldrich, EEUU) y 30 µl Phosphostop (Thermo Fisher Scientific, EEUU) a cada placa y se raspó el fondo con un *Cell Scraper* (Greiner Bio-one, EEUU). Todo el contenido de la placa se recolectó entonces en *ependorfs*® y, tras dejarlos 20 min a 4°C, se centrifugó 20 min a 12000 rpm a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se guardaron las proteínas a -80°C para su posterior uso o bien, se cuantificaron mediante el método de Bradford para continuar con los siguientes pasos del WB.

7.2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WB

Una vez cuantificadas las proteínas, se realizaron los cálculos para cargar 35 µg en cada pocillo del gel del WB, y se mezcló dicha cantidad de proteínas en proporción 1:1 con 2X *Laemmli sample buffer* (12 mM, Tris HCl pH 6.8, 20% Glicerol, 4% SDS, 0.004% Azul de Bromofenol y 5% de β-mercaptoetanol; Sigma-Aldrich, EEUU) y se calentó la mezcla durante 5 min a 95 °C en un *Thermoblock* (Optic Ivymen System™, COMECTA®, España). Tras esto, se esperó que la mezcla se atemperara, se añadió *Laemmli* hasta completar el tamaño del pocillo y se cargó 40 µl (si el gel poseía 15 pocillos) o 60 µl (si el gel poseía 10 pocillos). En el caso de no obtener cantidad suficiente de proteína, se añadió la máxima cantidad posible de las mismas y se mantuvo la proporción de 1:1 con el 2X *Laemmli sample buffer*.

El primer paso para realizar el WB fue preparar los geles de poliacrilamida (BioRad, EEUU) SDS PAGE al 10%, porcentaje requerido dado el tamaño de las proteínas de interés. El gel *stacking/lower* (10% acrilamida) tuvo por tanto una composición de 4 ml de H₂O, 3.3 ml de 30% de acrilamida, 2.5 ml de Tris-Cl (1,5M; pH 8,8) SDS (10%), 75 µl de APS 10% y 5 µl de TEMED. Por su parte, el gel *resolving/upper* (4% acrilamida), estuvo compuesto por 3.1 ml de H₂O, 650 µl de 30% de acrilamida, 1.25 ml de Tris-Cl (0,5M, pH 6,8) SDS (10%), 75 µl de APS 10% y 2.5 µl de TEMED. Se colocaron peines tanto de 10 como de 15 pocillos (Biorad, EEUU).

A continuación, una vez realizados los geles, colocados en las cubetas (Biorad, EEUU) y sumergidos en solución *Running buffer* (10% Tris-Glicina (10x) (0.25 M Tris-Base, 1.92 M Glicina) 0.1% SDS (10x)), se cargaron las muestras. Se realizó entonces la electroforesis a 100-120 mV

de voltaje durante 1h 30 – 2 h usando los adaptadores y la fuente energética de Biorad (EEUU). Se activaron entonces las membranas PVDF (GE Healthcare, EEUU) con metanol durante 5 min con balanceo a 20 ppm, se lavaron con H₂O a 40 ppm y se dejaron en *Transfer buffer* (10% Tris-Glicina (10x) 20% Metanol) hasta el momento de la transferencia.

Finalizada la electroforesis, las membranas se colocaron sobre los geles en posición “sándwich” con una esponja negra y una membrana (Biorad, EEUU) a cada uno de los lados. Se dispusieron en una cubeta, se rellenó con *Transfer buffer* y se realizó la transferencia húmeda a 4°C durante 16 h a 30 mV. Al día siguiente, se recuperaron las membranas y se bloquearon durante 3 h con leche al 5% en p/v en 1X TBS-Tween (TBS-T; 10% TBS 10X (0.1 M Tris-Base, 1.5 M NaCl) 0.1 % TWEEN ® 20) con agitación lenta. Transcurrido el tiempo, se incubaron las membranas con el anticuerpo primario (Tabla 5) en solución de bloqueo (BSA 5% p/v en TBS-T) y se incubó en agitación circular (Stuart, Reino Unido) a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se lavaron las membranas con TBS-T durante 50 min (5 lavados de 10 min) y se incubaron a T^a ambiente 45 min con el anticuerpo secundario correspondiente (para anticuerpos primarios *mouse*: 1:10000 HRP-Goat anti-*Mouse* IgG, para anticuerpos primarios *rabbit*: 1:10000 HRP-Goat anti-*Rabbit* IgG; Jackson Immuno Research, EEUU) en solución de bloqueo (leche 5% p/v en TBS-T). Finalmente, se lavaron de nuevo las membranas con TBS-T y se revelaron usando los kits Clarity Western ECL y Clarity Max™ Western ECL (Biorad, EEUU) en función de la facilidad para visualizar la proteína mediante quimioluminiscencia en el Chemidoc (BioRad, EEUU). Para determinar la concentración de proteína detectada, se llevó a cabo un análisis densitométrico de las bandas para

cada anticuerpo, donde se normalizó usando la señal correspondiente de GAPDH, mediante el *software* Image Lab de Biorad (EEUU).

Anticuerpo primario	Concentración de trabajo	Casa comercial
<i>Rabbit anti-Orai1</i>	1:250	Cat. No. O8264 Sigma-Aldrich (EEUU)
<i>Rabbit anti-SARAF</i>	1:200	Cat. No. PA5-24237 ThermoFisher Scientific (EEUU)
<i>Rabbit Cleaved Notch1 (NICD)</i>	1:500	Cat. No. 4147S Cell Signaling (EEUU)
<i>Rabbit VEGFR2</i>	1:500	Cat. No. 2479S Cell Signaling (EEUU)
<i>Rabbit MEF2A</i>	1:200	Cat. No. GTX101286 Genetex (EEUU)
<i>Rabbit anti-GAPDH</i>	1:10000	Cat. No. G9545-100UL Sigma (EEUU)

Tabla 5. Anticuerpos primarios usados para Westen Blot (WB).

8. ANÁLISIS DE LOS DATOS

Los datos obtenidos en cada ensayo se analizaron usando el *software* GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc.). Al principio de cada estudio, se evaluó el tamaño muestral necesario. Se descartaron los valores atípicos y se comprobó la normalidad de los grupos usando la opción de “*Identify outliers*” and “*Normality and Lognormality Test*”. Si la muestra poseía una distribución normal, para la comparación de medias se realizaron pruebas paramétricas: para 2 grupos t-Student y para varios grupos un análisis de varianzas ANOVA con comparaciones múltiples (análisis ordinario o sin

corrección de LSD de Fisher). En el caso de que no siguieran una distribución normal, para la comparación de medias se realizaron pruebas no paramétricas: para 2 grupos Mann-Whitney y para varios grupos un test Kruskal-Wallis con comparaciones múltiples (análisis ordinario o sin corrección del test de Dunn). Los datos se presentan como la media \pm el error estándar de la media (SEM) y se normalizaron al experimento control en la medida de lo posible. Se consideraron diferencias significativas aquellas cuyos p -value fueran < 0.05 .

Para el cálculo del IC50 en el análisis de la inhibición dosis-dependiente [log(inhibitor) vs. respuesta normalizada], se usó la ecuación de Hill $Y = 100/[1 + 10^{\{(\log IC50 - \log X) * n\}}]$, donde n es la pendiente de Hill.



Resultados

1. CARACTERIZACIÓN DE PAPEL DE SOCE EN LA ANGIOGÉNESIS

1.1. EL BLOQUEO DE SOCE AFECTA A LA ANGIOGÉNESIS MEDIADA POR SPROUTING

El primer paso para examinar el papel de SOCE en la angiogénesis, fue estudiar cómo afectaba la presencia del inhibidor de Orai1, GSK-7975A (GSK) (Derler et al., 2013), al desarrollo del proceso de *sprouting* en anillos aórticos de rata embebidos en Matrigel y estimulados con EGM-2™. Se tomaron imágenes en los días 0, 2, 4 y 6 del ensayo. Como muestra la Figura 19, en el día 2 aún no se habían desarrollado ramificaciones vasculares desde el anillo en ninguna de las condiciones bajo estudio (control, DMSO (vehículo), GSK).

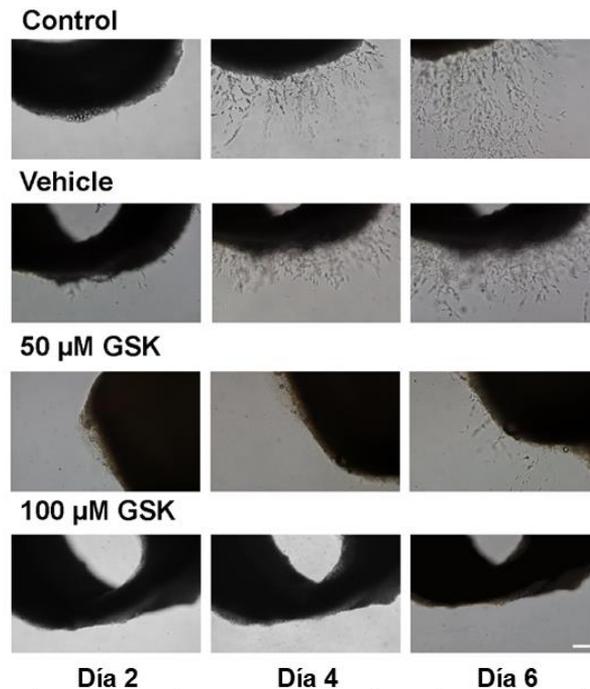


Figura 19. GSK-7975A (GSK) reduce el *sprouting* a partir de anillos aórticos de rata.

Los anillos aórticos se cultivaron embebidos en Matrigel con Endothelial Growth Medium BulletKit-2 (EGM-2™) enriquecido con diferentes factores de crecimiento. Los paneles muestran imágenes de la evolución en las ramificaciones desde el anillo en los días 2, 4 y 6 del ensayo de algunas de las condiciones experimentales estudiadas (control, DMSO (vehículo), 50 y 100 μM de GSK-7975A) tomadas con un microscopio de contraste de fase (objetivo 10X, barra de escala = 200 μm).

A partir del día 4, pudimos observar los primeros microvasos que atravesaron el Matrigel en el anillo control, en el vehículo, así como en los tratados con 10 μM y 30 μM de GSK. Fue en el día 6 cuando obtuvimos brotes vasculares para todas las condiciones, excepto para 100 μM donde estos fueron prácticamente inexistentes (Figura 19).

En las primeras probatinas de este estudio, el ensayo se continuó hasta el día 8 desde la siembra del anillo, a fin de comprobar si en este punto temporal conseguíamos detectar más ramificaciones vasculares en aquellos anillos tratados con una mayor concentración de GSK. Sin embargo, este aumento temporal no supuso cambios aparentes en los anillos, donde la inhibición del *sprouting* parecía irreversible y casi total. Por el contrario, para el resto de condiciones, especialmente para el control y el vehículo, las ramificaciones vasculares continuaron creciendo conformando una red de microvasos incuantificable por el *software* elegido para el análisis de los nuevos brotes. Es por ello que la medición del número de ramificaciones se realizó en el día 6 de ensayo, como se muestra en la Figura 20A. Como podemos observar, la adición de concentraciones crecientes de GSK disminuyó significativamente el número de brotes vasculares. Además, pudimos comprobar que esta caída en la proporción de ramificaciones era proporcional a la cantidad de GSK en el medio de cultivo, ajustándose de manera dosis-dependiente (Figura 20B).

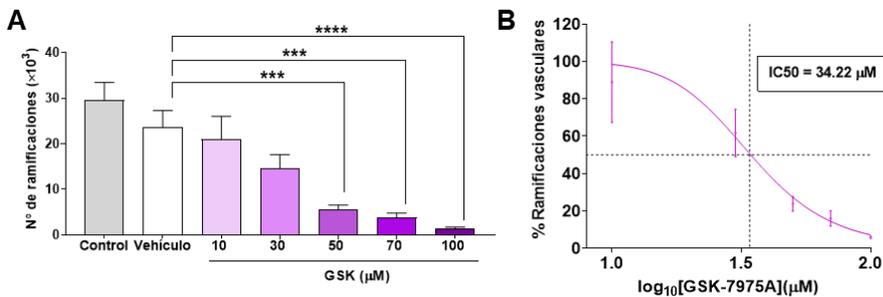


Figura 20. La cuantificación con ImageJ revela que GSK-7975A (GSK) reduce el número de las ramificaciones vasculares a partir de anillos aórticos de rata. **A.** El gráfico en barras muestra el número de brotes en los anillos control (gris), y en los anillos tratados con el vehículo (DMSO, blanco) y con concentraciones crecientes de GSK (10, 30, 50, 70, and 100 μM, escala de color lila a púrpura) (n = 6). **B.** Curva de dosis dependencia de la inhibición del porcentaje de ramificaciones vasculares mediada por GSK en los anillos aórticos de rata. IC₅₀ = 34.22 μM. El ajuste se realizó usando la ecuación de Hill, como se describe en el apartado de *Materiales y métodos* (pendiente de Hill: -2.443, 95% IC IC₅₀ 22.8 - 44.85, R² = 0.5762). Los valores se presentan como la media ± S.E.M. (***) y (****) indican una significancia con un $p < 0.001$ y un $p < 0.0001$, respectivamente.

1.2. LA INHIBICIÓN DE SOCE ATENÚA LA FORMACIÓN DE TUBOS Y LA MIGRACIÓN DE LAS HUVEC

El siguiente paso fue examinar el efecto del GSK sobre dos pasos fundamentales para la formación de un nuevo vaso sanguíneo: la disposición en tubo y la migración de las CE. Para ello, en primer lugar, usamos el modelo de la formación de mallas de HUVEC sobre una matriz sólida, en nuestro caso, Matrigel usando EGM-2™ como estímulo angiogénico. Como podemos comprobar en la Figura 21A, en el caso de las condiciones control y vehículo, las HUVEC se dispusieron sobre el gel formando mallas celulares completas. Sin embargo, la presencia de GSK en el medio (50 y 70 μM) dificultó tanto la adherencia de las células sobre la matriz, como el cierre de las mallas por la extensión de filopodios de CE cercanas. Así, tras el análisis, se contabilizaron las mallas resultantes comprobándose de forma

cuantitativa que el inhibidor de SOCE afectaba considerablemente a la formación de tubos de las HUVEC (Figura 21B).

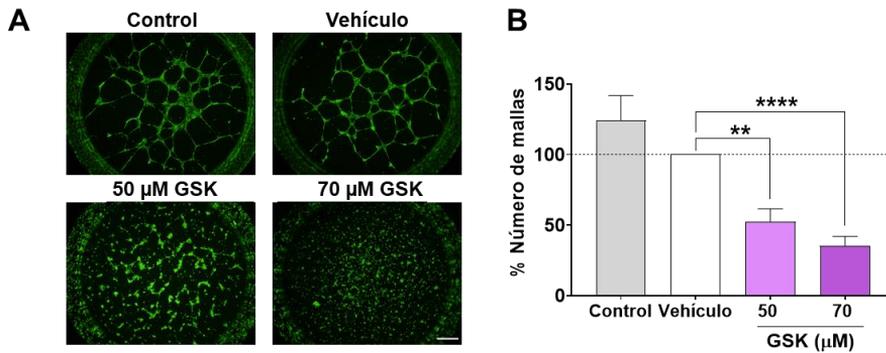


Figura 21. La presencia de GSK-7975A (GSK) disminuye la disposición en tubo de las HUVEC. **A.** Imágenes de fluorescencia (objetivo 4X, barra de escala = 500 μm) de HUVEC (control, vehículo (DMSO), 50 y 70 μM de GSK) incubadas con Calceína-AM y sembradas sobre Matrigel. **B.** El gráfico de barras muestra la media normalizada del porcentaje del número de mallas sobre la matriz de HUVEC control (gris) y tratadas con el vehículo (blanco) y con 50 y 70 μM de GSK (escala de lilas) (n = 6). Los valores se presentan como la media ± S.E.M. (**) y (****) indican una significancia con un $p < 0.01$ y $p < 0.0001$, respectivamente.

Paralelamente, se comprobó si el inhibidor de SOCE producía alguna consecuencia negativa sobre la capacidad de migración de las HUVEC en el ensayo de cicatrización *in vitro* “wound healing”. En efecto, pudimos comprobar que la presencia de GSK también afectó a la habilidad migratoria de las células, como se aprecia en la Figura 22A. Mientras que las HUVEC sin tratar o tratadas con DMSO consiguieron cerrar la herida por completo tras 24 h, las HUVEC que se trataron con 70 μM de GSK no lograron cerrar el vacío provocado por la punta de pipeta. Asimismo, ya a las 12 h desde el inicio del ensayo, se observaron discrepancias visuales en el área de cicatrización entre ambas condiciones control y las HUVEC tratadas con GSK (Figura 22A). Estas disparidades se tradujeron en diferencias significativas entre las condiciones de estudio, tanto a las 12 como a las 24 h, tras el análisis de la evolución del área de cicatrización (Figura 22B).

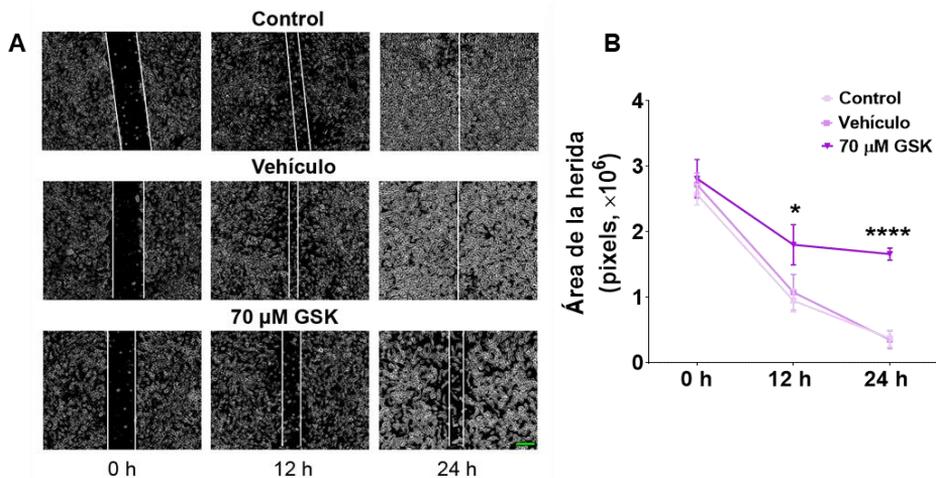


Figura 22. GSK-7975A (GSK) retrasa la migración de las HUVEC en el ensayo de wound healing. **A.** Los paneles muestran imágenes de la evolución de la herida (0, 12 y 24 h) tomadas con un microscopio de contraste de fase (objetivo 10X, barra de escala verde = 200 μ m) durante el análisis con ImageJ de HUVEC control y tratadas con el vehículo (DMSO) y 70 μ M de GSK. **B.** El gráfico muestra la evolución del área de cicatrización tras el daño de los diferentes grupos de estudio (n = 6). Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (*) y (****) indican una significancia con un $p < 0.05$ y un $p < 0.0001$, respectivamente.

1.3. LA INYECCIÓN DE GSK IRRUMPE EL DESARROLLO DE LOS VASOS DE LA RETINA EN EL RATÓN NEONATO

A modo de reafirmar el rol de SOCE en la angiogénesis, se dio un paso más, y se evaluó el efecto de la inyección i.p. de concentraciones crecientes de GSK sobre la vascularización de la retina de ratones neonatos. Los ratones se inyectaron con GSK los días P3, P4, P5 y se estudió la afectación sobre la formación de nuevos vasos en la retina en el día P6 mediante inmunofluorescencia. Como se aprecia en ambos aumentos en la Figura 23, a medida que aumentaba la concentración de GSK inyectado, se reducía visiblemente el número y el nivel de desarrollo de los vasos de la retina, siendo especialmente evidente este cambio en los neonatos inyectados con la concentración más alta de GSK, 31.8 mg/kg.

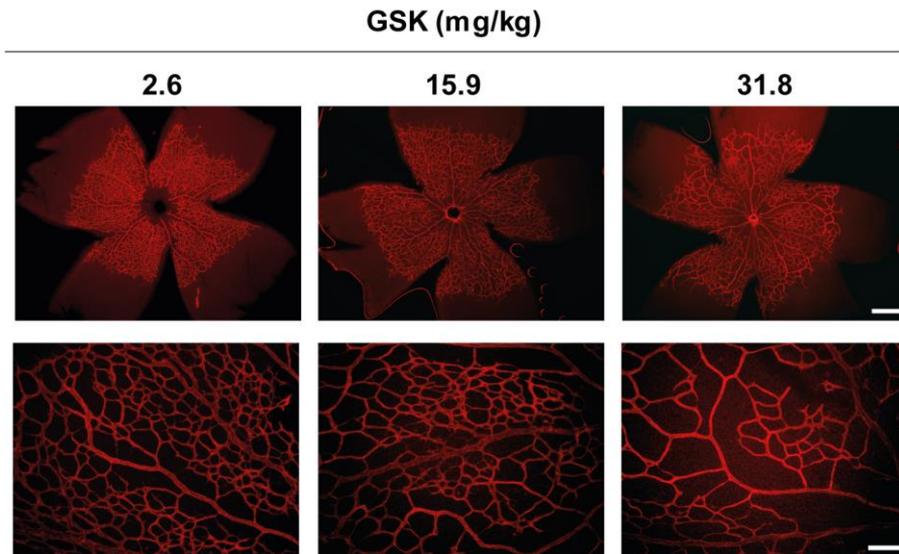


Figura 23. GSK-7975A (GSK) altera la vascularización de la retina de ratón. Imágenes de fluorescencia representativas de los vasos de la retina de ratón marcados con isolectina B4. La retina se aisló de ratones tras el día 6 de nacimiento que habían sido inyectados en los días 3, 4 y 5 con 2.6, 15.9 y 31.8 mg/kg de GSK. Las fotografías se tomaron con los objetivos 4X (paneles superiores, barra de escala = 500 μm) y 20X (paneles inferiores, barra de escala = 100 μm).

Además, tras el análisis de los vasos con la herramienta Angiotool, se comprobó que existían diferencias significativas, tanto en la longitud total de los vasos como en la lacunaridad media (índice que describe la distribución de los espacios vacíos en la imagen), entre las retinas de los ratones inyectados con 31.8 mg/kg de GSK y el resto de concentraciones inferiores a ésta (Figura 24A,B). Gracias a este *software* se demostró también que el número de puntos de unión entre los vasos disminuía de forma significativa entre las concentraciones inyectadas de GSK mayores de 4.0 mg/kg (Figura 24C), ajustándose este descenso a una curva dosis-dependiente siendo el $\text{IC}_{50} = 18.4$ mg/kg (Figura 24D).

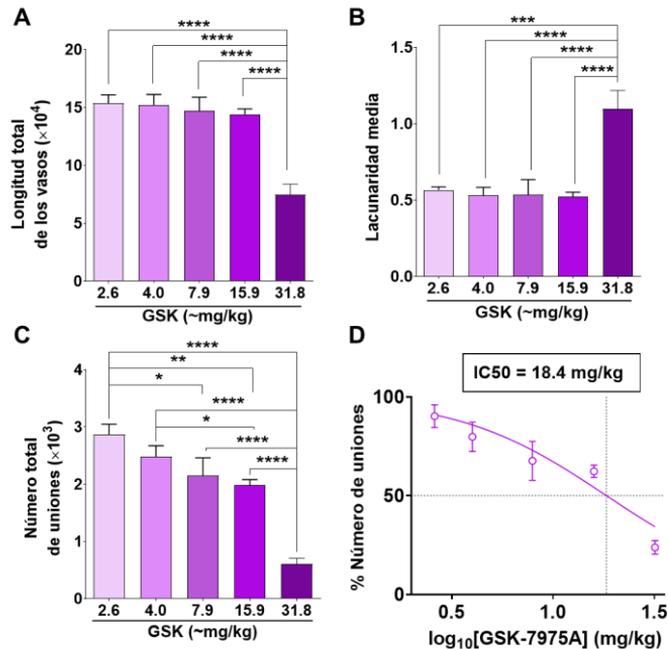


Figura 24. La inyección intraperitoneal de concentraciones crecientes de GSK-7975A (GSK) afecta de forma cuantitativa al desarrollo de los vasos de la retina de ratón. A-C. Los gráficos de barras muestran la longitud total (A), la lacunaridad media (B), y el número de uniones intercelulares (C), de los vasos de las retinas de ratones inyectados con 2.6, 4.0, 7.9, 15.9 y 31.8 mg/kg de GSK (escala de lila a violeta, $n = 4-8$). D. Curva de dosis dependencia de la inhibición del porcentaje del número de uniones inducida por GSK. IC₅₀ = 18.4 mg/kg. El ajuste se realizó usando la ecuación de Hill, como se describe en el apartado de *Materiales y métodos* (pendiente de Hill: -1.185 , 95% IC IC₅₀ 14.50 – 26.44, $R^2 = 0.6480$). Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (*), (**), (***) y (****) indican una significancia con un $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$, y un $p < 0.0001$, respectivamente.

Dada la alta toxicidad de DMSO usado como vehículo, decidimos inyectar un stock de GSK más concentrado y con menos cantidad de DMSO (en μ l) para confirmar el efecto inhibitorio de GSK. Como se puede apreciar en la Figura 25, se distinguió, en ambos aumentos, un menor volumen de vasos en la retina de los ratones inyectados con la mayor concentración de GSK (31.8 mg/kg).

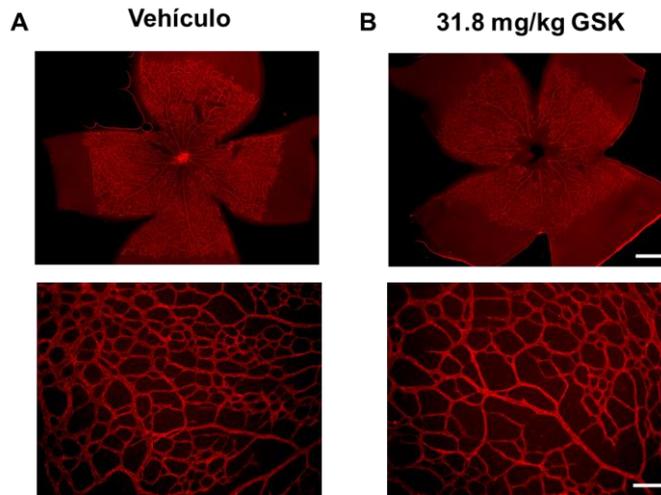


Figura 25. GSK-7975A (GSK) altera la vascularización de la retina de ratón (II). Imágenes de fluorescencia representativas de los vasos de la retina de ratón marcados con isolectina B4. La retina se aisló de ratones tras el día 6 de nacimiento que habían sido inyectados en los días 3,4 y 5 con DMSO (Vehículo) y 31.8 mg/kg de GSK. Las fotografías se tomaron con los objetivos 4X (paneles superiores, barra de escala = 500 μ m) y 20X (paneles inferiores, barra de escala = 100 μ m).

Al igual que en el caso anterior, se estudiaron diferentes marcadores que aportaban información sobre el estado de los vasos, como son el número total de uniones vasculares, el área ocupada por vasos en la imagen, la longitud total de los vasos y la lacunaridad media. De este modo, se observó un descenso significativo de los tres primeros parámetros en los vasos de los ratones inyectados con el inhibidor, señal de un menor desarrollo de los mismos en comparación con la vasculatura de los ratones inyectados con la misma cantidad de DMSO (Figura 26A-C). En el caso de la lacunaridad, al igual que vimos anteriormente, los ratones inyectados con GSK presentaron un mayor número de “huecos” entre los vasos, lo que apuntaba a una menor tasa de angiogénesis en estas retinas (Figura 26D).

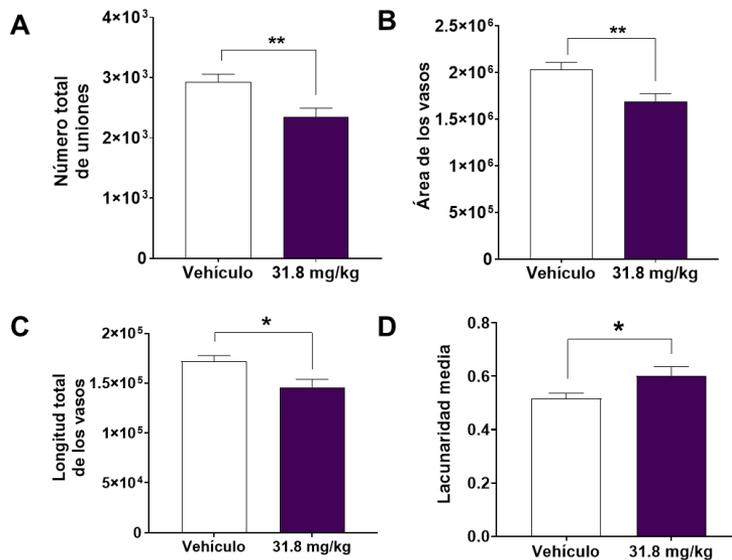


Figura 26. La inyección intraperitoneal de concentraciones crecientes de GSK-7975A (GSK) afecta de forma cuantitativa al desarrollo de los vasos de la retina de ratón II. A-D. Los gráficos de barras muestran el número total de uniones (A), el área (B), la longitud (C) y la lacunaridad media (D) de los vasos de las retinas de ratones inyectados con DMSO (Vehículo, blanco) y 31.8 mg/kg de GSK (morado) ($n = 9-10$). Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (*) y (**) indican una significancia con un $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente.

Por tanto, usando la inhibición farmacológica mediante GSK, todos estos hallazgos confirmaron que SOCE tiene un papel fundamental en los diferentes modelos de estudio de angiogénesis: *sprouting* desde anillos aórticos, disposición en tubo y migración de las CE, y formación de nuevos vasos sanguíneos en el desarrollo de la retina del ratón.

2. VEGF INDUCE SOCE EN LAS HUVEC

A fin de caracterizar la respuesta de SOCE en HUVEC incubadas con FURA-2, se realizó una serie de experimentos con objeto de estudiar la movilización del ion Ca^{2+} utilizando VEGF, factor de crecimiento con propiedades proangiogénicas, junto con, o en ausencia de, un anticuerpo

complementario al mismo. Cuando las HUVEC se trataron durante 4 min con VEGF en una solución libre de Ca^{2+} y luego se añadieron 2.5 mM de Ca^{2+} al medio extracelular, observamos un rápido incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (Control; Figura 27A) que se vio reflejado numéricamente en el porcentaje de cambio del Δratio (F_{340}/F_{380}) (Figura 27B). Sin embargo, cuando en esta incubación con VEGF añadimos también un anticuerpo anti-VEGF, el cambio en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fue mucho más lento y no se llegó a alcanzar una $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tan alta como en el experimento anterior (Figura 27A,B). Asimismo, no se apreciaron cambios en relación a la respuesta basal *leakage*, donde solo se usó el cambio de Ca^{2+} extracelular como estímulo.

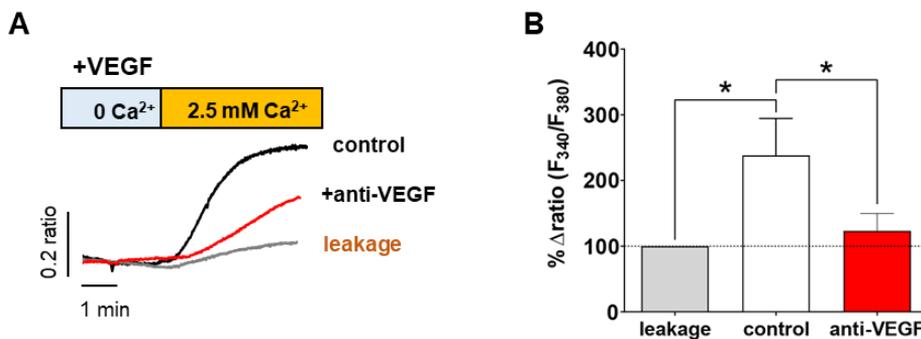


Figura 27. El factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) induce la entrada store-operated calcium entry (SOCE) en las HUVEC. **A.** Registros representativos de los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} tras la readición de Ca^{2+} inducidos por VEGF, expresado como el ratio de fluorescencia (F_{340}/F_{380}) en células incubadas con FURA2-AM. El esquema de trabajo está representado en las Figura 15A (control, línea negra) y 15B (anti-VEGF, línea roja). El trazo gris representa el registro de la entrada de Ca^{2+} de HUVEC no tratadas con VEGF (*leakage*). **B.** El gráfico de barras muestra el porcentaje de incremento del Δratio (F_{340}/F_{380}) antes y después de la adición de Ca^{2+} normalizado al *leakage* (gris, $n = 164$ células), en células tratadas con VEGF (blanco, $n = 200$ células) y en células incubadas con VEGF y anti-VEGF (rojo, $n = 255$ células). Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (*) indica una significancia con un $p < 0.05$.

3. SARAF Y ORAI1 COMO MEDIADORES CLAVE EN LA ANGIOGÉNESIS

3.1. ORAI1 PARTICIPA EN LA ENTRADA DE Ca^{2+} MEDIADA POR VEGF EN LAS HUVEC

Una vez caracterizada la movilización de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por VEGF y tomando en cuenta el efecto de GSK en los ensayos de angiogénesis, quisimos conocer la implicación de 2 proteínas claves en esta entrada de Ca^{2+} : Orai1 y SARAF. El primer paso fue comprobar la eficiencia de la inhibición de Orai1 en HUVEC mediada por siARNs (siOrai1), midiendo para ello la cantidad de expresión a nivel de ARNm de la subunidad del canal CRAC. Como podemos apreciar en la Figura 28A, se observaron diferencias significativas en la presencia de ARNm de *Orai1*, detectado mediante qPCR, entre la condición donde se silenció el canal frente al resto de condiciones de estudio (control, *scramble*). Paralelamente, se determinó si esta disminución en los niveles de ARNm de *Orai1*, se proyectaba en la cantidad de proteína final expresada. Efectivamente, cuando realizamos WB de estos cultivos de HUVEC transfectadas con diferentes siARNs (*scramble*, siOrai1, siARN de SARAF (siSARAF)), identificamos una disminución significativa de la proteína Orai1 en aquellos cultivos donde se había silenciado el canal (Figura 28B).

Comprobado el silenciamiento de Orai1, se realizaron una serie de experimentos donde se inhibió la expresión de la subunidad del canal CRAC, y se indujo la entrada de Ca^{2+} mediante VEGF. En la Figura 28C se presenta un esquema representativo de los cambios en el flujo de $[Ca^{2+}]_i$ en las condiciones experimentales estudiadas (control, *scramble*, siOrai1). Como aclaración, al igual que en el caso anterior y como en el resto de ensayos

que se presentarán, los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ se midieron usando FURA-2 como fluoróforo. Tras la incubación en una solución sin Ca^{2+} y con VEGF, al añadir Ca^{2+} al medio extracelular se observó un aumento del flujo de $[Ca^{2+}]_i$ tanto en las HUVEC control como en las HUVEC *scramble* (Figura 28C,D).

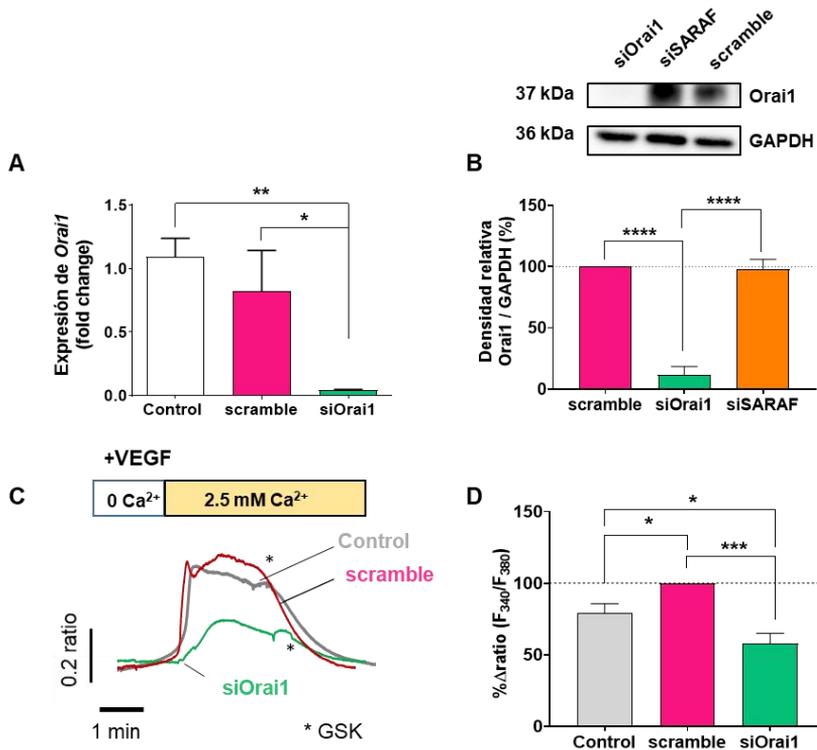


Figura 28. Papel de Orai1 en la entrada de Ca^{2+} store-operated calcium entry (SOCE) inducida por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). **A.** El gráfico de barras muestra los niveles de expresión de ARNm (fold change) de *Orai1* en HUVEC control (blanco, n = 8), y en HUVEC transfectadas con *scramble* (rosa, n = 4) y siARN *Orai1* (siOrai1, verde, n = 5). **B.** El gráfico de barras muestra los niveles de expresión de proteína (densidad relativa en relación al endógeno: GAPDH) de *Orai1* en HUVEC transfectadas con *scramble* (rosa, n = 3), siARN *Orai1* (siOrai1, verde, n = 3) y siARN SARAF (siSARAF, naranja, n = 3) y en la parte superior, los *blots* representativos de *Orai1* y GAPDH en estos cultivos. **C.** Registros representativos de los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} tras la readición de Ca^{2+} inducidos por VEGF en células control (línea gris) y transfectadas

con *scramble* (línea rosa) y siOrai1 (línea verde) expresado como el ratio de fluorescencia (F_{340}/F_{380}) en HUVEC incubadas con FURA2-AM. El esquema de trabajo está representado en la Figuras 16. **D.** El gráfico de barras muestra el porcentaje de incremento del Δ ratio (F_{340}/F_{380}) antes y después de la adición de Ca^{2+} normalizado al cultivo *scramble* (rosa, $n = 168$ células), en células control (gris, $n = 236$ células) y transfectadas con siOrai1 (verde, $n = 168$ células). Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (*), (**), (***) y (****) indican una significancia con un $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ y $p < 0.0001$, respectivamente.

En el caso de las HUVEC transfectadas con siOrai1, se detectó un descenso significativo de esta entrada de Ca^{2+} , que se evidenció a su vez con una reducción de entorno el 50% del Δ ratio en relación con el de las HUVEC *scramble* (Figura 28D). Cabe remarcar que el tratamiento con GSK en cultivos *scramble* y *control* previno del incremento de Ca^{2+} tras la readición del mismo después de la incubación con VEGF. Igualmente, como se distingue en el panel C de la Figura 28, al añadir GSK a la solución en flujo de 2.5 mM de Ca^{2+} disminuyó remarcablemente la $[Ca^{2+}]_i$, distintivo de la implicación de los canales de SOCE en esta movilización de Ca^{2+} .

3.2. SARAF ES CRUCIAL PARA LA ENTRADA DE Ca^{2+} MEDIADA POR VEGF EN LAS HUVEC

A continuación, seguimos los mismos pasos a fin de dilucidar el papel de SARAF en la entrada de Ca^{2+} mediada por VEGF en las HUVEC. Por ello, en primer lugar, se comprobó si las células transfectadas con el siARN de SARAF (siSARAF) manifestaban una disminución en la expresión a nivel de ARNm de la proteína. Como se aprecia en la Figura 29A, la transfección con siSARAF produjo una inhibición significativa de la expresión de la molécula comparada con la expresión del cultivo control y *scramble*. Seguidamente, se determinó los cambios en la $[Ca^{2+}]_i$ inducidos por VEGF en cultivos de HUVEC bajo las mismas condiciones experimentales (control, *scramble* y siSARAF). Imprevisiblemente, la reducción de SARAF provocó una

reducción significativa en la entrada de Ca^{2+} mediada por el factor de crecimiento, en comparación con los cultivos control y *scramble* (Figura 29B,C). Igualmente, se comprobó la implicación de SOCE en la entrada de Ca^{2+} añadiendo GSK al final de cada experimento, y se observó un descenso significativo de la misma tras la adición del inhibidor.

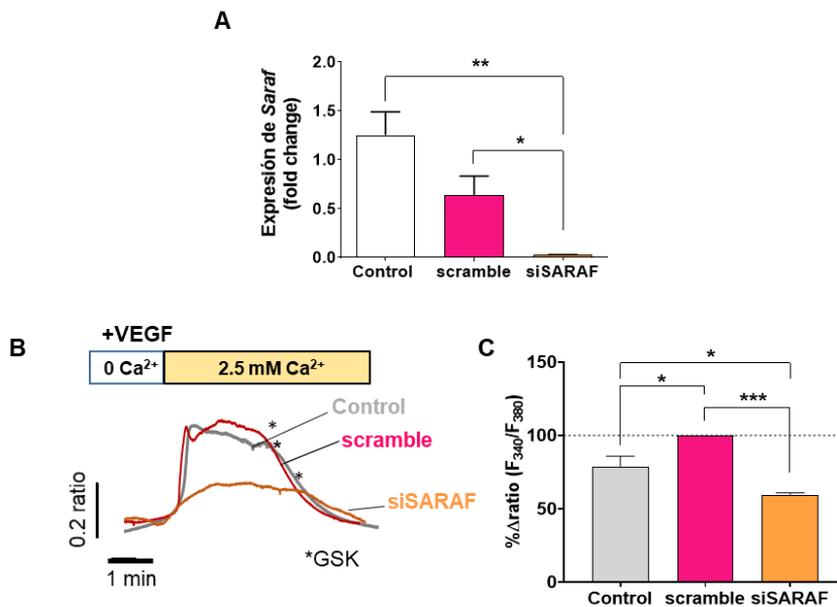


Figura 29. Rol de SARAF en la entrada de Ca^{2+} store-operated calcium entry (SOCE) inducida por el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). **A.** El gráfico de barras muestra los niveles de expresión de ARNm (fold change) de *Saraf* en HUVEC control (blanco, $n = 8$), y en HUVEC transfectadas con *scramble* (rosa, $n = 4$) y siARN SARAF (siSARAF, naranja, $n = 5$) **B.** Registros representativos de los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} tras la readición de Ca^{2+} inducidos por VEGF en células control (línea gris) y transfectadas con *scramble* (línea rosa) y siSARAF (línea naranja) expresado como el ratio de fluorescencia (F_{340}/F_{380}) en HUVEC incubadas con FURA2-AM. El esquema de trabajo está representado en la Figuras 16. **C.** El gráfico de barras muestra el porcentaje de incremento del Δ ratio (F_{340}/F_{380}) antes y después de la adición de Ca^{2+} normalizado al cultivo *scramble* (rosa, $n = 168$ células), en células control (gris, $n = 236$ células) y transfectadas con siSARAF (naranja, $n = 115$ células). Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (*), (**) y (***) indican una significancia con un $p < 0.05$, $p < 0.01$ y $p < 0.001$, respectivamente.

Por tanto, tras estos ensayos, confirmamos que la actuación de Orai1 y SARAF era imprescindible para la entrada de Ca^{2+} mediada por SOCE e inducida por VEGF en las CE.

3.3. ROL DE LAS PROTEÍNAS SARAF Y ORAI1 EN LA FORMACIÓN DE TUBOS, PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE LAS HUVEC

A raíz de los resultados obtenidos en los experimentos de angiogénesis usando GSK para estudiar la inhibición farmacológica de SOCE, se avanzó un poco más y se examinó la implicación de los canales Orai1 y SARAF en los procesos que conforman la formación de un vaso sanguíneo. En primer lugar, estudiamos el rol de las proteínas en la disposición en mallas de las HUVEC sobre Matrigel. De esta forma, aquellas HUVEC que se transfectaron con siOrai1 o siSARAF presentaron anomalías en la formación de tubos sobre la matriz en comparación con las HUVEC control/*scramble* como se distingue visualmente en la Figura 30A. Tras el análisis (Figura 30B), estas diferencias en el número de mallas percibidas en el microscopio, se hicieron significativas entre cada cultivo de HUVEC transfectadas con siOrai1 y siSARAF frente al de las HUVEC transfectadas con *scramble*, siendo esta desigualdad más sobresaliente en el caso de siOrai1. Cabe destacar que existieron diferencias entre las mallas formadas por las HUVEC control y *scramble*, debido a que el agente de transfección causaba una leve toxicidad en las HUVEC que se manifestaba mediante esta discrepancia.

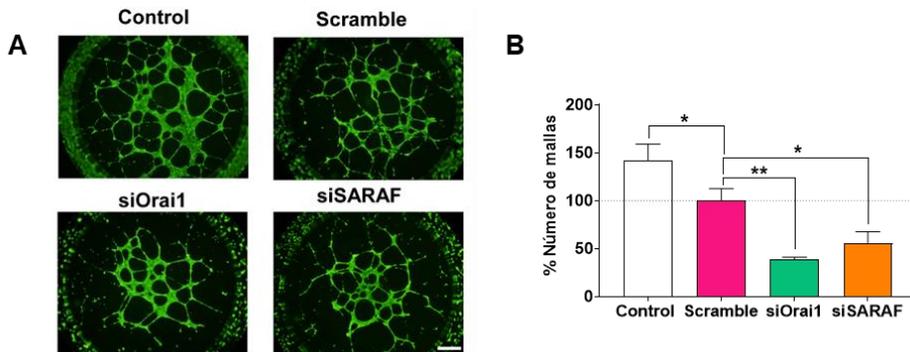


Figura 30. La inhibición mediada por siARNs de Orai y SARAF reduce la capacidad de formación de tubos de las HUVEC. **A.** Imágenes de fluorescencia (objetivo 4X, barra de escala = 500 μ m) de HUVEC (control y transfectadas con scramble, siOrai1 y siSARAF) incubadas con Calceina-AM y sembradas sobre Matrigel. **B.** El gráfico de barras muestra la media normalizada (al cultivo scramble) del porcentaje del número de mallas sobre la matriz de HUVEC control (blanco) y transfectadas con scramble (rosa), siOrai1 (verde) y siSARAF (naranja) ($n = 5 - 6$). Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (*) y (**) indican una significancia con un $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente.

Siguiendo con los procesos que configuran la generación de un nuevo vaso, se estudió el papel de Orai1 y SARAF en la proliferación de las HUVEC. Para ello, se realizó una inmunofluorescencia con Ki67 a fin de cuantificar el número de células que estaban en proceso de mitosis (Sun and Kaufman, 2018). En este caso, se intuyeron un menor número de puntos rosas (*merge* de los canales rojo: Ki67, azul: DAPI) en aquellos cultivos de HUVEC donde se bloqueó mediante silenciamiento la expresión de Orai1 y SARAF (Figura 31A). Este resultado se evidenció cuando estas imágenes se cuantificaron con ImageJ, apreciándose diferencias significativas entre el cultivo *scramble* y los cultivos siOrai1 y siSARAF por separado (Figura 31B).

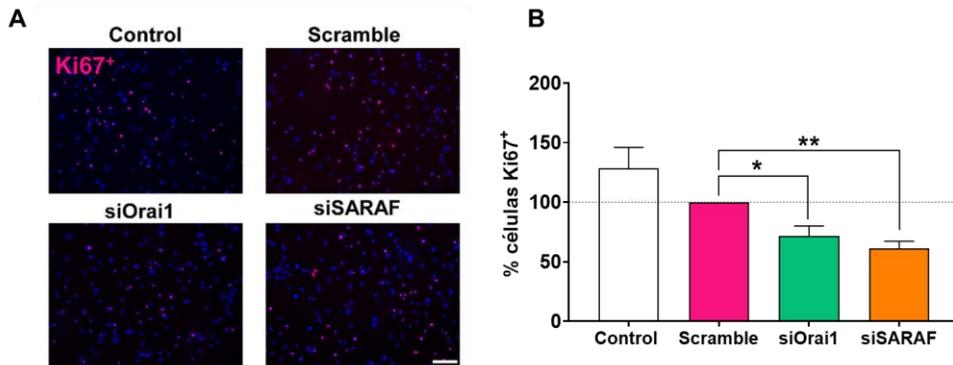


Figura 31. El bloqueo de la expresión de Orai1 y SARAF reduce la tasa de proliferación de las HUVEC. **A.** Imágenes representativas del *merge* (objetivo 20X, barra de escala = 100 μ m) de HUVEC marcadas con Ki67⁺ (canal rojo) y DAPI (canal azul) en células control y transfectadas con scramble, siOrai1 y siSARAF. **B.** El gráfico de barras muestra el porcentaje normalizado (al cultivo *scramble*) de HUVEC Ki67⁺ control (blanco) y transfectadas con scramble (rosa), siOrai1 (verde) y siSARAF (naranja) (n = 5). Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (*) y (**) indican una significancia con un $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente.

Finalmente, se comprobó si la reducción de la expresión de Orai1 y SARAF afectaba a la migración de las HUVEC *in vitro*, usando el ensayo de *wound healing*. Tras 12 h desde la generación de la herida, no se apreciaron diferencias en el área de ésta entre las diferentes condiciones experimentales (Figura 32A, B). Sin embargo, tras 24 h estas diferencias se acentuaron significativamente entre el cultivo *scramble* y los cultivos transfectados con siOrai1 y siSARAF por separado (Figura 32A, B), lo que demostró que la falta de expresión de las proteínas atenuaba la capacidad migratoria de las HUVEC.

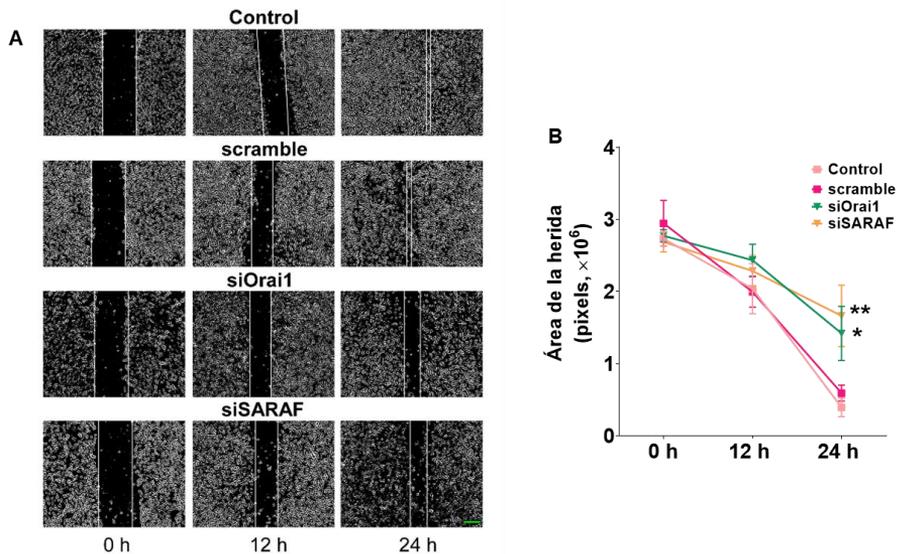


Figura 32. Orai1 y SARAF son esenciales para la migración de HUVEC en el ensayo de wound healing. **A.** Los paneles muestran imágenes de la evolución de la herida (0, 12 y 24 h) tomadas con un microscopio de contraste de fase (objetivo 10X, barra de escala verde = 200 μ m) durante el análisis con ImageJ de HUVEC control y transfectadas con *scramble*, siOrai1 y SARAF. **B.** El gráfico muestra la evolución del área de cicatrización tras el daño de los diferentes grupos de estudio ($n = 4$). Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (*) y (**) indican una significancia con un $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente.

En resumen, todos los datos anteriores demuestran que Orai1 y SARAF son necesarios para la correcta disposición en tubo, proliferación y migración de las HUVEC y, por consiguiente, para la angiogénesis.

3.4. ORAI1 Y SARAF COLOCALIZAN EN LAS HUVEC

Dado que los resultados anteriores sugirieron una coactivación de Orai1 y SARAF en el proceso de angiogénesis, decidimos examinar la localización endógena de estas proteínas en las HUVEC mediante dos técnicas. Primero, a través de inmunofluorescencia clásica, pudimos dilucidar que ambas proteínas se distribuían uniformemente en las HUVEC

(Figura 33A). Tras realizar el *merge* de ambas imágenes, se consiguió un coeficiente de correlación de Pearson (PCC) de 0.83 ± 0.03 ($n = 5$), lo que apuntaba a una colocalización de las proteínas en HUVEC.

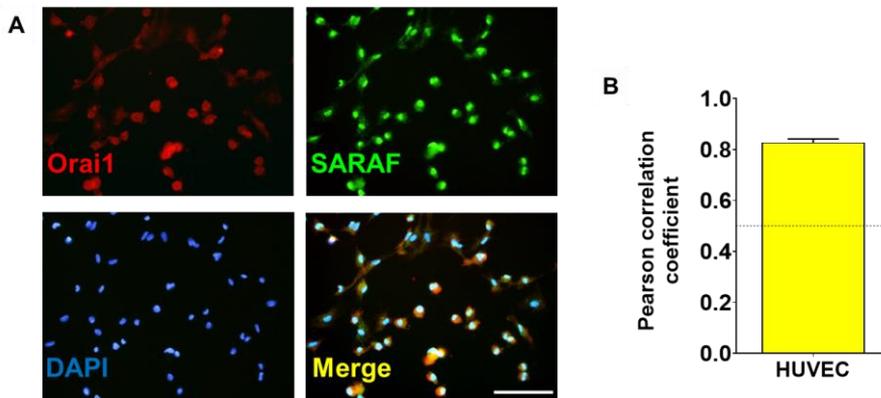


Figura 33. SARAF y Orai1 colocalizan en las HUVEC. A. Imágenes representativas de inmunofluorescencia (objetivo 40X, barra de escala = 100 μm) usando anticuerpos específicos muestran la localización de SARAF (verde) y Orai1 (rojo) en HUVEC. El canal azul corresponde al DAPI. El *merge* de ambas imágenes muestra una posible colocalización de SARAF y Orai1 en puntos de color amarillo. B. El gráfico de barra representa el coeficiente de correlación de Pearson (PCC) para el *merge* de los canales rojo (Orai1) y SARAF (verde).

Por otra parte, a través de la técnica de Proximity Ligation Assay (PLA), explicada con mayor detalle en el apartado de *Materiales y métodos*, determinamos la presencia de 644 puntos rojos (señal de colocalización) en 165 HUVEC incubadas con los anticuerpos primarios de SARAF y Orai1 (Figura 34A), lo que revelaba una posible interacción entre las proteínas, al estar situadas a una distancia menor de <40 nm. Como comprobación de la técnica, en la Figura 34B podemos apreciar que no existe señal roja cuando únicamente añadimos uno de los anticuerpos primarios, en este caso, anti-Orai1.

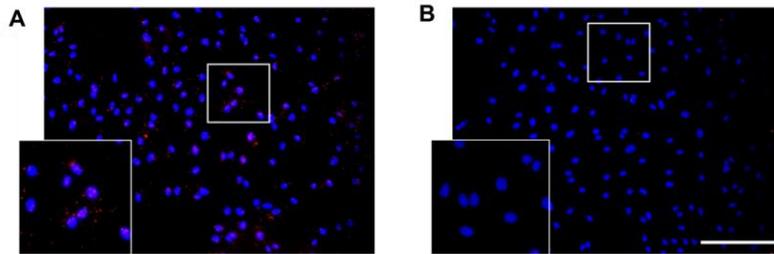


Figura 34. SARAF y Orai1 colocalizan en las HUVEC (II). A,B. Imágenes representativas de fluorescencia (objetivo 20X, barra de escala = 100 μ m) en HUVEC usando anticuerpos primarios de Orai1 y SARAF (A: ambos, B: solo Orai1) conjugados con las sondas de *proximity ligation assay* (PLA). El cuadrado inferior es un zoom de las imágenes originales. Los puntos rojos indican que las proteínas se encuentran a una distancia menor a 40 nm. Las HUVEC se cultivaron con medio EGM-2 (ver *Materiales y Métodos*) enriquecido con factores de crecimiento. Los núcleos se muestran en azul (DAPI).

4. ANGIOGÉNESIS POST-ISQUÉMICA

Una vez caracterizado el papel de SOCE en la angiogénesis, examinada a nivel básico usando diferentes modelos, pusimos el foco en conocer la relación de SOCE con la angiogénesis que se produce tras un IAM. Además, con el fin de estudiarla desde una perspectiva translacional, usamos, como estímulo angiogénico, suero de pacientes que habían padecido un **IAM con elevación del segmento ST (STEMI) tras 6 h de haber reperfundido la arteria mediante ACTP**, como se describe en los ensayos que aparecen a continuación.

4.1. ESTUDIO DE CITOQUINAS EN EL SUERO DE LOS PACIENTES STEMI

A fin de estudiar los mediadores circulantes que pudiesen desencadenar el proceso angiogénico de las CE del corazón, se cuantificó diferentes citoquinas, factores de crecimiento y quimioquinas inflamatorias

en el suero de un grupo de pacientes antes y después de la ACTP mediante un kit de ensayo de Bioplex™ (del Toro et al., 2022). En dicho ensayo, encontramos unos niveles elevados de VEGF-A, IL-17A y TNF- α en pacientes STEMI que 6 meses más tarde desarrollaron remodelado adverso del corazón, etapa previa a la insuficiencia cardíaca.

A partir de esta primera criba, decidimos confirmar la concentración de estos tres marcadores (VEGF-A, IL-17A y TNF- α) mediante ELISA en el suero de voluntarios controles y de los pacientes STEMI. Como se observa en la Figura 35A,B, la cuantificación reveló que VEGF-A y IL-17A estaban significativamente incrementadas en el suero de los pacientes STEMI frente a los controles, no habiendo diferencias para el TNF- α (Figura 35C).

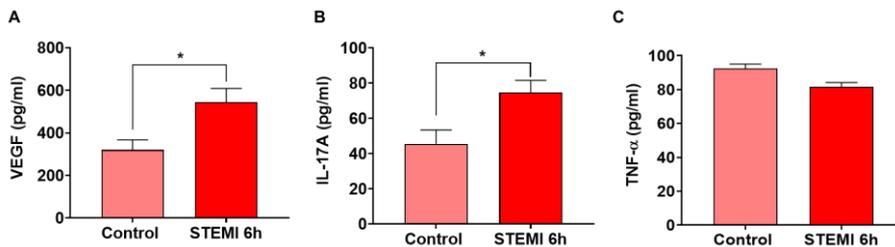


Figura 35. El suero de los pacientes isquémicos tras la angioplastia posee mayor cantidad de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) e interleuquina 17A (IL-17A). Los gráficos en barras muestran la cantidad (pg/ml) de VEGF (A) y IL-17A (B) y TNF- α (C) en el suero de controles sanos (rosa, n = 14) y pacientes STEMI reperfundidos (rojo, n = 29). Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (*) indica una significancia con un $p < 0.05$.

4.2. EL SUERO ISQUÉMICO INDUCE MAYOR FORMACIÓN DE TUBOS

Con objeto de caracterizar la angiogénesis que sucede tras un infarto de miocardio o post-isquémica, en primer lugar, se realizó el ensayo de formación de tubos de las HUVEC. De este modo, las HUVEC se sembraron sobre Matrigel y se estimularon con suero de controles sanos y

pacientes STEMI reperfundidos. El primer paso fue poner a punto la concentración de suero idónea para obtener un mayor número de mallas sobre la matriz. Tras el ensayo, pudimos comprobar que el 2.5% se presentó como la concentración óptima para el estudio de tubos *in vitro* frente a un 5 y un 10% de suero, donde las HUVEC se polarizaban hacia una mayor proliferación y una menor formación de mallas. Durante el desarrollo del estudio con el 2.5% de suero, se pudo comprobar que las HUVEC eran capaces de formar un mayor número de mallas cuando se añadía al medio EBM-2 con suero isquémico de paciente frente a cuando se añadía con suero de paciente control (Figura 36A,B).

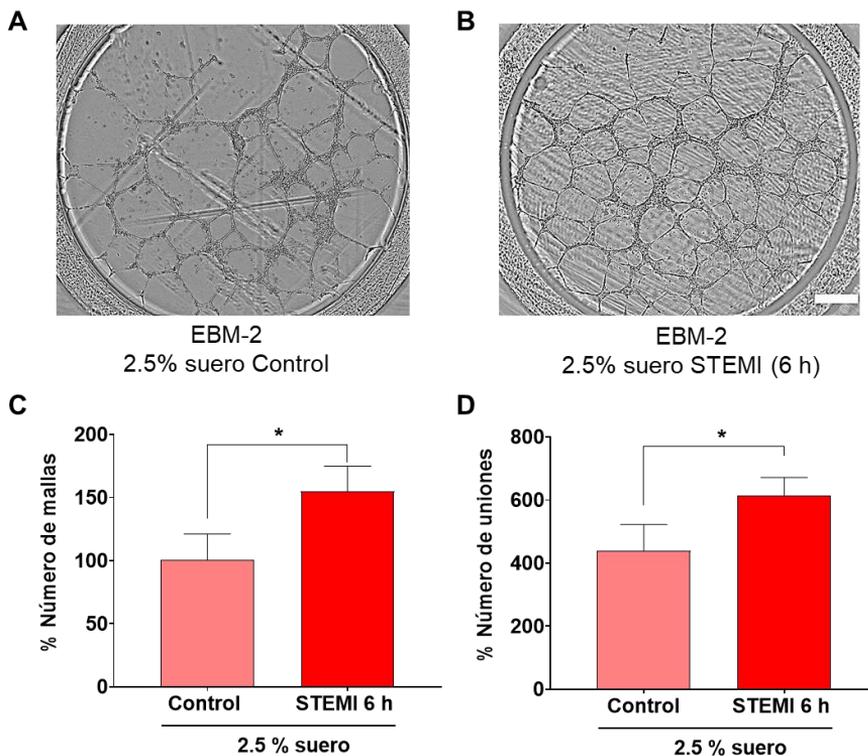


Figura 36. El suero de pacientes con STEMI estimula la formación de tubos en las HUVEC. A,B. Imágenes de contraste (objetivo 4X, barra de escala = 500 μ m) de

HUVEC sembradas sobre Matrigel y tratadas con un 2.5% de suero de pacientes control (A) y pacientes STEMI reperfundidos (B). C,D. Los gráficos de barras muestran la media normalizada (al cultivo estimulado con suero de paciente control) del porcentaje del número de mallas (C) y del número de uniones intercelulares sobre la matriz (D) de HUVEC tratadas con 2.5% de suero de controles sanos (rosa) y pacientes STEMI (rojo) (n = 5-6). Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (*) indica una significancia con un $p < 0.05$.

Esta hipótesis se confirmó tras el análisis, comprobándose que existían diferencias significativas en el número de mallas, así como en el número de uniones celulares, entre las HUVEC que habían sido estimuladas con suero de pacientes STEMI comparadas con las que se les añadió suero de los participantes control (Figura 36C,D).

A continuación, se repitió el ensayo usando el suero de ratas control *sham* u operadas de I/R, obtenido tras 24 h de la intervención. Antes de comenzar, se comprobó que el 5% de concentración de suero de ambos grupos de ratas proporcionaba un mayor número de tubos *in vitro*, frente al 10% y al 20% que parecían tener, en este caso, un efecto inhibitorio sobre la formación de tubos de las HUVEC. Por ello, se escogió este porcentaje para realizar el resto de los ensayos de estimulación de HUVEC con suero de rata. En la misma línea de resultados obtenidos para el suero de pacientes, la presencia de suero isquémico de rata promovió un mayor número de uniones intercelulares y de mallas sobre el Matrigel (Figura 37A-D).

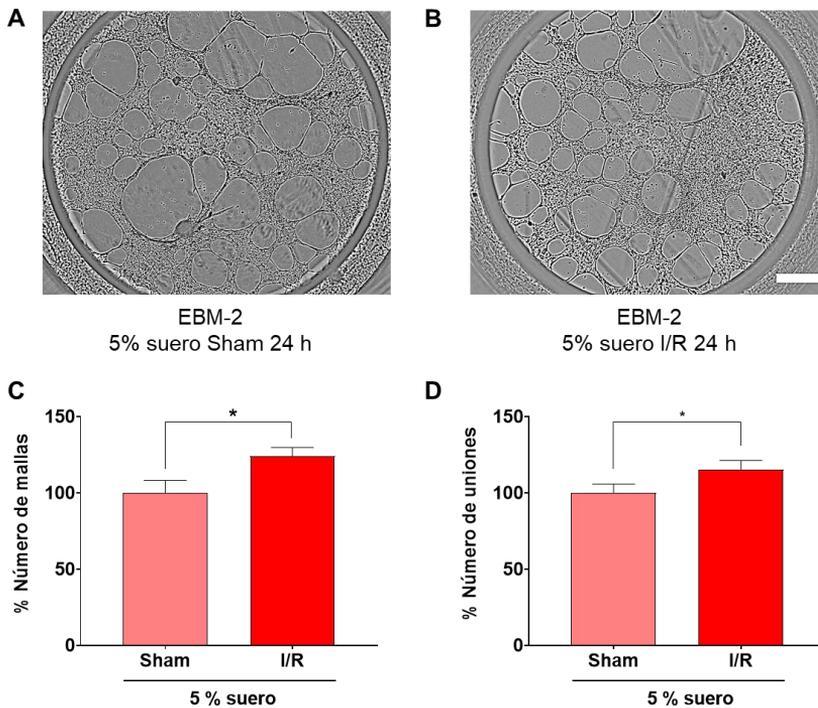


Figura 37. El suero de rata operada de isquemia/reperfusión (I/R) promueve la disposición en tubo en las HUVEC. **A,B.** Imágenes de contraste (objetivo 4X, barra de escala = 500 μ m), de HUVEC tratadas con un 5% de suero de rata tras 24 h de la intervención *sham* (**A**) e I/R (**B**) y sembradas sobre Matrigel. **C,D.** Los gráficos de barras muestran la media normalizada (al cultivo estimulado con suero de rata *sham*) del porcentaje del número de mallas (**C**) y del número de uniones intercelulares sobre la matriz (**D**) de HUVEC tratadas con 5% de suero de rata *sham* (rosa) e I/R (rojo) ($n = 5-6$). Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (*) indica una significancia con un $p < 0.05$.

4.3. EL SUERO ISQUÉMICO PROMUEVE LA MIGRACIÓN DE LAS HUVEC

A continuación, se comprobó si el suero de pacientes estimulaba la migración de las HUVEC usando el ensayo de cierre de herida conocido como *wound healing*. De este modo, se estudió cómo afectaba la adición de suero isquémico proveniente de pacientes STEMI, frente al suero de

pacientes control. Como podemos observar en la Figura 38A, a las 24 y a las 32 h, se evidencian las discrepancias en la velocidad de cierre de la herida entre los dos tipos de suero utilizados. Al cuantificar el área de cicatrización, estas diferencias se confirmaron y se comprobó que eran significativas para ambos puntos temporales entre los dos grupos de estudio (Figura 38B,C).

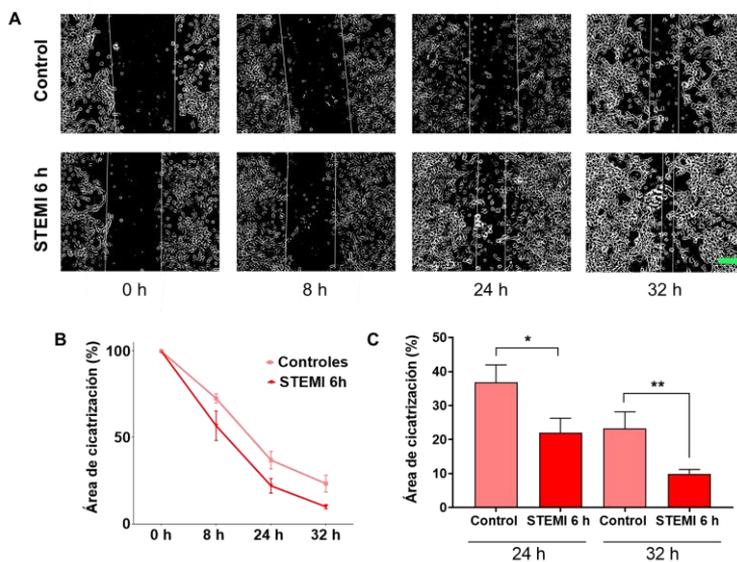


Figura 38. El suero post-isquémico de humano acelera la cicatrización de la herida en el ensayo de *wound healing*. **A.** Los paneles muestran imágenes de la evolución de la herida (0, 8, 24 y 32 h) tomadas con un microscopio de contraste de fase (objetivo 10X, barra de escala verde = 200 μm) de HUVEC tratadas con 2.5% de suero de pacientes control (arriba) y pacientes con STEMI (abajo). **B.** El gráfico muestra la evolución del área de cicatrización en los dos grupos de estudio. **C.** El gráfico de barras presenta el porcentaje del área de cicatrización respecto al momento inicial de la herida (0 h) a las 24 y a las 32 h de HUVEC tratadas con suero de paciente control (rosa) y STEMI (rojo) (n = 5-8). Los valores se presentan como la media ± S.E.M. (*) y (**) indican una significancia con un $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente.

Paralelamente, se estudió la respuesta migratoria de las HUVEC al añadir suero de rata operada *sham* e I/R. De nuevo, como se puede percibir

en el panel A de la Figura 39, a las 24 y 32 h, las HUVEC que se trataron con suero de rata *sham* sufrieron un retraso considerable en la cicatrización de la herida comparadas con las células que fueron tratadas con suero de rata I/R. Así, el análisis de imágenes determinó diferencias estadísticamente significativas en el espacio de la herida a las 24 h entre ambas condiciones (Figura 39B,C). De este modo, ambos ensayos de cicatrización corroboraban que los factores presentes en el suero estimulan la migración de las HUVEC.

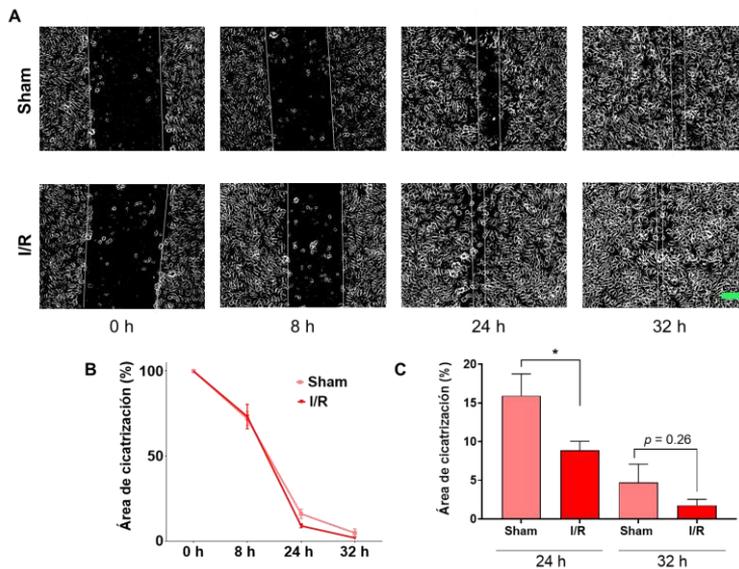


Figura 39. El suero post-isquémico de rata acelera la cicatrización de la herida en el ensayo de *wound healing*. **A.** Los paneles muestran imágenes de la evolución de la herida (0, 8, 24 y 32 h) tomadas con un microscopio de contraste de fase (objetivo 10X, barra de escala verde = 200 μm) de HUVEC tratadas con 5% de suero de ratas tras 24 h de haber sido operadas *sham* (arriba) y de isquemia/reperfusión (I/R) (abajo). **B.** El gráfico muestra la evolución del área de cicatrización tras el daño de los dos grupos de estudio. **C.** El gráfico de barras presenta el porcentaje del área de cicatrización respecto al momento inicial de la herida (0 h) a las 24 y a las 32 h de HUVEC tratadas con suero de rata *sham* (rosa) e I/R (rojo) (n = 4-5). Los valores se presentan como la media ± S.E.M. (*) indica una significancia con un $p < 0.05$.

4.4. EL SUERO DE PACIENTE TRAS INFARTO DE MIOCARDIO ESTIMULA LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS TIP EN EL MODELO DE ANGIOGÉNESIS EN 3D

De forma novedosa, se probó el efecto de estimular a las HUVEC dispuestas en estructura en vaso en cultivo 3D con perfusión usando las placas OrganoPlate® y el sistema OrganoFlow® de Mimetas. Una vez conformado el cilindro celular, y estando delimitados los compartimentos por un gel de colágeno, se añadió en la parte contraria de la matriz medio basal con 2.5% de suero en los días 0-5, 5% de suero en los días 5-7 y 10% de suero en los días 7-10, tanto de paciente STEMI como de paciente control. En la Figura 40A, se muestran imágenes representativas de células tratadas con suero control (panel superior) e isquémico (panel inferior).

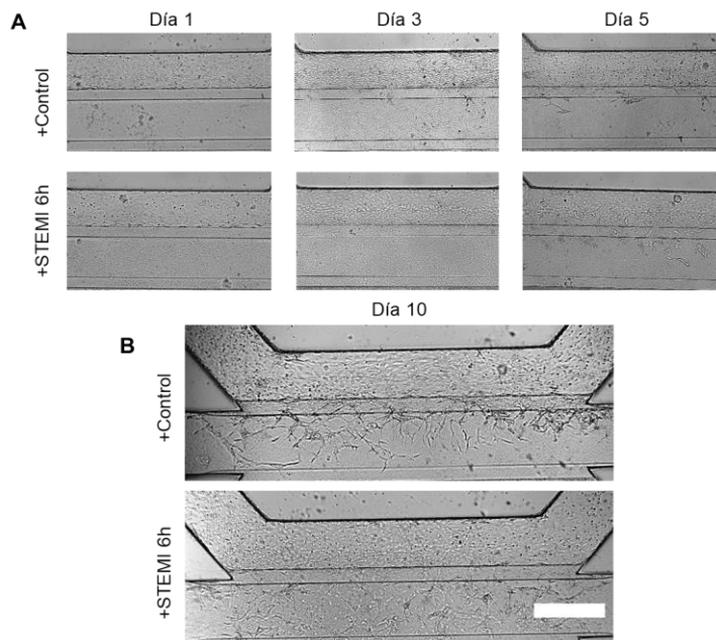


Figura 40. El suero post-isquémico de paciente acelera la migración de las células *tip* en el ensayo de angiogénesis en 3D. A, B. Los paneles muestran imágenes

representativas, en los días 1,3, 5 (A) y 10 (B) de ensayo, de la evolución de la infiltración de las HUVEC, situadas en el canal superior dispuestas en tubo mimetizando un vaso *in vitro*, atraídas por el suero de paciente control (paneles de arriba) e isquémico (abajo). Objetivo 10X, barra de escala = 200 μm .

Como se puede apreciar, durante los primeros días tras la adición del suero no se identificaron diferencias destacables en el número de células con características propias del fenotipo *tip* en la matriz entre ambos grupos de pacientes. Sin embargo, tras 10 días de tratamiento, se observa cómo las HUVEC que conforman la estructura del vaso avanzan conformando filopodios que se polarizan hacia el pocillo que contiene suero isquémico, siendo capaces de atravesar por completo el colágeno en busca del estímulo angiogénico (Figura 40B).

4.5. EL SUERO ISQUÉMICO NO AFECTA A LA PROLIFERACIÓN DE LAS HUVEC

Siguiendo con los pasos fundamentales para la formación de un vaso sanguíneo se examinó si el suero isquémico, aceleraba la tasa de proliferación de las HUVEC en cultivo usando, para ello, el ensayo de marcaje de Ki67⁺ mediante inmunofluorescencia. Como se aprecia en la Figura 41A, aparentemente no se denotaron diferencias en el número de puntos rosas tras realizar el *merge* del canal rojo (Ki67) y el azul (DAPI) entre las HUVEC tratadas con suero control y suero isquémico de paciente. Tras analizar el número de células por cada imagen tomada a 20X en cubres cuya densidad de siembra celular fue idéntica, se observó un descenso significativo en el número de células que permanecían en el cubre tras 24 h del tratamiento isquémico (Figura 41B). Sin embargo, resulta curioso que al normalizar el número de células Ki67⁺ al número de células totales en el

cuadre, no se identificaron diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (Figura 41C).

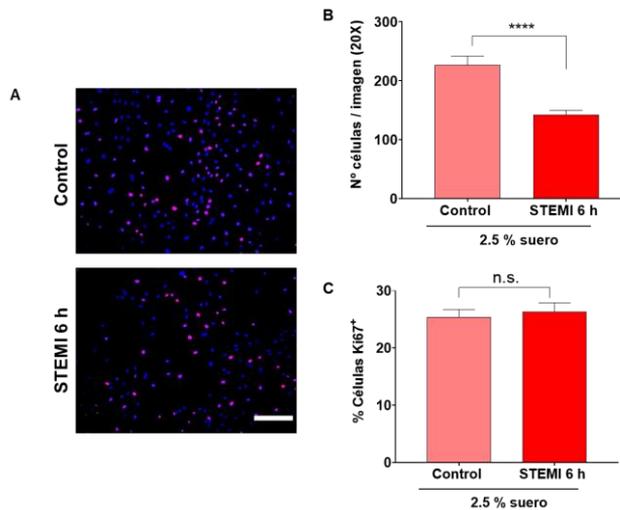


Figura 41. El suero isquémico de paciente reduce el número de células, pero no la proliferación de las HUVEC. A. Imágenes representativas del *merge* (objetivo 20X, barra de escala = 50 μ m) de fotografías de HUVEC marcadas con Ki67⁺ (canal rojo) y DAPI (canal azul) en células tratadas con 2.5% de suero de paciente control (arriba) y paciente STEMI (abajo). **B,C.** Los gráficos de barras muestran el número total de células por imagen (**B**) y el porcentaje de células Ki67⁺ respecto al número total de células por imagen (**C**) de HUVEC tratadas con el suero de ambos grupos experimentales (rosa: control, rojo: STEMI 6h) (n = 5). Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (****) indica una significancia con un $p < 0.0001$.

4.6. EL SUERO DE PACIENTES STEMI EXACERBA EL INFLUJO DE Ca²⁺ INDUCIDA POR EL VACIADO DE LOS RESERVORIO

En base a los resultados obtenidos en los ensayos de angiogénesis *in vitro* en HUVEC estimuladas con suero de pacientes con STEMI y habiendo demostrado anteriormente que la movilización de Ca²⁺ es fundamental para este proceso, nos cuestionamos si el tratamiento con el suero isquémico alteraba la entrada de Ca²⁺ en las CE. Por ello, tratamos las HUVEC durante 48 h con suero isquémico y control y estudiamos la

respuesta al cambio de Ca^{2+} extracelular, usando tapsigargina para inducir SOCE. Como se distingue en la Figura 42A, las HUVEC pretratadas con suero isquémico mostraron un remarcable aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras la readición de Ca^{2+} en comparación con las células que habían sido incubadas con suero de paciente control. Igualmente, estas diferencias se evidenciaron al cuantificar el porcentaje de cambio del Δratio (F_{340}/F_{380}), siendo significativas entre los dos grupos de estudio (Figura 42B).

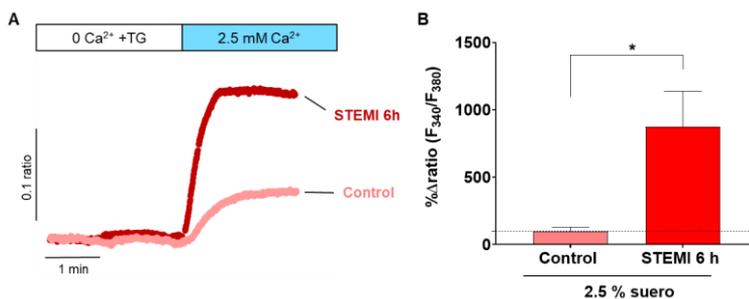


Figura 42. Las HUVEC pretratadas con suero isquémico de paciente presentan mayor entrada de Ca^{2+} que las tratadas con suero control. **A.** Registros representativos de los cambios en la concentración intracelular de Ca^{2+} tras la readición de Ca^{2+} inducidos por la incubación con tapsigargina en HUVEC tratadas con suero control (línea rosa) y las tratadas con suero isquémico (línea roja) expresado como el ratio de fluorescencia (F_{340}/F_{380}). **D.** El gráfico de barras muestra el porcentaje de incremento del Δratio (F_{340}/F_{380}) antes y después de la adición de Ca^{2+} normalizado al cultivo tratado con suero control (rosa, $n = 164$ células) y suero isquémico (rojo, $n = 198$ células). Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (*) indica una significancia con un $p < 0.05$.

Dado el aumento significativo de SOCE tras la incubación de las HUVEC con suero de pacientes isquémicos, nos propusimos analizar la expresión génica de Orai1 bajo las mismas condiciones. En consonancia con el aumento en la entrada de Ca^{2+} en las células pretratadas con suero isquémico, se observó un aumento significativo en la expresión de Orai1 en estas células, en comparación con las células tratadas con suero control (Figura 43).

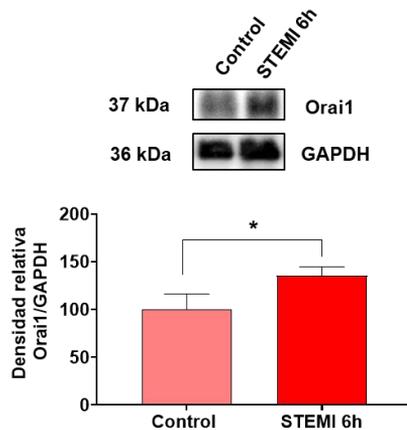


Figura 43. La incubación con suero isquémico de paciente incrementa la expresión Orai1 tras 48 h. La parte superior muestra los *blots* representativos de Orai1 y de GAPDH en cultivos de HUVEC tratadas con suero control y suero isquémico (STEMI 6h). En la parte de abajo se muestra el gráfico de barras de los niveles de expresión de Orai1 (densidad relativa en relación al endógeno: GAPDH) en HUVEC tratadas con suero control (rosa, n = 4) y suero isquémico (STEMI 6h, rojo, n = 5). Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (*) indica una significancia con un $p < 0.05$.

5. PAPEL DE ORAI1 EN LA ANGIOGÉNESIS POST-ISQUÉMICA

5.1. ORAI1 ES CRUCIAL PARA LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS TIP

A continuación, se quiso comprobar si el bloqueo de Orai1 afectaba a la posterior activación de las rutas desencadenadas por el tratamiento con suero isquémico y, con ello, a la angiogénesis. A tal efecto, Orai1 se silenció en las HUVEC usando siARNs, las células se estimularon durante 24 h con suero de paciente isquémico o control y se confirmó el potente efecto del silenciamiento de Orai1 sobre su expresión en ambas condiciones experimentales (Figura 44A).

Seguidamente, se realizó el mismo ensayo de la migración de las células *tip* en cultivo 3D de HUVEC en las placas OrganoPlate® descrito

previamente, en este caso, inhibiendo la expresión de *Orai1* en las HUVEC, usando siARNs, antes de ser sembradas sobre la placa, es decir, en el pocillo donde se formaba el “vaso”, como se muestra en la Figura 44B,C.

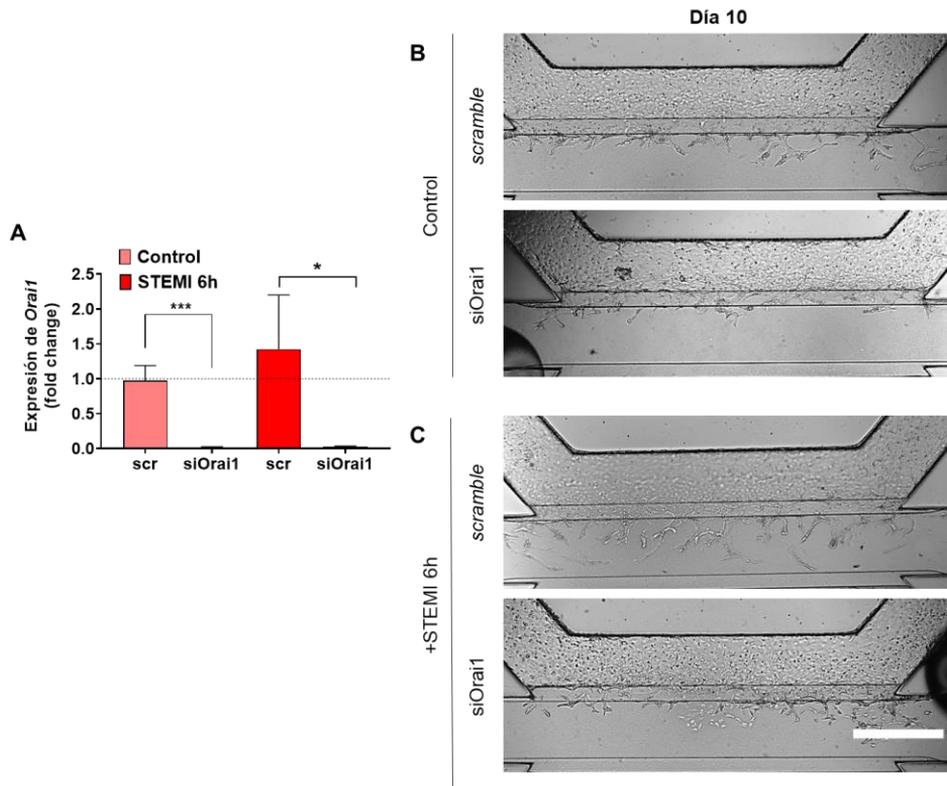


Figura 44. El bloqueo de *Orai1* previene la migración de las células *tip* tras la adición de suero isquémico de paciente en el ensayo de angiogénesis en 3D. **A.** El gráfico de barras muestra los niveles de expresión de ARNm (fold change) de *Orai1* en HUVEC transfectadas con *scramble* y siOrai1 tratadas con suero de pacientes control (rosa, n = 4) e isquémicos (STEMI 6h; rojo, n = 6 **B,C.** Los paneles muestran imágenes representativas, en el día 10 de ensayo de la infiltración de las HUVEC transfectadas con *scramble* (panel de arriba) o siOrai1 (panel de abajo), situadas en el canal superior dispuestas en tubo mimetizando un vaso *in vitro*, atraídas por el suero de paciente control (**B**) e isquémico (**C**). Objetivo 10X, barra de escala verde = 200 μ m. Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (*) y (***) indican una significancia con un $p < 0.05$ y $p < 0.001$, respectivamente.

En la figura superior, se muestran imágenes representativas de HUVEC transfectadas con *scramble* y siOrai1 tratadas con suero de control

(Figura 44A) e isquémico (Figura 44B). En relación a los *scramble*, al igual que en el caso anterior (Figura 40), la presencia de suero isquémico atrajo un mayor número de células *tip* que frente al suero control (Figura 44A,B). Conforme a los cultivos transfectados con siOrai1 (paneles inferiores de la Figura 44A,B), presentaron una considerable inhibición en la migración de las HUVEC en el gel, independientemente del suero con el que fueran estimulados.

En el punto final del experimento, se realizó una inmunofluorescencia a fin de localizar la expresión de Orai1. Como se muestra en las imágenes representativas presentadas en la Figura 45, encontramos señal del canal en la zona periférica de los conglomerados de HUVEC, correspondiente al fenotipo *tip* de CE.

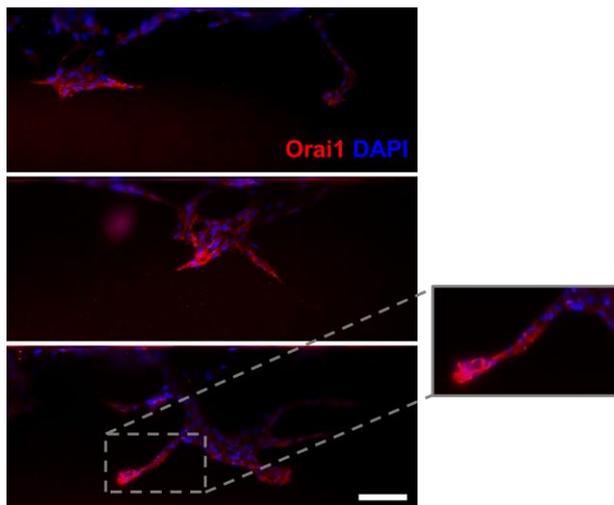


Figura 45. Mayor presencia de Orai1 en el frente de migración de las células *tip* en cultivo. Los paneles muestran 3 imágenes representativas en el día 10 de ensayo del marcaje de Orai1 (canal rojo) y DAPI (canal azul) en HUVEC que han migrado hacia el estímulo isquémico desde el canal superior donde se encontraban dispuestas en tubo mimetizando un vaso *in vitro* (recorte de objetivo 10X, barra de escala = 200 μm).

5.2. ORAI1 MEDIA LA ACTIVACIÓN DE MEF2A INDUCIDA POR EL SUERO ISQUÉMICO EN LAS HUVEC

Tras comprobar cómo la presencia del suero isquémico afectaba a la fisiología de las HUVEC, se estudió si este cambio a nivel funcional se veía reflejado a nivel de activación de algún factor de transcripción importante para la fisiología celular, como MEF2 (Liu et al., 2019). Por ello, se examinó la activación de MEF2A mediante inmunofluorescencia en HUVEC tratadas con suero isquémico y control. En la Figura 46A se muestran imágenes representativas de HUVEC transfectadas con *scramble* (izquierda) tras 24 h de la adición de suero de ambos grupos experimentales. Como se puede apreciar, la estimulación con suero isquémico de paciente proporcionó mayor intensidad de señal que la estimulación con suero de paciente control, como además se exhibe mediante diferencias significativas tras el análisis (Figura 46B).

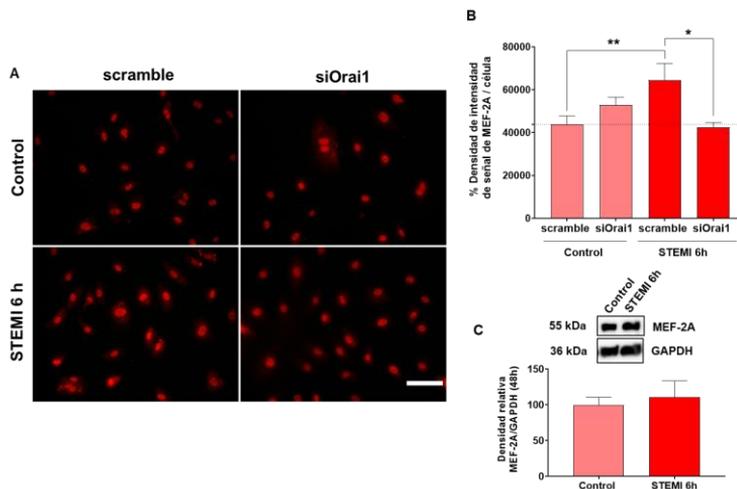


Figura 46. El silenciamiento de Orai1 previene la activación de MEF2A inducida por suero isquémico en HUVEC. A. Imágenes representativas (objetivo 40X, barra de escala = 25 μ m) de HUVEC transfectadas con *scramble* (izquierda) y siOrai1

(derecha) marcadas con MEF2-A (canal rojo) en células tratadas con 2.5% de suero de paciente control (arriba) y paciente STEMI 6h post-ACTP (abajo). **B.** El gráfico de barras muestra el porcentaje de densidad de intensidad de señal de MEF2A por célula en HUVEC transfectadas con *scramble* y siOrai1 tratadas con el suero de ambos grupos experimentales (rosa: control, n = 3; rojo: STEMI 6h, n = 3). **C.** El gráfico de barras muestra los niveles de expresión de MEF2A (densidad relativa en relación al endógeno: GAPDH) en HUVEC tras 48 h de la adición de suero control (rosa, n = 4) y suero isquémico (STEMI 6h, rojo, n = 4-5) y en la parte superior, los *blots* representativos de MEF2A y GAPDH en estos cultivos. Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (*) y (**) indican una significancia con un $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente.

Posteriormente, se repitió el mismo ensayo silenciando Orai1 antes de añadir el suero de paciente. En este caso, encontramos que la transfección con siOrai1 bloqueó significativamente la activación de MEF2A tras la adición de suero isquémico, y no se percibieron diferencias notables entre los dos grupos de pacientes bajo estas condiciones (Figura 46A,B). Igualmente, se estudió la expresión del factor MEF2A mediante WB en HUVEC tratadas con suero isquémico y control durante 48 h (Figura 46C), pero no se detectaron diferencias remarcables entre los grupos.

5.3. ORAI1 Y OTRAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPORTANTES PARA LA ANGIOGÉNESIS POST-ISQUÉMICA: NOTCH1 Y VEGF

Siguiendo con el efecto del suero isquémico sobre la modulación génica y a nivel transcripcional de las HUVEC, se estudió la posible relación entre este estímulo y la vía de Notch1. Primeramente, se recogieron las proteínas de los cultivos de HUVEC tras 2 h del tratamiento con el suero de ambos grupos de pacientes y se examinó la expresión del dominio de la región intracelular de Notch1 (NICD). Como se muestra en la Figura 47A, no se apreciaron diferencias significativas en la densidad de banda de la región intracelular de Notch1 entre las células tratadas con los dos tipos de suero.

A continuación, se comprobó lo mismo a nivel de expresión de ARNm de diferentes marcadores de la vía de Notch1 en HUVEC transfectadas con *scramble* y tratadas con los dos tipos de suero. Como se aprecian en los paneles B, C y D de la Figura 47, observamos cómo entre las HUVEC tratadas con suero paciente control y STEMI no existieron diferencias significativas en la expresión del receptor de *Notch1*, *Hes1* y *Hey1*, pero los niveles de ARNm de *Notch1* parecieron ser tendentemente más altos en las células tratadas con suero isquémico. Paralelamente, se comprobó la expresión de estos mismos marcadores en HUVEC transfectadas con siOrai1. En este caso, en presencia de suero isquémico, el silenciamiento de Orai1 provocó una disminución, aunque no significativa, de la expresión de *Notch1* y *Hey1*, y significativa para la expresión de *Hes1* (Figura 47B-D), lo que apuntaba a una posible dependencia de Orai1 en las HUVEC para la expresión de marcadores de la vía de Notch1.

En base a la similitud en la tendencia de las gráficas con lo obtenido para la expresión de Orai1 (Figura 44A), enfrentamos la expresión de *Notch1*, *Hes1* y *Hey1* de forma independiente con la de *Orai1* y detectamos que existía una correlación lineal con un valor de r por encima de 0.5 ($r = 0.9755$; $r = 0.6559$ y $r = 0.7894$, respectivamente) y notablemente significativa entre las proteínas *Notch1* y *Hey* con *Orai1* (Figura 47E-G).

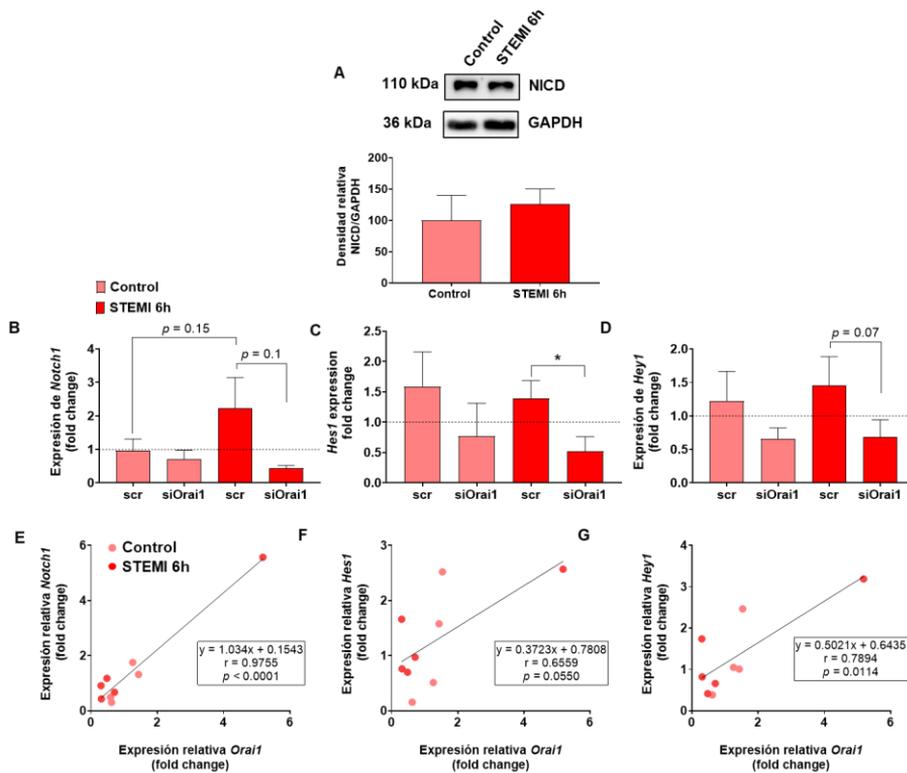


Figura 47. El silenciamiento de *Orai1* condiciona la expresión de *Notch1*, *Hes1* y *Hey1* en HUVEC tratadas con suero isquémico de paciente. **A.** El gráfico de barras muestra los niveles de expresión de proteína (densidad relativa en relación al endógeno: GAPDH) de NICD en HUVEC tratadas con suero control (rosa, $n = 4$) y suero isquémico (STEMI 6h, rojo, $n = 4$) y en la parte superior, los *blots* representativos de NICD y GAPDH en estos cultivos **B-D.** Los gráficos de barras muestran los niveles de expresión de ARNm (fold change) de *Notch1* (**B**), *Hes1* (**C**) y *Hey1* (**D**) en HUVEC transfectadas con *scramble* y siOrai1 tratadas con suero de pacientes control (rosa, $n = 4$) e isquémicos (STEMI 6h; rojo, $n = 6$). **E-G.** Curvas de correlación lineal donde se enfrentan la expresión relativa de *Notch1* (**E**), *Hes1* (**F**) y *Hey1* (**G**) con la de *Orai1* en HUVEC tratadas con suero isquémico HUVEC tratadas con suero de pacientes control (rosa, $n = 4$) e isquémicos (rojo, $n = 6$). Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (*) indica una significancia con un $p < 0.05$.

Dada la estrecha relación existente entre la expresión de *Orai1* y *Notch1* tras 24 h de la adición de suero de paciente, cambiamos el escenario y estudiamos cómo afectaba la disminución de la expresión del receptor

Notch1 sobre la expresión de *Orai1*. En primer lugar, encontramos una potente inhibición del siARN de *Notch1* (siNotch1) tras 24 h de la transfección con el mismo en las HUVEC (Figura 48A). Comprobado esto, observamos que, pese a que no ocurre lo mismo cuando se añade suero control, el silenciamiento de *Notch1* previene la expresión de *Orai1* tras la adición de suero isquémico de paciente (Figura 48B).

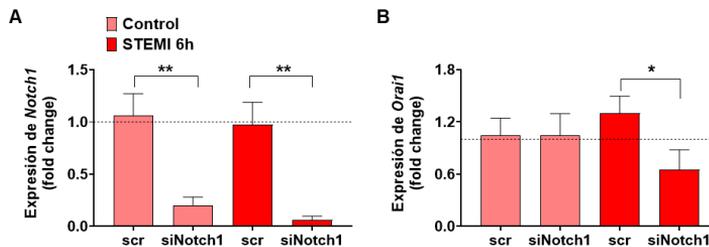


Figura 48. El silenciamiento de *Notch1* previene la expresión de *Orai1* en HUVEC tratadas con suero isquémico de paciente. A,B. Los gráficos de barras muestran los niveles de expresión de ARNm (fold change) de *Notch1* (A) y *Orai1* (B) en HUVEC transfectadas con *scramble* y siOrai1 tratadas con suero de pacientes control (rosa, n = 3) e isquémicos (STEMI 6h; rojo, n = 3). Los valores se presentan como la media \pm S.E.M. (*) y (**) indican una significancia con un $p < 0.05$ y $p < 0.01$, respectivamente.

Finalmente, se estudió la ruta desencadenada por el factor de crecimiento VEGF. En este caso, se comprobó que no existían diferencias a nivel de expresión de proteína del receptor VEGFR2 en las HUVEC tras 48 h de haber sido tratadas con suero isquémico y control (Figura 49A). Continuando con el patrón seguido en el caso de la ruta de *Notch1*, se examinó la expresión a nivel de ARNm de *VEGF-A* en HUVEC transfectadas con *scramble* y tratadas con los dos tipos de suero. Como se observa en la Figura 49B, no existieron diferencias significativas a nivel de expresión del factor de crecimiento entre los grupos, pero, de nuevo, se apreció una tendencia al alza de ésta en las células tratadas con suero isquémico. Seguidamente, se comprobó la expresión de *VEGF-A* en HUVEC

transfectadas con siOrai1. En este caso, en presencia de suero isquémico, el silenciamiento de Orai1 afectó a la expresión de *VEGF-A* provocando una disminución cercana a la significancia (Figura 49B), lo que sugería una posible relación de Orai1 con la expresión del factor proangiogénico. En esta misma línea, al igual que en el caso de Notch1, la expresión de *VEGF-A* mostró una correlación lineal con la expresión de *Orai1* con un buen ajuste ($r = 0.8708$, $p = 0.0022$).

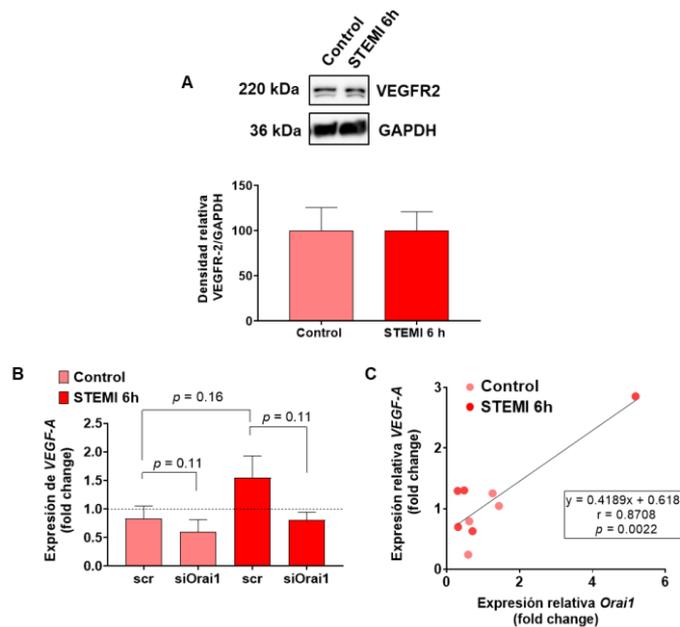


Figura 49. El silenciamiento de la expresión de Orai1 condiciona la expresión de *VEGF-A* en HUVEC tratadas con suero isquémico de paciente. **A.** El gráfico de barras muestra los niveles de expresión de proteína (densidad relativa en relación al endógeno: GAPDH) de VEGFR2 en HUVEC tratadas con suero control (rosa, $n = 4$) y suero isquémico (STEMI 6h, rojo, $n = 4$) y en la parte superior, los *blots* representativos de VEGFR2 y GAPDH en estos cultivos **B.** El gráfico de barras muestra los niveles de expresión de ARNm (fold change) de *VEGF-A* en HUVEC transfectadas con *scramble* y siOrai1 tratadas con suero de pacientes control (rosa, $n = 4$) e isquémicos (STEMI 6h; rojo, $n = 6$). **C.** Curva de correlación lineal donde se enfrentan la expresión relativa de *VEGF-A* con la de *Orai1* en HUVEC tratadas con

siero isquémico HUVEC tratadas con suero de pacientes control (rosa, $n = 4$) e isquémicos (rojo, $n = 6$). Los valores se presentan como la media \pm S.E.M.

5.4. EL SUERO DE RATAS DEL MODELO DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN (I/R) ACTIVA LAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN ORAI1, NOTCH1 Y VEGF

Tuvimos especial interés en comprobar si el suero de rata del modelo experimental de I/R, tras 24 h desde la intervención, proporcionaba el mismo efecto que el suero de pacientes isquémicos. Como se observa en la Figura 50A, el tratamiento con suero de rata I/R también indujo una mayor expresión de Orai1, aunque no significativa, en comparación con la expresión de las células tratadas con suero de rata *sham*. Igualmente, tampoco se apreciaron diferencias en la expresión de MEF2A tras 2 (Figura 50B) y 48 h (Figura 50C) del tratamiento con el suero de ambos grupos de ratas.

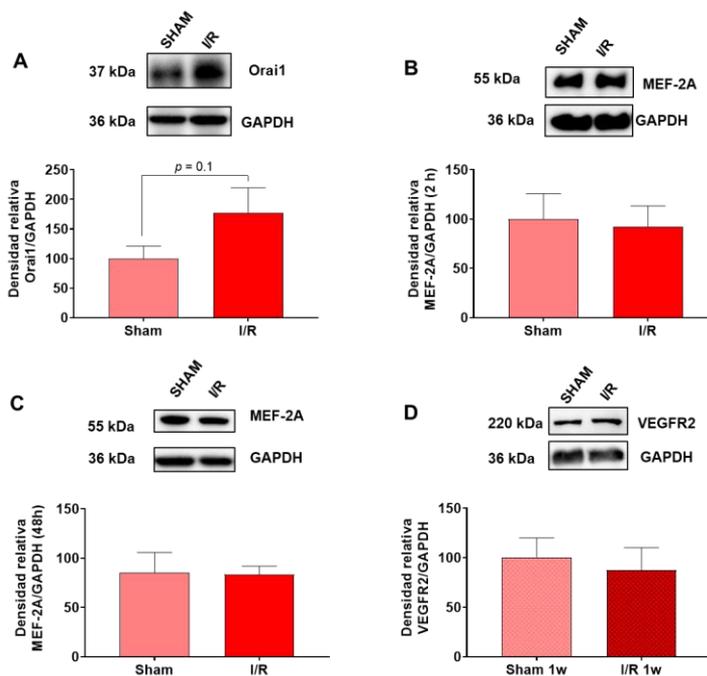


Figura 50. La incubación con suero isquémico de rata tiende a incrementar la expresión Orai1 tras 48 h. A-C. Los gráficos de barras muestran los niveles de expresión de proteína (densidad relativa en relación al endógeno: GAPDH) de Orai1 (A), MEF2A (2 h,B; 48 h,C) y VEGFR2 (D) en HUVEC tratadas con suero de rata operada *sham* (rosa, n = 4) y de isquemia/reperfusión (I/R, rojo, n = 5) (A-C) y en tejido de rata operada *sham* (rosa, n = 3) e I/R (rojo, n = 3) (D); y en la parte superior, los *blots* representativos de Orai1 (A), MEF2A (B,C) y VEGFR2 (D) y GAPDH (A-D) en estas condiciones. Los valores se presentan como la media \pm S.E.M.

Además, pese que no había diferencias a nivel de expresión de proteína de VEGFR2 tras el tratamiento con suero, estudiamos la posible desregulación del receptor en el tejido completo de rata operada *sham* e I/R. En la misma línea que los resultados con el suero de humano, no se determinaron diferencias de densidad de banda entre ambos grupos de ratas (Figura 50D).

Por último, remarcar que, al transfectar las HUVEC con siOrai1 y *scramble*, y tratarlas con suero de rata operada de *sham* e I/R, se obtuvieron casi las mismas tendencias de expresión para *VEGF-A*, *Notch1*, *Hey1* y *Hes1* (Figura 51B-E), así como de correlación lineal entre los genes *VEGF-A*, *Notch1* y *Hey1* frente a *Orai1* (Figura 51F-H).

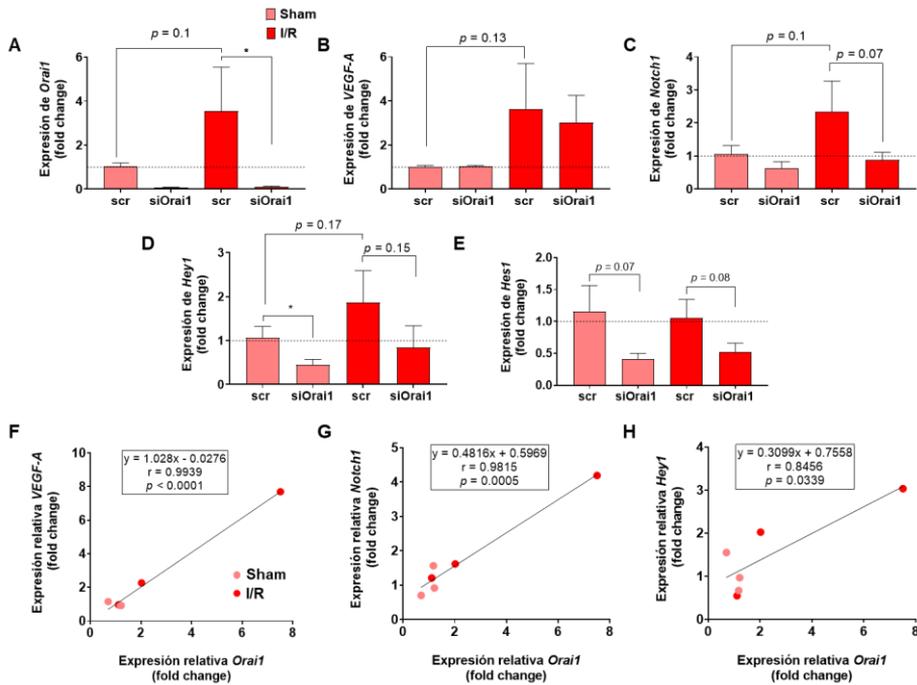


Figura 51. El bloqueo de *Orai1* condiciona la expresión de *VEGF-A*, *Notch1*, *Hes1* y *Hey1* en HUVEC tratadas con suero isquémico de rata. A-E. Los gráficos de barras muestran los niveles de expresión de ARNm (fold change) de *Orai1* (A), *VEGF-A* (B), *Notch1* (C), *Hes1* (D) y *Hey1* (E) en HUVEC transfectadas con *scramble* y siOrai1 tratadas con suero de ratas *sham* (rosa, n = 4) y operadas de isquemia/reperusión (I/R; rojo, n = 6). F-H. Curvas de correlación lineal donde se enfrentan la expresión relativa de *VEGF-A* (F), *Notch1* (G) y *Hey1* (H) con la de *Orai1* en HUVEC tratadas con suero de ratas *sham* (rosa, n = 4) e I/R (rojo, n = 6). (*) indica una significancia con un $p < 0.05$.



1. NUEVAS DIANAS PARA CONTROLAR LA ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis, entendida como el proceso llevado a cabo por las CE por el cual se generan nuevos vasos sanguíneos a partir de otros preexistentes, es un evento central en todas las etapas de la vida del organismo vertebrado (Muñoz-Chápuli, 2011). En el adulto, las CE que componen los vasos se hallan quiescentes, hasta que, en determinadas situaciones donde existe una escasez de oxígeno, como en el infarto de miocardio (Ingason et al., 2018), en la retinopatía diabética (Li et al., 2011a) o en cáncer (Folkman, 1971), las CE inician la formación de nuevos vasos sanguíneos (Figura 52). Es por ello que, al ser un proceso crucial para la progresión o mejoría de estas enfermedades, numerosos ensayos se han centrado en la búsqueda de dianas para controlar la angiogénesis (Ferrara and Kerbel, 2005; Upadhyay et al., 2021; Yoo and Kwon, 2013).

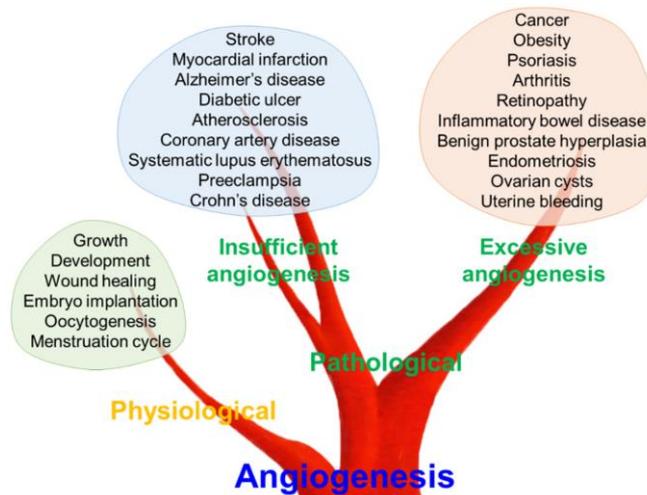


Figura 52. Situaciones fisiológicas y patológicas donde tiene lugar la angiogénesis en el adulto. En el brazo inferior del árbol diferentes situaciones fisiológicas que cursan con formación de nuevos vasos sanguíneos, como el crecimiento o la cicatrización tras un daño, y en los brazos superiores enfermedades que presentan

una angiogénesis insuficiente (ej. infarto de miocardio, Alzheimer) o excesiva (ej. cáncer, retinopatías). Imagen tomada de Bae y *col.* (Bae et al., 2021).

Aunque existen diferentes trastornos que se relacionan con un exceso o insuficiencia de angiogénesis (Figura 52), nos centraremos en la enfermedad que lidera la principal causa de muerte a nivel mundial: la cardiopatía isquémica (Pega et al., 2021). No obstante, estos argumentos son extrapolables a otras patologías.

En general, las terapias diseñadas para la mejora de la cardiopatía isquémica persiguen motivar la angiogénesis con el fin de aumentar la perfusión y la reparación del tejido dañado (Wu et al., 2021). Fundamentalmente, se han planteado tres tipos de tratamientos proangiogénicos que se basan en: la aplicación local de factores de crecimiento y citoquinas, como VEGF, FGF2, PlGF; la administración de células, como progenitores endoteliales, mononucleares, derivadas de la médula ósea o madres derivadas del tejido adiposo; y la adición de secretoma de células preconditionadas con diferentes estímulos, como se recoge de forma más detallada en las revisiones (Eelen et al., 2020; Gaspar et al., 2019). Sin embargo, en las dos primeras estrategias urge el hallazgo de un vehículo adecuado para la administración del medicamento, dado que existen problemas relacionados con la dosis, la escasa retención local, el alto coste de producción y en el caso de los factores y citoquinas, el corto periodo de vida de las moléculas. Por ello, a pesar del alto número de ensayos preclínicos interesados en la primera opción de terapia, solo un exclusivo número alcanzan la fase III de estudio clínico. No obstante, existen más ensayos clínicos que cursan con estos abordajes en comparación a la tercera opción, al ser ésta más novedosa (Eelen et al., 2020). Por tanto, se

hace notable la necesidad de investigación de nuevas dianas, que resuelvan las carencias y problemas de los tratamientos actuales.

2. SOCE Y SUS COMPONENTES EN ANGIOGÉNESIS

El proceso de angiogénesis está finamente regulado por factores pro-angiogénicos, entre los que destaca el VEGF que, al unirse a su receptor en las CE media, entre otros acontecimientos, el incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, indispensable para la supervivencia y correcto funcionamiento de las CE. Es por ello que la relación entre la fisiología de la CE y la señalización de Ca^{2+} ha sido ampliamente estudiada (Filippini et al., 2019). Sin embargo, son pocas las investigaciones que se han centrado en estudiar el papel de la entrada de Ca^{2+} SOCE en la angiogénesis, lo que motivó primordialmente al desarrollo de esta tesis doctoral. Con los diferentes ensayos realizados, hemos demostrado que la activación de SOCE juega un papel esencial en diferentes procesos de la CE que son señas de identidad angiogénica, como son la formación de tubos, la proliferación y la migración (Figura 53). En concreto, usando al inhibidor específico de los canales de tipo CRAC, GSK-7975A (Derler et al., 2013), hemos comprobado que es imprescindible disponer de una vía de SOCE activa y funcional para impulsar el *sprouting* a partir de anillos aórticos de rata, ya que, de lo contrario, se produce un bloqueo del desarrollo de las ramificaciones vasculares que resulta ser dosis-dependiente de la concentración de GSK en el medio de cultivo.

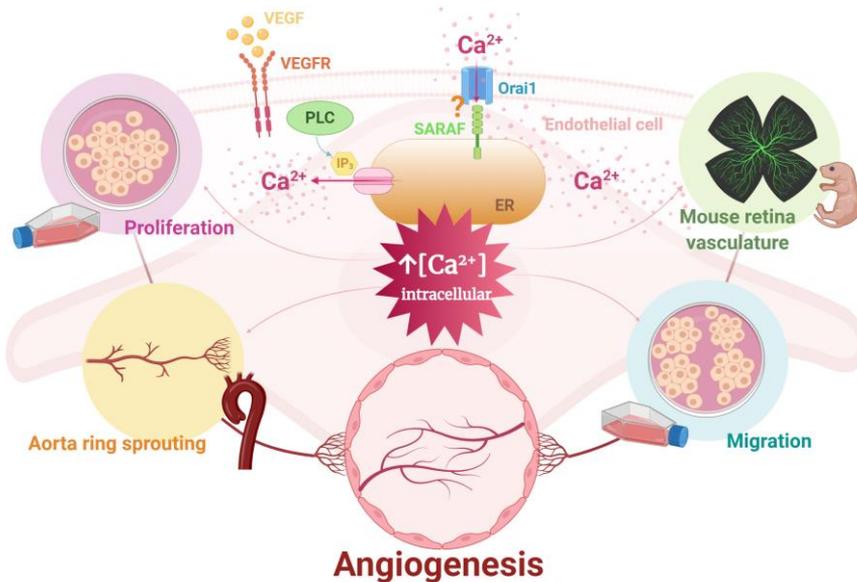


Figura 53. SOCE es esencial para la angiogénesis. La figura resume los principales hallazgos descritos en relación a SOCE y sus proteínas clave, Orai1 y SARAF, en la angiogénesis. El bloqueo de SOCE, usando GSK, bloqueó el *sprouting* a partir de anillos de aorta de rata cultivados *ex vivo*, así como la migración y la formación de tubos de las HUVEC. Igualmente, la inyección de GSK afectó al desarrollo de los vasos de la retina de ratones neonatos. En relación a Orai1 y SARAF, encontramos que el silenciamiento de ambas proteínas redujo el incremento de la $[Ca^{2+}]$ mediado por VEGF, así como la formación de tubos, la proliferación y la migración de las HUVEC. Imagen tomada de Galeano-Otero y *col.* (Galeano-Otero et al., 2021).

Dados los resultados obtenidos con los modelos desarrollados de angiogénesis *in vitro* y *ex vivo*, avanzamos un paso más e inyectamos intraperitonealmente GSK en ratones neonatos. De esta forma, demostramos, por primera vez, que el bloqueo de SOCE retrasa significativamente el desarrollo de la vasculatura del ratón, evaluado en el día P6 de vida. Entre otros hallazgos, se observó que la presencia de altas concentraciones del fármaco suponía una reducción significativa de la longitud de los vasos y del número de uniones intercelulares, lo que sugiere que SOCE es crucial para el desarrollo de los vasos. Al igual que en el caso

del ensayo de *sprouting* de anillos aórticos de rata, se identificó una dosis dependencia entre el número de puntos de unión de los diferentes vasos y la concentración inyectada de GSK. Cabe destacar que esta característica de los vasos es esencial para la maduración de los mismos y la formación de redes interconectadas, independientemente del número de nuevos vasos formados y los espacios que queden entre ellos. Todos estos resultados van en el mismo sentido de lo descrito previamente por otros investigadores usando otros inhibidores de SOCE más o menos específicos que el GSK, como son, Synta66 (Li et al., 2011b), SFK-96365 (Chen et al., 2011; Savage et al., 2019), o 2-APB (Chen et al., 2011; Pafumi et al., 2015; Ye et al., 2018). Igualmente, todos ellos atenuaron la formación de vasos en otros modelos *in vivo* e *in vitro* de angiogénesis. Como apunte importante, ninguno de estos bloqueadores fue inyectado para evaluar el efecto del desarrollo fisiológico de la formación de nuevos vasos sanguíneos.

Entre las proteínas clave de SOCE, Orai1 destaca como una posible nueva diana para el control de la angiogénesis, especialmente en la vascularización tumoral (Vashisht et al., 2015). Nuestros datos confirman lo que ha sido previamente estudiado por otros autores que han usado VEGF o tpsigargina para estimular SOCE y es que, efectivamente, existen corrientes CRAC y activación de SOCE en las CE. Abdullaev y *col.* (Abdullaev et al., 2008b) fueron los primeros en mostrar que la disminución de la expresión de Orai1 se asociaba con una reducción en la proliferación de las HUVEC. En esta misma línea, otros autores propusieron, usando silenciamiento, dominantes negativos y anticuerpos neutralizantes de Orai1, que esta proteína es necesaria para el flujo de Ca^{2+} inducido por VEGF así como para la formación de tubos de las HUVEC (Li et al., 2011b). No obstante, otros investigadores concluyeron, usando siARNs de Orai1, que

la reducción de la expresión de la proteína no afectaba a la disposición en mallas de las CE, concretamente de la línea celular EA.hy926 donde el bloqueo de STIM1, TRPC3, TRPC4 y TRPC5 era crucial para la formación de tubos (Antigny et al., 2012). Cabe destacar que la línea celular EA.hy926 es un clon híbrido entre HUVEC con un clon resistente a tioguanina de A549 a fin de ser mantenida hasta el pase 100 en cultivos celulares, por lo que se aleja del cultivo de HUVEC durante los primeros pases, siendo éste mucho más afín a un cultivo primario de CE. Aunque el modelo de angiogénesis *in vitro* usando esta línea celular no se vio afectado por la ausencia de Orai1, en otro estudio realizado por el mismo grupo de investigación se demostró que Orai1 y STIM1 eran cruciales para la activación de SOCE mediada por taptisgargina (Antigny et al., 2011b). Nuestros resultados apoyan firmemente la implicación de Orai1 en la migración, proliferación y formación de mallas de las HUVEC. En lo que se refiere a la entrada de Ca^{2+} inducida por VEGF, hemos confirmado que la disminución de la expresión de Orai1, mediada por siARN, resulta en una disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, lo que confirma el papel de Orai1 en las oscilaciones de Ca^{2+} mediadas por el VEGF, así como la capacidad del mismo para activar SOCE. Sin embargo, el silenciamiento de Orai1 no inhibió por completo el aumento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ mediado por VEGF, lo que sugiere que, además de activar a SOCE, desencadena la activación de otros canales conductores de Ca^{2+} (Smani et al., 2018b).

3. PAPEL DE SARAF EN LA FISIOLÓGÍA DE LA CÉLULA ENDOTELIAL

Al igual que con Orai1, hemos comprobado que la disminución de la expresión de SARAF, mediada por siARN, reduce el aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimulado por VEGF, así como la proliferación, la migración y la formación de nuevos vasos sobre el Matrigel de las HUVEC. Hasta donde conocemos,

este estudio es el primero que ha evaluado el papel de SARAF en el proceso de angiogénesis. La participación del producto del gen *tmem66*, SARAF, en SOCE, se describió por primera vez en 2012 por el grupo dirigido por el Dr. Palty (Palty et al., 2012). Desde entonces, han emergido diferentes estudios que apoyan el importante papel de la molécula como reguladora de la homeostasis de Ca^{2+} en células excitables y no excitables, como ha revisado recientemente el propio grupo que la identificó (Dagan and Palty, 2021). En sus inicios, SARAF se identificó en la línea celular HEK293 como un posible regulador de la activación espontánea de STIM1 en condiciones de reposo (Palty et al., 2012). Solo un año más tarde, se demostró que, además de controlar la actividad de STIM1, SARAF orquestaba el proceso de activación de Orai1, uniéndose de forma directa a la región de activación de STIM1 y Orai1 (SOAR) (Jha et al., 2013). Por otra parte, Albarrán y *col.* han aportado también numerosas evidencias que han facilitado la comprensión de la función de SARAF. Entre otros hallazgos, destaca la expresión constitutiva de SARAF en la membrana plasmática, donde interacciona con Orai1 para modular la entrada de Ca^{2+} mediante canales ARC en las líneas de neuroblastoma SH-SY5Y y NG115-401L (Albarran et al., 2016b); y la interacción directa de la molécula con Orai1 para activar CRAC y potenciar la entrada de Ca^{2+} en determinadas células derivadas de líneas tumorales (MEG01, MCF7, NG115-401L) (Albarran et al., 2016a). Esta última función de la proteína, apoyada por el reciente estudio de Jardín y *col.* donde los investigadores confirmaron que la ausencia de SARAF atenuaba la entrada SOCE, la viabilidad, así como la capacidad de migración de las células de cáncer de mama MCF7 (Jardin et al., 2021), planteó la dualidad funcional de SARAF para activar o bloquear SOCE en función del tipo celular y su fisiología. Justamente, estas evidencias sirvieron de base para el último

artículo del grupo del Dr. Palty, donde 9 años después de la identificación de SARAF, refuerzan el papel regulador de la proteína en la activación de los canales CRAC, pero esta vez en ambas direcciones (Zomot et al., 2021). A diferencia de la hipótesis inicial, en este trabajo destacan, entre otras aportaciones, el papel de la proteína en la regulación de la magnitud de los canales CRAC, en la inactivación lenta dependiente de Ca^{2+} de estos, en la translocación de STIM1 y 2 para activar CRAC, y en la participación en la entrada de Ca^{2+} mediante STIM2. Por tanto, aunque en un principio se pensó que SARAF era un mero regulador de la activación de STIM1, actualmente, es considerado como una pieza clave en el complejo proceso de activación de la entrada de Ca^{2+} mediante SOCE y, su ausencia, es determinante para la activación de los canales CRAC en diferentes tipos celulares. Cabe remarcar en estas líneas que, tanto la revisión como el artículo científico producido por el grupo pionero de la identificación de SARAF (Dagan and Palty, 2021; Zomot et al., 2021) se refieren, basan sus estudios y citan al artículo derivado de la ejecución de esta tesis doctoral (Galeano-Otero et al., 2021). Sería de gran interés evaluar, por lo tanto, el papel de SARAF en angiogénesis usando modelos de *gain-* o *loss- of function* en un futuro próximo.

Como cierre de esta sección, remarcar que nuestros resultados demuestran, usando la técnica de PLA y el ensayo de inmunofluorescencia clásico, que Orai1 y SARAF colocalizan. Esta conclusión deriva de que se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson mayor de 0.5 (0.83) y numerosos puntos rojos que señalaron la corta distancia existente entre las proteínas (<40 nm). No obstante, no podemos asegurar que hay interacción física entre las dos proteínas, aunque nuestros resultados están en consonancia con lo obtenido por otros investigadores en un estudio

mencionado con anterioridad, donde demostraron mediante ensayo de co-inmunoprecipitación de Orai1 interacciona con SARAF (Albarran et al., 2016a).

4. ANGIOGÉNESIS POST-ISQUÉMICA

En diferentes escenarios isquémicos, como el posterior a un IAM, se desencadenan una serie de eventos colaterales. Entre otros, se encuentra la producción de VEGF-A en las diferentes células residentes del corazón, así como en las poblaciones inflamatorias que alcanzan al miocardio para intentar reparar el daño. Con ello, las CE responden al estímulo iniciando un proceso de angiogénesis reparativa que, cuando sucede de forma organizada, se asocia con un mejor pronóstico de la enfermedad (Seidel et al., 2016; Wu et al., 2021). Conforme a esta premisa, en la cohorte de individuos reclutada, hemos detectado altos niveles de VEGF-A en los pacientes tras 6 h de haber padecido un STEMI y haber sido tratados con angioplastia primaria, lo que además concuerda con lo descrito en estudios similares (Kranz et al., 2000; Niu et al., 2016; Youvella et al., 2021). Igualmente, se hallaron altos niveles de IL-17A en el suero de los pacientes tras las primeras horas del infarto y posterior ACTP, acorde a lo que habían identificado otros autores en cohortes de pacientes parecidas (Bochaton et al., 2017; Simon et al., 2013). En relación a esta citoquina, Gatsiou y *col.* demostraron el pasado año que cuando las plaquetas, obtenidas a partir de sangre de humano, se estimulaban *in vitro* con IL-17A, éstas aumentaban la expresión de moléculas pro-angiogénicas, como el propio VEGF, IL-2 e IL-4 (Gatsiou et al., 2021). Además, el secretoma derivado del tratamiento de las plaquetas con IL-17A, estimuló la formación de tubos de las HUVEC sobre Matrigel. En otro estudio anterior, otros investigadores remarcaron que la IL-

17 era una de las responsables de promover la producción de VEGF en células de cáncer de pulmón, y por ello, la angiogénesis, aunque no especificaron el subtipo de IL-17 estudiado (Pan et al., 2015). En esta misma línea, otros autores mostraron que de todos los tipos de IL-17, solo la concentración de IL-17A y F se correlacionaba con la detección de VEGF en pacientes con lupus eritematoso, por lo que propusieron a ambos subtipos como marcadores angiogénicos (Robak et al., 2013). En otro tipo de patología que también cursa con un periodo de I/R en el tejido afectado, como es el ictus, Zhang y *col.* mostraron, haciendo uso de un modelo animal de la enfermedad deficiente en IL-17A, que la angiogénesis que se induce tras el evento isquémico depende de la citoquina que, a su vez, parece ser la responsable de la activación de VEGF (Zhang et al., 2016).

En consonancia con el aumento de VEGF-A e IL-17A en los pacientes con STEMI, nuestros resultados apoyan que la estimulación con el suero de estos pacientes promueve la formación de tubos de HUVEC sobre Matrigel. No obstante, no hemos estudiado la posible interacción/liberación entre estas dos citoquinas. Curiosamente, solo un escaso número de ensayos han utilizado el suero de pacientes con patologías isquémicas o derivado de otro tipo de desórdenes, como el cáncer, para estimular la angiogénesis *in vitro*. Destaca el que recientemente publicaron Li y *col.* donde, usando exosomas derivados del suero de pacientes con IAM, denotaron una mayor capacidad migratoria, así como de formación de tubos sobre el Matrigel de las HUVEC (Li et al., 2018). En este mismo trabajo, añadieron las microvesículas isquémicas a la zona dañada del modelo animal de isquemia de miembros posteriores, lo que mostró un aumento de la densidad de microvasos y de la perfusión sanguínea. Por otra parte, en otro ensayo donde usan el suero completo de

pacientes STEMI tratados con ACTP para estimular a las HUVEC, destacan que además de VEGF-A₁₆₅ (VEGF-A), detectan la presencia de la isoforma VEGF-A_{165b} que posee propiedades anti-angiogénicas, tanto circulante en sangre, como en forma de acúmulos en el miocardio de pacientes con historia previa de IAM (Hueso et al., 2017). En este caso, al tratar con suero isquémico tras 24 h de reperfundir la arteria, para encontrar un mayor número de mallas sobre el Matrigel, desvelan que tuvieron que usar un anticuerpo neutralizante de VEGF-A_{165b}. Estos últimos resultados no coinciden con lo obtenido por Ríos-Navarro *y col.* donde, caracterizando el número de tubos formados *in vitro* usando suero de rata bajo diferentes condiciones experimentales antes y después de la I/R, describen que desde antes de la revascularización hasta 1 semana después de la misma, éste es capaz de estimular la formación de más tubos *in vitro* que el suero control (Ríos-Navarro et al., 2018).

Por otra parte, hemos mostrado que el suero de pacientes STEMI indujo una mayor migración de células *tip* en el modelo de cultivo de HUVEC en 3D. Cabe remarcar que, hasta donde alcanza nuestro conocimiento, es la primera vez que se ha usado el novedoso ensayo de Mimetas para el estudio de células *tip* atraídas por secretoma humano. Recientemente, usando análisis transcriptómico por *single-cell* para estudiar las poblaciones cardíacas en un modelo de IAM de ratón (Li et al., 2019), se ha descrito que las subpoblaciones de CE residentes del corazón que lideran la neovascularización del tejido expresan un conocido marcador de células *tip*, *plasmalemma vesicle-associated protein* (Plvap) tras el evento isquémico (Zarkada et al., 2021). Usando inmunofluorescencia, Plvap se encontró en CE (CD31⁺) de tejido de rata y paciente tras haber padecido un infarto (Li et al., 2019). Sin embargo, más allá de este estudio, pocos trabajos en la

bibliografía se precipitan a hablar de células *tip* en el miocardio. Por ello, sería muy interesante comprobar la expresión de dicho marcador bajo nuestras condiciones experimentales.

En relación a la migración celular, en nuestro estudio, el suero isquémico, derivado tanto de pacientes como del modelo animal, significativamente aceleró el proceso de cicatrización de la herida tras el daño *in vitro*. Además del trabajo de Li y *col.* comentado anteriormente donde con los exosomas derivados de pacientes con IAM estimularon la migración de las HUVEC (Li et al., 2018), otros estudios sugieren que el periodo de I/R acelera la capacidad de cierre de la herida en el ensayo de *wound healing* (Xie et al., 2018; Zhu et al., 2015). Todos estos estudios de angiogénesis, en conjunto, nos sugieren que al tratar las células con un medio condicionado isquémico se activan una serie de rutas de señalización, generalmente con propósito reparativo, que emulan lo que ocurre durante el infarto, ya sea por la propia hipoxia del evento, como por las señales que le llegan del torrente circulatorio.

Por el contrario, en nuestro estudio no se encontraron diferencias significativas a nivel de células positivas para Ki67 entre las HUVEC tratadas con suero control frente a las tratadas con suero isquémico, pero sí en el número de células por cubre tras añadir el estímulo. Curiosamente, cuando las HUVEC previamente se transfectaron con un siARN *scramble* sí se observó un descenso significativo del número de HUVEC Ki67⁺ en las células estimuladas con suero isquémico frente a las tratadas con suero control (datos no mostrados). Similarmente, Pan y Zhang (Pan and Zhang, 2018) observaron que el tratamiento con diferentes concentraciones de suero de pacientes con enfermedad coronaria aterosclerótica disminuía

significativamente el número de células en proliferación en comparación con el suero control. En el caso del trabajo mencionado anteriormente, donde usaron exosomas derivados de suero isquémico (Li et al., 2018), sí detectaron un leve aumento de la proliferación en aquellas células tratadas con los exosomas de pacientes con IAM. Esta disonancia nos sugiere que, al usar en nuestro caso suero completo que contiene numerosos factores además de los mencionados anteriormente, asumimos la posibilidad de que algunas de estas moléculas circulantes posean propiedades anti-proliferativas sobre las CE. En el caso del corazón de ratón tras IAM, otros investigadores sí detectaron un porcentaje de CE endoglina⁺Ki67⁺, y en menor medida de VEGFR2⁺Ki67⁺. Aunque, sorprendentemente, denotaron el doble de células de músculo liso Ki67⁺ en el tejido infartado (Miquerol et al., 2015).

5. ORAI1 EN LA ANGIOGÉNESIS POST-ISQUÉMICA

Los experimentos de incubación de HUVEC con suero isquémico durante 48 h sugieren un cambio de expresión de diferentes proteínas que estarían implicadas en angiogénesis. Como ya se discutió anteriormente, solo un escaso número de ensayos han apostado por el estudio de la movilización de ion Ca²⁺ vía SOCE, a pesar de la importancia en la fisiología de la CE y de ser la principal entrada de Ca²⁺ en éstas. Utilizando tapsigargina como estímulo de vaciado de reservorios, pudimos observar una exacerbación en SOCE en células tratadas con suero isquémico. Resulta especialmente interesante que el suero de un paciente control, aun teniendo factores circulantes, no desencadene el mismo incremento de la [Ca²⁺]_i tras la incubación con tapsigargina. Esto, es señal de que los factores presentes en el suero isquémico aumentan la expresión de proteínas SOCE,

como posteriormente se confirmó con Orai1. Sobre este asunto, en la misma línea del uso de suero como estímulo, no hemos encontrado nada similar en la bibliografía. Podríamos aventurarnos a decir que es la primera vez que se relaciona SOCE con el comportamiento de las CE tras un estímulo isquémico. Aunque en CE no haya nada descrito, trabajos previos del laboratorio describen un aumento en la expresión proteica de Orai1 tanto en el tejido cardiaco de ratas tras 1 semana de haber sido operadas de I/R, como en cardiomiocitos de ventrículo de ratas neonatales tras haber sido sometidos a un período de hipoxia/reperfusión *in vitro*. En este último modelo de estudio, este incremento en la expresión de Orai1 se correspondió con una mayor entrada de Ca^{2+} tras la incubación con tapsigargina (Domínguez-Rodríguez et al., 2018).

Por otra parte, se añadió suero a las HUVEC de manera aguda durante el ensayo de Ca^{2+} y se estudió la movilización del ion. Llamativamente, se observó un desmesurado incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, sensible al inhibidor de SOCE, GSK, lo que sugirió que gran parte del incremento observado se debía a la participación de la vía SOCE (datos no mostrados). No obstante, la inhibición en la entrada de Ca^{2+} no fue completa, debido a que, como es sabido, otros canales participan en ésta en las CE (Smani et al., 2018b) y a que, probablemente, no se alcanzó la máxima eficiencia del fármaco con la concentración usada de GSK (10 μM). Este ensayo únicamente sirvió como premisa para corroborar que, efectivamente, existen factores circulantes capaces de activar SOCE en las CE, hecho que no se ha demostrado para ningún tipo de patología. Se tratan de resultados preliminares que, indudablemente, sería interesante comprobar para el resto del suero recolectado de paciente. Como

inconveniente de este efímero ensayo, encontramos el considerable gasto del estímulo biológico utilizado.

6. ORAI1 Y LA ACTIVACIÓN DE MEF2A DURANTE LA ANGIOGÉNESIS POST-ISQUÉMICA

Motivados por conocer el papel de SOCE y sus proteínas en la angiogénesis, en este caso post-isquémica, bloqueamos la expresión de Orai1 usando siARNs y realizamos diferentes ensayos estimulando con suero de paciente. Acorde a los resultados anteriores (Galeano-Otero et al., 2021) y a datos de un array publicado por la Dra Raquel del Toro (Del Toro et al., 2010) donde las células *tip* mostraron mayor expresión de Orai1 que las *stalk*, el silenciamiento de la proteína redujo significativamente la migración de las células *tip* en el ensayo de angiogénesis en 3D, estimuladas tanto con suero isquémico como control. Además, se detectó mayor marcaje de Orai1 en la zona periférica de los conglomerados de HUVEC, lo que sugiere una mayor expresión de la proteína en el frente de migración.

Igualmente, el silenciamiento de Orai1 previno la activación del factor de transcripción dependiente de Ca^{2+} , MEF2A, tras la adición del suero de los pacientes STEMI 6h. Anteriormente, otros estudios habían descrito que el bloqueo de Orai1 y STIM1 mediante siARNs inhibía la activación de MEF2, sin especificar cuál, medido mediante inmunofluorescencia en mioblastos humanos (Darbellay et al., 2009). Recientemente, otro estudio firmado por Wu y *col.* apoyó estos resultados demostrando que las células HEK293 carentes de Orai1 presentan una expresión disminuida de MEF2C (Wu et al., 2022). En nuestro trabajo, a pesar de que por inmunofluorescencia encontramos una mayor intensidad de señal tras 24h de la adición de suero isquémico, no observamos

diferencias en la expresión de MEF2A a nivel proteico. Estos resultados sugieren que podría existir una translocación del factor de transcripción al núcleo bajo estas condiciones que no necesariamente se corresponde con un aumento de la expresión del mismo. Justamente, el papel de la familia de factores de transcripción MEF2 en angiogénesis ha sido estudiado por varios investigadores. Por ejemplo, Sacilotto *y col.* denotaron a MEF como un factor de transcripción clave para la angiogénesis mediante *sprouting* (Sacilotto et al., 2016). Usando un ratón deficiente en MEF2A y C, confirmaron incluso un significativo descenso en el desarrollo de los vasos de la retina, afectando la ausencia de los factores gravemente a la morfología de estos. Sacilotto *y col.* caracterizaron también la activación, usando WB, de MEF2 tras la adición de VEGF, obteniendo para los 3 subtipos una densidad de banda considerable tras 8 h de haber añadido el estímulo. Curiosamente, otros investigadores utilizando también un modelo de ratón inducible para la delección de MEF2A-D, en este caso, específica de endotelio (Lu et al., 2021), determinaron que la actividad de esta familia de factores de transcripción era esencial para la homeostasis vascular, así como para la expresión de los factores Klf2 y 4, responsables de la integridad vascular y numerosas funciones del endotelio (Sangwung et al., 2017). Igualmente, la ausencia de la expresión de MEF2, previno la expresión de genes de la vía de Notch1, como el propio receptor de *Notch1*, *Dll1* y *Jag1*, lo que sugirió la regulación de MEF2 sobre Notch1 (Lu et al., 2021). Por otra parte, otros autores han descrito recientemente la activación de otros subtipos de MEF2, en concreto de MEF2D, tras inducir I/R *in vitro* en células de la microglia (Shi et al., 2022). Sin embargo, ningún de ellos ha tratado el papel del ion Ca^{2+} y específicamente la vía SOCE en la activación de MEF2. Nuestros resultados ponen de manifiesto por primera vez la implicación de Orai1 en

la activación de MEF2 en CE, lo que podría ser relevante para procesos angiogénicos.

7. ORAI1 Y LA VÍA DE NOTCH1 EN LA ANGIOGÉNESIS POST-ISQUÉMICA

A nivel de ARNm, la reducción de la expresión de *Orai1* reveló resultados prometedores. En relación a VEGF-A, se observó un aumento de la expresión del receptor cercano a la significancia entre las dos condiciones experimentales, suero isquémico y control, en cultivos transfectados con *scramble*. Además, bajo estas condiciones, se obtuvo una correlación lineal con un buen ajuste y significativa ($r = 0.8708$, $p = 0.0022$) para la expresión de ambas moléculas. Curiosamente, la expresión de VEGF-A inducida por el suero isquémico se redujo considerablemente tras bloquear *Orai1*. Acorde a estos resultados, Choi y col. demostraron que las CE linfáticas derivadas de embriones de ratón carentes de *Orai1* expresaban significativamente menos VEGF-A y C respecto a las CE linfáticas derivadas del ratón *wild type* (Choi et al., 2017a). Para la expresión del receptor de Notch1, obtuvimos resultados similares: un aumento de la expresión en las células transfectadas con *scramble* tratadas con suero isquémico, y un bloqueo de este incremento tras inhibir la expresión de *Orai1*, complementario a lo obtenido con el silenciamiento de Notch1. Además, en la correlación lineal se obtuvo un ajuste significativo para la expresión de *Orai1* frente a *Notch1*, *Hes1* y *Hey1* ($r = 0.9755$; $r = 0.6559$ y $r = 0.7894$, respectivamente). Hasta hace pocos años, se desconocía la relación entre Notch1 y *Orai1*, y actualmente, solo un escaso número de trabajos se han centrado en explorarla. Liu y col. identificaron un aumento en la expresión, tanto a nivel de ARNm como de proteínas, de *Orai1* y Notch1 en líneas celulares triple negativas de cáncer de mama (MDA-MB 231 y BT459) tras

12 h de haber sido sometidas a un periodo de hipoxia (Liu et al., 2018). El silenciamiento con el siARN de Notch1, al igual que el de Orai1, previno, además, la entrada de SOCE en ambas líneas celulares. Igualmente, el medio condicionado de las células de cáncer de mama tras hipoxia, sirvió como estímulo para motivar la angiogénesis en células HMEC-1, resultado que se vio impedido tras transfectar con siOrai1 y siNotch1 por separado. Esto, junto con otros resultados relacionados con la afección de la activación de la vía NFAT en ambos silenciamientos, hizo que los autores propusieran la hipoxia como desencadenante de la señalización de Notch1 que, a su vez, inducía a Orai1 potenciando SOCE y, por tanto, la agresividad de las células de cáncer de mama (Liu et al., 2018). Contraria a esta premisa, Choi y *col.* demostraron que las CE linfáticas de ratones carentes de Orai1 poseían una mayor expresión de los diferentes marcadores de la ruta de Notch1 (Choi et al., 2017b). Indudablemente, a pesar de que las HUVEC se consideran como un buen modelo para el estudio de las CE en la enfermedad cardiovascular (Medina Leyte et al., 2020), es preciso remarcar en estas líneas que existen numerosas formas de estudio de angiogénesis *in vitro*, *in vivo* y *ex vivo* y para obtener resultados concluyentes siempre, dentro de las posibilidades de acceso a los modelos y a las muestras, es necesario que los resultados se confirmen a través de diferentes ensayos (Staton et al., 2009).

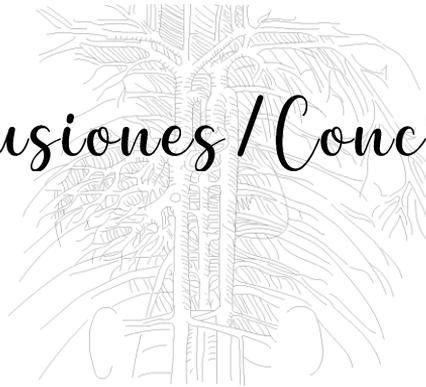
En relación al resto de proteínas estudiadas, como NICD y VEGFR2, no se identificaron diferencias de expresión entre ambos grupos de células. En referencia a la vía de Notch1, nuestra hipótesis se basó en que, al ser una vía clave en las CE, podía estar desregulada por la presencia de suero isquémico. Nuestra premisa se sustentaba además en el trabajo de otros autores donde, usando un modelo animal de isquemia de miembros

posteriores, observaron un aumento de la señal de marcaje de Notch1 y Hes1 en las CE CD31⁺ tras la intervención quirúrgica (Takeshita et al., 2007). Contrariamente, Zhou y col. declararon que la hipoxia y reperfusión en cultivo disminuía la expresión de Notch1, NICD y Hes1 en las HUVEC, y con ello la capacidad de formación de tubos de las células, lo que hacía gala de la estrecha relación entre la angiogénesis y la vía de señalización (Zhou et al., 2018b). Como crítica a este trabajo, el período de isquemia fue demasiado prolongado (6 h) y a pesar de que las CE soportan largos tiempos de hipoxia en el humano, hay que tener en cuenta que se está trabajando *in vitro* y que el daño sobre la CE puede ser irreversible (Wu et al., 2021). Sobre el marcador de la ruta Hes1, otros autores denotaron que el aumento de la expresión de la proteína reducía la formación de tubos de HUVEC sobre el Matrigel, así como el número de ramificaciones en el modelo *in vivo* de embrión de pollo; mientras que el bloqueo de la expresión de Hes1 aumentaba la angiogénesis en ambos modelos (Yao et al., 2017).

Acerca del VEGFR2, hipotetizamos encontrar un aumento de la expresión del marcador de angiogénesis tanto en las HUVEC después del tratamiento con suero isquémico, como en el tejido de la rata tras 1 semana de la I/R. Sin embargo, no se apreciaron tales diferencias entre los grupos de estudio. En esta misma línea, el grupo del Dr. Min lleva años interesado en dilucidar la función de VEGFR2 en la angiogénesis patológica (He et al., 2006; Zhang et al., 2008). Recientemente, entre otros hallazgos relacionados con el modo de regulación del receptor tirosina quinasa, detectaron un aumento en la fosforilación, pero no en la expresión de VEGFR2, en el tejido intervenido tras realizar el modelo de ratón de isquemia de miembros posteriores (Zhou et al., 2018a). Estos resultados nos abren

camino para examinar en un futuro cercano la fosforilación del receptor en nuestro modelo.

Conclusiones / Conclusions



El objetivo principal de esta investigación fue estudiar los mecanismos moleculares relacionados con las homeostasis Ca^{2+} que promocionan la angiogénesis. En base a nuestros resultados, podemos concluir que:

1. La inhibición de SOCE, usando GSK-7975A (GSK), inhibe el *sprouting* en el modelo *ex vivo* de anillo aórtico de rata.
2. La inhibición farmacológica de SOCE disminuye la formación de tubos y la migración de las HUVEC.
3. La inyección intraperitoneal de GSK en ratones neonatos afecta al desarrollo de los vasos de la retina.
4. Orai1 y SARAF son esenciales para la entrada de Ca^{2+} mediada por SOCE e inducida por VEGF en las HUVEC.
5. Las proteínas Orai1 y SARAF colocalizan en las HUVEC, y están implicadas tanto en la proliferación, como en la formación de tubos y la migración de las HUVEC.
6. Los pacientes con STEMI tratados con ACTP muestran elevados niveles en el suero de dos citoquinas proangiogénicas: VEGF-A e IL-17A.
7. El suero de los pacientes con STEMI induce la formación de tubos y la migración de las HUVEC y estimula la atracción de las células *tip*, evaluado mediante cultivo 3D de HUVEC.

8. El suero de los pacientes STEMI exagera la entrada SOCE inducida mediante thapsigargina en HUVEC.
9. Orai1 es crucial para la migración de las células *tip* inducida por el suero isquémico en el cultivo celular de HUVEC en 3D.
10. El silenciamiento de Orai1 inhibe la activación de MEF-2A inducida por la adición de suero isquémico de los pacientes en HUVEC.
11. Orai1 es necesario para la expresión de *Notch1*, *Hes1*, *Hey1* y *VEGF-A* durante la angiogénesis post-isquémica.

The main purpose of this research was to study the molecular mechanisms which promote angiogenesis related to Ca^{2+} homeostasis. Based on our results, we can conclude that:

1. SOCE is involved in *sprouting* angiogenesis, as we assessed using GSK-7975A (GSK) in *ex vivo* model of rat aorta rings.
2. SOCE inhibition, using GSK, decreases HUVEC tube formation and migration.
3. GSK intraperitoneal injection in neonatal mice affects retinal vessels development.
4. Orai1 and SARAF are essential to VEGF-induced Ca^{2+} entry mediated by SOCE in HUVEC.
5. Orai1 and SARAF colocalize in HUVEC are involved in HUVEC proliferation, tube formation and migration.
6. Patients with STEMI treated with ACTP show high levels of two pro-angiogenic cytokines: VEGF-A and IL-17A in serum.
7. Serum from STEMI patients induces HUVEC tube formation, migration and stimulates tip EC migration, as we assessed using HUVEC 3D cell culture.
8. Serum from STEMI patients exacerbates thapsigargin-induced SOCE in HUVEC.

9. Orai1 is crucial to tip cells migration provoked by ischemic serum, as we assessed using HUVEC 3D cell culture.
10. Orai1 mediates MEF2A activation induced by STEMI patients' serum in HUVEC.
11. Orai1 is required for *Notch1*, *Hes1*, *Hey1* and *VEGF-A* expression in post-ischemic angiogenesis.



A. Bhargyalakshmi, F. Berthiaume, Reich, K., and Frangos, J.A. (1992). Fluid Shear Stress Stimulates Membrane Phospholipid Metabolism in Cultured Human Endothelial Cells. *J. Vasc. Res.* *29*, 443–449.

Abdullaev, I.F., Bisailon, J.M., Potier, M., Gonzalez, J.C., Motiani, R.K., and Trebak, M. (2008a). Stim1 and orai1 mediate crac currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circ. Res.* *103*, 1289–1299.

Abdullaev, I.F., Bisailon, J.M., Potier, M., Gonzalez, J.C., Motiani, R.K., and Trebak, M. (2008b). Stim1 and orai1 mediate crac currents and store-operated calcium entry important for endothelial cell proliferation. *Circ. Res.* *103*, 1289–1299.

Abhinand, C.S., Raju, R., Soumya, S.J., Arya, P.S., and Sudhakaran, P.R. (2016). VEGF-A/VEGFR2 signaling network in endothelial cells relevant to angiogenesis. *J. Cell Commun. Signal.* *10*, 347–354.

Abramsson, A., Lindblom, P., and Betsholtz, C. (2003). Endothelial and nonendothelial sources of PDGF-B regulate pericyte recruitment and influence vascular pattern formation in tumors. *J. Clin. Invest.* *112*, 1142–1151.

Adair, T.H., and Montani, J.-P. (2010). Overview of Angiogenesis (Morgan & Claypool Life Sciences).

Albarran, L., Lopez, J.J., Amor, N. Ben, Martin-Cano, F.E., Berna-Ero, A., Smani, T., Salido, G.M., and Rosado, J.A. (2016a). Dynamic interaction of SARAF with STIM1 and Orai1 to modulate store-operated calcium entry. *Sci. Rep.* *6*, 1–11.

Albarran, L., Lopez, J.J., Woodard, G.E., Salido, G.M., and Rosado, J.A. (2016b). Store-operated Ca²⁺ Entry-associated Regulatory factor (SARAF) Plays an Important Role in the Regulation of Arachidonate-regulated Ca²⁺ (ARC) Channels. *J. Biol. Chem.* *291*, 6982–6988.

Antigny, F., Jousset, H., König, S., and Frieden, M. (2011a). Thapsigargin activates

Ca²⁺ entry both by store-dependent, STIM1/Orai1-mediated, and store-independent, TRPC3/PLC/PKC-mediated pathways in human endothelial cells. *Cell Calcium* 49, 115–127.

Antigny, F., Jousset, H., König, S., and Frieden, M. (2011b). Thapsigargin activates Ca²⁺ entry both by store-dependent, STIM1/Orai1-mediated, and store-independent, TRPC3/PLC/PKC-mediated pathways in human endothelial cells. *Cell Calcium* 49, 115–127.

Antigny, F., Girardin, N., and Frieden, M. (2012). Transient receptor potential canonical channels are required for in vitro endothelial tube formation. *J. Biol. Chem.* 287, 5917–5927.

Avila-Medina, J., Mayoral-Gonzalez, I., Dominguez-Rodriguez, A., Gallardo-Castillo, I., Ribas, J., Ordoñez, A., Rosado, J.A., and Smani, T. (2018). The complex role of store operated calcium entry pathways and related proteins in the function of cardiac, skeletal and vascular smooth muscle cells. *Front. Physiol.* 9.

Bae, B., Kim, H., Park, H., Koh, Y.J., Bae, S.J., and Ha, K.T. (2021). Anti-angiogenic property of free human oligosaccharides. *Biomolecules* 11, 1–14.

Baker, M., Robinson, S.D., Lechertier, T., Barber, P.R., Tavora, B., D'Amico, G., Jones, D.T., Vojnovic, B., and Hodivala-Dilke, K. (2012). Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis. *Nat. Protoc.* 7, 89–104.

Bao, P., Kodra, A., Tomic-Canic, M., Golinko, M.S., Ehrlich, H.P., and Brem, H. (2009). The Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Wound Healing. *J. Surg. Res.* 153, 347–358.

Bellon, A., Luchino, J., Haigh, K., Rougon, G., Haigh, J., Chauvet, S., and Mann, F. (2010). VEGFR2 (KDR/Fik1) signaling mediates axon growth in response to semaphorin 3E in the developing brain. *Neuron* 66, 205–219.

Bielenberg, D.R., and D'Amore, P.A. (2008). Judah Folkman's contribution to the inhibition of angiogenesis. *Lymphat. Res. Biol.* 6, 203–207.

Bird, G.S., and Putney, J.W. (2018). Pharmacology of Store-Operated Calcium Entry Channels. *Calcium Entry Channels in Non-Excitable Cells* 311–324.

Blanco, R., and Gerhardt, H. (2013). VEGF and Notch in tip and stalk cell selection. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3, 1–19.

Bochaton, T., Mewton, N., Thiam, Nd., Lavocat, F., Baetz, D., Dufay, N., Prieur, C., Bonnefoy-Cudraz, E., Miossec, P., and Ovize, M. (2017). Early kinetics of serum Interleukine-17A and infarct size in patients with reperfused acute ST-elevated myocardial infarction. *PLoS One* 12.

De Bock, K., Georgiadou, M., Schoors, S., Kuchnio, A., Wong, B.W., Cantelmo, A.R., Quaegebeur, A., Ghesquière, B., Cauwenberghs, S., Eelen, G., et al. (2013). XRole of PFKFB3-driven glycolysis in vessel sprouting. *Cell* 154, 651–663.

Bolte, S., and Cordelières, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* 224, 213–232.

Boron, W.F., and Boulpaep, E.L. *Fisiología médica.* 1312.

Brudnoa, Y., Ennett-Sheparda, A.B., Chena, R.R., Aizenbergb, M., and Mooney, D.J. (2013). Enhancing Microvascular Formation And Vessel Maturation Through Temporal Control Over Multiple Pro-Angiogenic And Pro-Maturation Factors. *Biomate* 34, 1–17.

Bruveris, F.F., Ng, E.S., Stanley, E.G., and Elefanty, A.G. (2021). VEGF, FGF2, and BMP4 regulate transitions of mesoderm to endothelium and blood cells in a human model of yolk sac hematopoiesis. *Exp. Hematol.* 103, 30-39.e2.

Camacho Londoño, J.E., Tian, Q., Hammer, K., Schröder, L., Camacho Londoño,

- J., Reil, J.C., He, T., Oberhofer, M., Mannebach, S., Mathar, I., et al. (2015). A background Ca^{2+} entry pathway mediated by TRPC1/TRPC4 is critical for development of pathological cardiac remodelling. *Eur. Heart J.* *36*, 2257–2266.
- Carmeliet, P., Moons, L., Luttun, A., Vincenti, V., Compernelle, V., De Mol, M., Wu, Y., Bono, F., Devy, L., Beck, H., et al. (2001). Synergism between vascular endothelial growth factor and placental growth factor contributes to angiogenesis and plasma extravasation in pathological conditions. *Nat. Med.* *7*, 575–583.
- Chekhonin, V.P., Shein, S.A., Korchagina, A.A., and Gurina, O.I. (2013). VEGF in Tumor Progression and Targeted Therapy. *Curr. Cancer Drug Targets* *13*, 423–443.
- Chen, W., Xia, P., Wang, H., Tu, J., Liang, X., Zhang, X., and Li, L. (2019). The endothelial tip-stalk cell selection and shuffling during angiogenesis. *J. Cell Commun. Signal.* *13*, 291–301.
- Chen, X., Gao, B., Ponnusamy, M., Lin, Z., and Liu, J. (2017). MEK2 signaling and human diseases. *Oncotarget* *8*, 112152–112165.
- Chen, Y.F., Chiu, W.T., Chen, Y.T., Lin, P.Y., Huang, H.J., Chou, C.Y., Chang, H., Tang, M.J., and Shen, M.R. (2011). Calcium store sensor stromal-interaction molecule 1-dependent signaling plays an important role in cervical cancer growth, migration, and angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 15225–15230.
- Cheng, M., Yang, J., Zhao, X., Zhang, E., Zeng, Q., Yu, Y., Yang, L., Wu, B., Yi, G., Mao, X., et al. (2019). Circulating myocardial microRNAs from infarcted hearts are carried in exosomes and mobilise bone marrow progenitor cells. *Nat. Commun.* *10*.
- Choi, D., Park, E., Jung, E., Seong, Y.J., Hong, M., Lee, S., Burford, J., Gyarmati, G., Peti-Peterdi, J., Srikanth, S., et al. (2017a). ORAI1 Activates Proliferation of Lymphatic Endothelial Cells in Response to Laminar Flow Through Krüppel-Like Factors 2 and 4. *Circ. Res.* *120*, 1426–1439.

Choi, D., Park, E., Jung, E., Seong, Y.J., Yoo, J., Lee, E., Hong, M., Lee, S., Ishida, H., Burford, J., et al. (2017b). Laminar flow downregulates Notch activity to promote lymphatic sprouting. *J. Clin. Invest.* *127*, 1225–1240.

Clauss, M., Weich, H., Breier, G., Knies, U., Röckl, W., Waltenberger, J., and Risau, W. (1996). The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* *271*, 17629–17634.

Dagan, I., and Palty, R. (2021). Regulation of store-operated Ca^{2+} entry by saraf. *Cells* *10*.

Darbellay, B., Arnaudeau, S., König, S., Jousset, H., Bader, C., Demaurex, N., and Bernheim, L. (2009). STIM1- and Orai1-dependent store-operated calcium entry regulates human myoblast differentiation. *J. Biol. Chem.* *284*, 5370–5380.

Davis, G.E., and Camarillo, C.W. (1996). An $\alpha 2\beta 1$ integrin-dependent pinocytic mechanism involving intracellular vacuole formation and coalescence regulates capillary lumen and tube formation in three-dimensional collagen matrix. *Exp. Cell Res.* *224*, 39–51.

Davis, G.E., Kon, W., and Stratman, A.N. (2007). Mechanisms controlling human endothelial lumen formation and tube assembly in three-dimensional extracellular matrices. *Birth Defects Res. Part C - Embryo Today Rev.* *81*, 270–285.

Derler, I., Schindl, R., Fritsch, R., Heftberger, P., Riedl, M.C., Begg, M., House, D., and Romanin, C. (2013). The action of selective CRAC channel blockers is affected by the Orai pore geometry. *Cell Calcium* *53*, 139–151.

Doddaballapur, A., Michalik, K.M., Manavski, Y., Lucas, T., Houtkooper, R.H., You, X., Chen, W., Zeiher, A.M., Potente, M., Dimmeler, S., et al. (2015). Laminar shear stress inhibits endothelial cell metabolism via KLF2-mediated repression of PFKFB3. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *35*, 137–145.

Domínguez-Rodríguez, A., Mayoral-Gonzalez, I., Avila-Medina, J., de Rojas-de Pedro, E.S., Calderón-Sánchez, E., Díaz, I., Hmadcha, A., Castellano, A., Rosado, J.A., Benitah, J.-P., et al. (2018). Urocortin-2 Prevents Dysregulation of Ca²⁺ Homeostasis and Improves Early Cardiac Remodeling After Ischemia and Reperfusion. *Front. Physiol.* 9, 813.

Dvorak, H.F. (2005). Angiogenesis : update 2005. 1835–1842.

Eelen, G., Treps, L., Li, X., and Carmeliet, P. (2020). Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. *Circ. Res.* 310–329.

Failla, C.M., Carbo, M., and Morea, V. (2018). Positive and negative regulation of angiogenesis by soluble vascular endothelial growth factor receptor-1. *Int. J. Mol. Sci.* 19.

Fantin, A., Lampropoulou, A., Gestri, G., Raimondi, C., Senatore, V., Zachary, I., and Ruhrberg, C. (2015). NRP1 Regulates CDC42 Activation to Promote Filopodia Formation in Endothelial Tip Cells. *Cell Rep.* 11, 1577–1590.

Ferrara, N., and Kerbel, R.S. (2005). Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature* 438, 967–974.

Ferraro, B., Leoni, G., Hinkel, R., Ormanns, S., Paulin, N., Ortega-Gomez, A., Viola, J.R., de Jong, R., Bongiovanni, D., Bozoglu, T., et al. (2019). Pro-Angiogenic Macrophage Phenotype to Promote Myocardial Repair. *J. Am. Coll. Cardiol.* 73, 2990–3002.

Feske, S., Gwack, Y., Prakriya, M., Srikanth, S., Puppel, S.-H., Tanasa, B., Hogan, P.G., Lewis, R.S., Daly, M., and Rao, A. (2006). A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* 441, 179–185.

Filippini, A., D'Amore, A., and D'Alessio, A. (2019). Calcium mobilization in endothelial cell functions. *Int. J. Mol. Sci.* 20.

- Fischer, A., and Gessler, M. (2007). Delta-Notch-and then? Protein interactions and proposed modes of repression by Hes and Hey bHLH factors. *Nucleic Acids Res.* *35*, 4583–4596.
- Fischer, C., Mazzone, M., Jonckx, B., and Carmeliet, P. (2008). FLT1 and its ligands VEGFB and PIGF: Drug targets for anti-angiogenic therapy? *Nat. Rev. Cancer* *8*, 942–956.
- Fiúza, U.M., and Arias, A.M. (2007). Cell and molecular biology of Notch. *J. Endocrinol.* *194*, 459–474.
- Folkman, J. (1971). Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* *285*, 1182–1186.
- Folkman, J., and Haudenschild, D.R. (1999). Angiogenesis in vitro. *Hum. Cell Off. J. Hum. Cell Res. Soc.* *12*, 31–35.
- Fukushima, M., Tomita, T., Janoshazi, A., and Putney, J.W. (2012). Alternative translation initiation gives rise to two isoforms of Orai1 with distinct plasma membrane mobilities. *J. Cell Sci.* *125*, 4354–4361.
- Mac Gabhann, F., and S. Popel, A. (2009). Dimerization of VEGF receptors and implications for signal transduction: a computational study. *Biophys Chem.* *128*, 125–139.
- Galeano-Otero, I., Del Toro, R., Khatib, A.M., Rosado, J.A., Ordóñez-Fernández, A., and Smani, T. (2021). SARAF and Orai1 Contribute to Endothelial Cell Activation and Angiogenesis. *Front. Cell Dev. Biol.* *9*, 1–13.
- Gaspar, D., Peixoto, R., De Pieri, A., Striegl, B., Zeugolis, D.I., and Raghunath, M. (2019). Local pharmacological induction of angiogenesis: Drugs for cells and cells as drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* *146*, 126–154.

Gatsiou, A., Sopova, K., Tselepis, A., and Stellos, K. (2021). Interleukin-17a triggers the release of platelet-derived factors driving vascular endothelial cells toward a pro-angiogenic state. *Cells* 10.

Gerhardt, H., Golding, M., Fruttiger, M., Ruhrberg, C., Lundkvist, A., Abramsson, A., Jeltsch, M., Mitchell, C., Alitalo, K., Shima, D., et al. (2003). VEGF guides angiogenic sprouting utilizing endothelial tip cell filopodia. *J. Cell Biol.* 161, 1163–1177.

Gilles, C. (2020). Angiogenesis Analyzer for ImageJ - Gilles Carpentier Research Web Site: Computer Image Analysis.

Girling, J.E., and Rogers, P.A.W. (2005). Recent advances in endometrial angiogenesis research. *Angiogenesis* 8, 89–99.

Goldie, L.C., Nix, M.K., and Hirschi, K.K. (2008). Embryonic vasculogenesis and hematopoietic specification. *Organogenesis* 4, 257–263.

GOULD, D.J., VADAKKAN, T.J., POCHÉ, R.A., and DICKINSON, M.E. (2011). Multifractal and Lacunarity Analysis of Microvascular Morphology and Remodeling. *Microcirculation* 18, 136–151.

Greenberg, J.I., Shields, D.J., Barillas, S.G., Acevedo, L.M., Murphy, E., Huang, J., Schepke, L., Stockmann, C., Johnson, R.S., Angle, N., et al. (2017). A Role for VEGF as a Negative Regulator of Pericyte Function and Vessel Maturation. *Physiol. Behav.* 176, 139–148.

Grépin, R., and Pagès, G. (2009). Le Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF): un modèle de régulation d'expression génique et un marqueur d'agressivité tumorale. Une cible thérapeutique évidente? *J. Soc. Biol.* 203, 181–192.

He, Y., Luo, Y., Tang, S., Rajantie, I., Salven, P., Heil, M., Zhang, R., Luo, D., Li, X., Chi, H., et al. (2006). Critical function of Bmx/Etk in ischemia-mediated arteriogenesis and angiogenesis. *J. Clin. Invest.* 116, 2344.

Hira Lal Goel, and Mercurio, A.M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nat. Rev. Cancer* 13, 871–882.

Howangyin, K.Y., Zlatanova, I., Pinto, C., Ngkelo, A., Cochain, C., Rouanet, M., Vilar, J., Lemitre, M., Stockmann, C., Fleischmann, B.K., et al. (2016). Myeloid-Epithelial-Reproductive Receptor Tyrosine Kinase and Milk Fat Globule Epidermal Growth Factor 8 Coordinately Improve Remodeling after Myocardial Infarction via Local Delivery of Vascular Endothelial Growth Factor. *Circulation* 133, 826–839.

Huber, A.B., Kolodkin, A.L., Ginty, D.D., and Cloutier, J.F. (2003). Signaling at the growth cone: Ligand-receptor complexes and the control of axon growth and guidance. *Annu. Rev. Neurosci.* 26, 509–563.

Hueso, L., Rios-Navarro, C., Ruiz-Sauri, A., Chorro, F.J., Nunez, J., Sanz, M.J., Bodi, V., and Piqueras, L. (2017). Dynamics and implications of circulating anti-angiogenic VEGF-A165b isoform in patients with ST-elevation myocardial infarction. *Sci. Rep.* 7, 1–14.

Ingason, A.B., Goldstone, A.B., Paulsen, M.J., Thakore, A.D., Truong, V.N., Edwards, B.B., Eskandari, A., Bollig, T., Steele, A.N., and Woo, Y.J. (2018). Angiogenesis precedes cardiomyocyte migration in regenerating mammalian hearts. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 155, 1118-1127.e1.

Ispanovic, E., Serio, D., and Haas, T.L. (2008). Cdc42 and RhoA have opposing roles in regulating membrane type 1-matrix metalloproteinase localization and matrix metalloproteinase-2 activation. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 295, 600–610.

J.R., W., and Bar, T. (1972). Seamless Endothelial in Brain Capillaries During Development of the Rat'S Cerebral Cortex. *Brain Res.* 41, 17–24.

Jardin, I., Nieto-Felipe, J., Alvarado, S., Diez-Bello, R., Lopez, J.J., Salido, G.M., Smani, T., and Rosado, J.A. (2021). Saraf and efhb modulate store-operated ca²⁺ entry and are required for cell proliferation, migration and viability in breast cancer

cells. *Cancers (Basel)*. *13*.

Jardín, I., Albarran, L., Salido, G.M., López, J.J., Sage, S.O., and Rosado, J.A. (2018). Fine-tuning of store-operated calcium entry by fast and slow Ca²⁺-dependent inactivation: Involvement of SARAF. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1865*, 463–469.

Jha, A., Ahuja, M., Maléth, J., Moreno Claudia, C., Yuan Joseph, J., Kim, M.S., and Muallem, S. (2013). The STIM1 CTID domain determines access of SARAF to SOAR to regulate Orai1 channel function. *J. Cell Biol.* *202*, 71–78.

Ju, Y., and Allen, D.G. (2007). Store-Operated Ca²⁺ Entry and TRPC Expression; Possible Roles in Cardiac Pacemaker Tissue. *Hear. Lung Circ.* *16*, 349–355.

Kamei, M., Brian Saunders, W., Bayless, K.J., Dye, L., Davis, G.E., and Weinstein, B.M. (2006). Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo. *Nature* *442*, 453–456.

Kao, H.Y., Ordentlich, P., Koyano-Nakagawa, N., Tang, Z., Downes, M., Kintner, C.R., Evans, R.M., and Kadesch, T. (1998). A histone deacetylase corepressor complex regulates the Notch signal transduction pathway. *Genes Dev.* *12*, 2269–2277.

Kierans, S.J., and Taylor, C.T. (2021). Regulation of glycolysis by the hypoxia-inducible factor (HIF): implications for cellular physiology. *J. Physiol.* *599*, 23–37.

Kobayashi, H., DeBusk, L.M., Babichev, Y.O., Dumont, D.J., and Lin, P.C. (2006). Hepatocyte growth factor mediates angiopoietin-induced smooth muscle cell recruitment. *Blood* *108*, 1260–1266.

Kobayashi, K., Maeda, K., Takefuji, M., Kikuchi, R., Morishita, Y., Hirashima, M., and Murohara, T. (2017). Dynamics of angiogenesis in ischemic areas of the infarcted heart. *Sci. Rep.* *7*, 1–13.

Kopan, R. (2012). Notch signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4, a011213.

Korf-Klingebiel, M., Reboll, M.R., Klede, S., Brod, T., Pich, A., Polten, F., Napp, L.C., Bauersachs, J., Ganser, A., Brinkmann, E., et al. (2015). Myeloid-derived growth factor (C19orf10) mediates cardiac repair following myocardial infarction. *Nat. Med.* 21, 140–149.

Kranz, A., Rau, C., Kochs, M., and Waltenberger, J. (2000). Elevation of Vascular Endothelial Growth Factor-A Serum Levels Following Acute Myocardial Infarction. Evidence for its Origin and Functional Significance. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32, 65–72.

Kratsios, P., Catela, C., Salimova, E., Huth, M., Berno, V., Rosenthal, N., and Mourkioti, F. (2010). Distinct roles for cell-autonomous notch signaling in cardiomyocytes of the embryonic and adult heart. *Circ. Res.* 106, 559–572.

Krejčí, A., and Bray, S. (2007). Notch activation stimulates transient and selective binding of Su(H)/CSL to target enhancers. *Genes Dev.* 21, 1322–1327.

Kubis, N., and Levy, B.I. (2003). Vasculogenesis and Angiogenesis: Molecular and Cellular Controls. *Interv. Neuroradiol.* 9, 227–237.

Kubo, H., Fujiwara, T., Jussila, L., Hashi, H., Ogawa, M., Shimizu, K., Awane, M., Sakai, Y., Takabayashi, A., Alitalo, K., et al. (2000). Involvement of vascular endothelial growth factor receptor-3 in maintenance of integrity of endothelial cell lining during tumor angiogenesis. *Blood* 96, 546–553.

Kuo, I.Y.T., Wölfle, S.E., and Hill, C.E. (2011). T-type calcium channels and vascular function: The new kid on the block? *J. Physiol.* 589, 783–795.

Kurotsu, S., Osakabe, R., Isomi, M., Tamura, F., Sadahiro, T., Muraoka, N., Kojima, H., Haginiwa, S., Tani, H., Nara, K., et al. (2018). Distinct expression patterns of Flk1 and Flt1 in the coronary vascular system during development and after myocardial infarction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 495, 884–891.

Lamallice, L., Houle, F., Jourdan, G., and Huot, J. (2004). Phosphorylation of tyrosine 1214 on VEGFR2 is required for VEGF-induced activation of Cdc42 upstream of SAPK2/p38. *Oncogene* 23, 434–445.

Li, H., Liao, Y., Gao, L., Zhuang, T., Huang, Z., Zhu, H., and Ge, J. (2018). Coronary Serum Exosomes Derived from Patients with Myocardial Ischemia Regulate Angiogenesis through the miR-939-mediated Nitric Oxide Signaling Pathway. *Theranostics* 8, 2079.

Li, J., Brown, L.F., Hibberd, M.G., Grossman, J.D., Morgan, J.P., and Simons, M. (1996). VEGF, flk-1, and flt-1 expression in a rat myocardial infarction model of angiogenesis. *Am. J. Physiol. - Hear. Circ. Physiol.* 270.

Li, J., Cubbon, R.M., Wilson, L.A., Amer, M.S., McKeown, L., Hou, B., Majeed, Y., Tumova, S., Seymour, V.A.L., Taylor, H., et al. (2011a). Orai1 and CRAC Channel Dependence of VEGF-Activated Ca²⁺ Entry and Endothelial Tube Formation. *Circ. Res.* 108, 1190–1198.

Li, J., Cubbon, R.M., Wilson, L.A., Amer, M.S., McKeown, L., Hou, B., Majeed, Y., Tumova, S., Seymour, V.A.L., Taylor, H., et al. (2011b). Orai1 and CRAC channel dependence of VEGF-activated Ca²⁺ entry and endothelial tube formation. *Circ. Res.* 108, 1190–1198.

Li, Y., Hiroi, Y., Ngoy, S., Okamoto, R., Noma, K., Wang, C.-Y., Wang, H.-W., Zhou, Q., Radtke, F., Liao, R., et al. (2011c). Notch1 in Bone Marrow-derived Cells Mediates Cardiac Repair Following Myocardial Infarction. *Circulation* 123, 866–876.

Li, Z., Solomonidis, E.G., Meloni, M., Taylor, R.S., Duffin, R., Dobie, R., Magalhaes, M.S., Henderson, B.E.P., Louwe, P.A., D'Amico, G., et al. (2019). Single-cell transcriptome analyses reveal novel targets modulating cardiac neovascularization by resident endothelial cells following myocardial infarction. *Eur. Heart J.* 40, 2507–2520.

- Lindsell, C.E., Shawber, C.J., Boulter, J., and Weinmaster, G. (1995). Jagged: A mammalian ligand that activates notch1. *Cell* 80, 909–917.
- Liu, B., Wang, L., Jiang, W., Xiong, Y., Pang, L., Zhong, Y., Zhang, C., Ou, W., Tian, C., Chen, X., et al. (2019). Myocyte enhancer factor 2A delays vascular endothelial cell senescence by activating the PI3K/p-Akt/SIRT1 pathway. *Aging (Albany, NY)*. 11, 3768–3784.
- Liu, S., Chen, J., Shi, J., Zhou, W., Wang, L., Fang, W., Zhong, Y., Chen, X., Chen, Y., Sabri, A., et al. (2020). M1-like macrophage-derived exosomes suppress angiogenesis and exacerbate cardiac dysfunction in a myocardial infarction microenvironment. *Basic Res. Cardiol.* 115, 1–17.
- Liu, X., Wan, X., Kan, H., Wang, Y., Yu, F., Feng, L., Jin, J., Zhang, P., and Ma, X. (2018). Hypoxia-induced upregulation of Orai1 drive Schneider, S. I. dos R., Silvello, D., Martinelli, N. C., Garbin, A., Biolo, A., Clausell, N., ... Rohde, L. E. (2018). *Molecular medicine reports*. Molecular Medicine Reports (Vol. 17). D.A. Spandidos. Retrieved fr. *Eur. J. Pharmacol.*
- Liu, Z.-J., Shirakawa, T., Li, Y., Soma, A., Oka, M., Dotto, G.P., Fairman, R.M., Velazquez, O.C., and Herlyn, M. (2003). Regulation of Notch1 and Dll4 by Vascular Endothelial Growth Factor in Arterial Endothelial Cells: Implications for Modulating Arteriogenesis and Angiogenesis . *Mol. Cell. Biol.* 23, 14–25.
- Lodola, F., Laforenza, U., Bonetti, E., Lim, D., Dragoni, S., Bottino, C., Ong, H.L., Guerra, G., Ganini, C., Massa, M., et al. (2012). Store-Operated Ca²⁺ Entry Is Remodelled and Controls In Vitro Angiogenesis in Endothelial Progenitor Cells Isolated from Tumoral Patients. *PLoS One* 7, e42541.
- Logsdon, E.A., Finley, S.D., Popel, A.S., and MacGabhann, F. (2014). A systems biology view of blood vessel growth and remodelling. *J. Cell. Mol. Med.* 18, 1491–1508.

- Lopez, J.J., Jardin, I., Sanchez-Collado, J., Salido, G.M., Smani, T., and Rosado, J.A. (2020). TRPC Channels in the SOCE Scenario. *Cells* *9*, 1–13.
- Loyer, X., Zlatanova, I., Devue, C., Yin, M., Howangyin, K.Y., Klaihmon, P., Guerin, C.L., Khelouf, M., Vilar, J., Zannis, K., et al. (2018). Intra-cardiac release of extracellular vesicles shapes inflammation following myocardial infarction short communication. *Circ. Res.* *123*, 100–106.
- Lu, Y.W., Martino, N., Gerlach, B.D., Lamar, J.M., Vincent, P.A., Adam, A.P., and Schwarz, J.J. (2021). MEF2 (Myocyte Enhancer Factor 2) Is Essential for Endothelial Homeostasis and the Atheroprotective Gene Expression Program. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *2*, 1105–1123.
- Mack, J.J., and Luisa Iruela-Arispe, M. (2018). NOTCH regulation of the endothelial cell phenotype. *Curr. Opin. Hematol.* *25*, 212–218.
- Mailhos, C., Modlich, U., Lewis, J., Harris, A., Bicknell, R., and Ish-Horowicz, D. (2001). Delta4, an endothelial specific Notch ligand expressed at sites of physiological and tumor angiogenesis. *Differentiation* *69*, 135–144.
- Maisonpierre, P.C., Suri, C., Jones, P.F., Bartunkova, S., Wiegand, S.J., Radziejewski, C., Compton, D., McClain, J., Aldrich, T.H., Papadopoulos, N., et al. (1997). Angiopoietin-2, a Natural Antagonist for Tie2 That Disrupts in vivo Angiogenesis. *Science* (80-.). *277*, 55–60.
- Makarewich, C.A., Zhang, H., Davis, J., Correll, R.N., Trapanese, D.M., Hoffman, N.E., Troupes, C.D., Berretta, R.M., Kubo, H., Madesh, M., et al. (2014). Transient Receptor Potential Channels Contribute to Pathological Structural and Functional Remodeling After Myocardial Infarction. *Circ. Res.* *115*, 567–580.
- Mamer, S.B., Wittenkeller, A., and Imoukhuede, P.I. (2020). VEGF-A splice variants bind VEGFRs with differential affinities. *Sci. Rep.* *10*, 1–8.

Medina Leyte, D.J., Domínguez Pérez, M., Mercado, I., Villarreal Molina, M.T., and Jacobo Albavera, L. (2020). applied sciences Use of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as a Model to Study Cardiovascular Disease : Appl. Sci.

Meloni, M., Caporali, A., Graiani, G., Lagrasta, C., Katare, R., Van Linthout, S., Spillmann, F., Campesi, I., Madeddu, P., Quaini, F., et al. (2010). Nerve growth factor promotes cardiac repair following myocardial infarction. *Circ. Res.* 106, 1275–1284.

Mignen, O., Thompson, J.L., and Shuttleworth, T.J. (2009). The molecular architecture of the arachidonate-regulated Ca²⁺-selective ARC channel is a pentameric assembly of Orai1 and Orai3 subunits. *J. Physiol.* 587, 4181–4197.

Miquerol, L., Thireau, J., Bideaux, P., Sturny, R., Richard, S., and Kelly, R.G. (2015). Endothelial plasticity drives arterial remodeling within The endocardium after myocardial infarction. *Circ. Res.* 116, 1765–1771.

Moccia, F., Negri, S., Shekha, M., Faris, P., and Guerra, G. (2019). Endothelial Ca²⁺ Signaling, Angiogenesis and Vasculogenesis: just What It Takes to Make a Blood Vessel. *Int. J. Mol. Sci.* 20, 3962.

Moya, I.M., Umans, L., Maas, E., Pereira, P.N.G., Beets, K., Francis, A., Sents, W., Robertson, E.J., Mummery, C.L., Huylebroeck, D., et al. (2012). Stalk Cell Phenotype Depends on Integration of Notch and Smad1/5 Signaling Cascades. *Dev. Cell* 22, 501–514.

Mumm, J.S., and Kopan, R. (2000). Notch signaling: From the outside in. *Dev. Biol.* 228, 151–165.

Muñoz-Chápuli, R. (2011). Evolution of angiogenesis. *Int. J. Dev. Biol.* 55, 345–351.

Muñoz-Chápuli, R., Carmona, R., Guadix, J.A., Macías, D., and Pérez-Pomares, J.M. (2005). The origin of the endothelial cells: An evo-devo approach for the

invertebrate/vertebrate transition of the circulatory system. *Evol. Dev.* 7, 351–358.

Muramatsu, M., Yamamoto, S., Osawa, T., and Shibuya, M. (2010). Vascular endothelial growth factor receptor-1 signaling promotes mobilization of macrophage lineage cells from bone marrow and stimulates solid tumor growth. *Cancer Res.* 70, 8211–8221.

Naito, H., Iba, T., and Takakura, N. (2021). Mechanisms of new blood-vessel formation and proliferative heterogeneity of endothelial cells. *Int. Immunol.* 32, 295–305.

Nishida, M., Ishikawa, T., Saiki, S., Sunggip, C., Aritomi, S., Harada, E., Kuwahara, K., Hirano, K., Mori, Y., and Kim-Mitsuyama, S. (2013). Voltage-dependent N-type Ca^{2+} channels in endothelial cells contribute to oxidative stress-related endothelial dysfunction induced by angiotensin II in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 210–216.

Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., and Kojiro, M. (2006). Angiogenesis in cancer. *Vasc. Health Risk Manag.* 2, 213–219.

Niu, J., Han, X., Qi, H., Yin, J., Zhang, Z., and Zhang, Z. (2016). Correlation between vascular endothelial growth factor and long-term prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Exp. Ther. Med.* 12, 475–479.

Norton, K.A., and Popel, A.S. (2016). Effects of endothelial cell proliferation and migration rates in a computational model of sprouting angiogenesis. *Sci. Rep.* 6, 1–10.

Pafumi, I., Favia, A., Gambarà, G., Papacci, F., Ziparo, E., Palombi, F., and Filippini, A. (2015). Regulation of Angiogenic Functions by Angiopoietins through Calcium-Dependent Signaling Pathways.

Pallavi, S.K., Ho, D.M., Hicks, C., Miele, L., and Artavanis-Tsakonas, S. (2012).

Notch and Mef2 synergize to promote proliferation and metastasis through JNK signal activation in *Drosophila*. *EMBO J.* 31, 2895–2907.

Palty, R., Raveh, A., Kaminsky, I., Meller, R., and Reuveny, E. (2012). SARAF inactivates the store operated calcium entry machinery to prevent excess calcium refilling. *Cell* 149, 425–438.

Pan, H., and Zhang, M. (2018). Serum of coronary atherosclerotic heart disease patients induces oxidative stress injury on endothelial cells. *Pteridines* 29, 97–103.

Pan, B., Shen, J., Cao, J., Zhou, Y., Shang, L., Jin, S., Cao, S., Che, D., Liu, F., and Yu, Y. (2015). Interleukin-17 promotes angiogenesis by stimulating VEGF production of cancer cells via the STAT3/GIV signaling pathway in non-small-cell lung cancer. *Sci. Reports* 2015 51 5, 1–13.

Park, J.E., Keller, G.A., and Ferrara, N. (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: Differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol. Biol. Cell* 4, 1317–1326.

Peach, C.J., Mignone, V.W., Arruda, M.A., Alcobia, D.C., Hill, S.J., Kilpatrick, L.E., and Woolard, J. (2018). Molecular pharmacology of VEGF-A isoforms: Binding and signalling at VEGFR2. *Int. J. Mol. Sci.* 19.

Pega, F., Náfrádi, B., Momen, N.C., Ujita, Y., Streicher, K.N., Prüss-Üstün, A.M., Descatha, A., Driscoll, T., Fischer, F.M., Godderis, L., et al. (2021). Global, regional, and national burdens of ischemic heart disease and stroke attributable to exposure to long working hours for 194 countries, 2000–2016: A systematic analysis from the WHO/ILO Joint Estimates of the Work-related Burden of Disease and Injury. *Environ. Int.* 154, 106595.

Phng, L., Potente, M., Leslie, J.D., Babbage, J., Nyqvist, D., Lovob, I., Ondr, J.K., Rao, S., Lang, R.A., Thurston, G., et al. (2009). Nrp coordinates endothelial Notch

and Wnt signaling to control vessel density in angiogenesis. *Dev. Cell* 16, 70–82.

Prakriya, M., and Lewis, R.S. (2015). Store-Operated Calcium Channels. *Physiol. Rev.* 95, 1383–1436.

Putney, J.W. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7, 1–12.

Putney, J.W. (2011). Origins of the concept of store-operated calcium entry. *Front. Biosci.* S3, 980.

Ríos-Navarro, C., Hueso, L., Miñana, G., Núñez, J., Ruiz-Saurí, A., Sanz, M.J., Cànoves, J., Chorro, F.J., Piqueras, L., and Bodí, V. (2018). Coronary Serum Obtained After Myocardial Infarction Induces Angiogenesis and Microvascular Obstruction Repair. Role of Hypoxia-inducible Factor-1A. *Rev. Esp. Cardiol.* 71, 440–449.

Risau, W., and Flamme, I. (1995). Vasculogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 11, 73–91.

Robak, E., Kulczycka-Siennicka, L., Gerlicz, Z., Kierstan, M., Korycka-Wolowiec, A., and Sysa-Jedrzejowska, A. (2013). Correlations between concentrations of interleukin (IL)-17A, IL-17B and IL-17F, and endothelial cells and proangiogenic cytokines in systemic lupus erythematosus patients. *Eur. Cytokine Netw.* 24, 60–68.

Robbers, L.F.H.J., Eerenberg, E.S., Teunissen, P.F.A., Jansen, M.F., Hollander, M.R., Horrevoets, A.J.G., Knaapen, P., Nijveldt, R., Heymans, M.W., Levi, M.M., et al. (2013). Magnetic resonance imaging-defined areas of microvascular obstruction after acute myocardial infarction represent microvascular destruction and haemorrhage. *Eur. Heart J.* 34, 2346–2353.

Rodriguez, L.G., Wu, X., and Guan, J.L. (2005). Wound-healing assay. *Methods Mol. Biol.* 294, 23–29.

Roos, J., DiGregorio, P.J., Yeromin, A. V., Ohlsen, K., Liudyno, M., Zhang, S., Safrina, O., Kozak, J.A., Wagner, S.L., Cahalan, M.D., et al. (2005). STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J. Cell Biol.* 169, 435–445.

Rosado, J.A., Diez, R., Smani, T., and Jardín, I. (2016). STIM and orai1 variants in store-operated calcium entry. *Front. Pharmacol.* 6, 1–9.

Sabourin, J., Bartoli, F., Antigny, F., Gomez, A.M., and Benitah, J.-P. (2016). Transient Receptor Potential Canonical (TRPC)/Orai1-dependent Store-operated Ca²⁺ Channels: NEW TARGETS OF ALDOSTERONE IN CARDIOMYOCYTES. *J. Biol. Chem.* 291, 13394–13409.

Sacilotto, N., Chouliaras, K.M., Nikitenko, L.L., Lu, Y.W., Fritzsche, M., Wallace, M.D., Nornes, S., García-Moreno, F., Payne, S., Bridges, E., et al. (2016). MEF2 transcription factors are key regulators of sprouting angiogenesis. *Genes Dev.* 30, 2297–2309.

Saleh, S.N., Albert, A.P., Peppiatt-Wildman, C.M., and Large, W.A. (2008). Diverse properties of store-operated TRPC channels activated by protein kinase C in vascular myocytes. *J. Physiol.* 586, 2463–2476.

Sanchez-Collado, J., Lopez, J.J., Jardin, I., Camello, P.J., Falcon, D., Regodon, S., Salido, G.M., Smani, T., and Rosado, J.A. (2019). Adenylyl cyclase type 8 overexpression impairs phosphorylation-dependent orai1 inactivation and promotes migration in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancers (Basel)*. 11, 1–24.

Sanchez-Collado, J., Lopez, J.J., Jardin, I., Berna-Erro, A., Camello, P.J., Cantonero, C., Smani, T., Salido, G.M., and Rosado, J.A. (2022). Orai1 α , but not Orai1 β , co-localizes with TRPC1 and is required for its plasma membrane location and activation in HeLa cells. *Cell. Mol. Life Sci.* 79, 1–16.

Sangwung, P., Zhou, G., Nayak, L., Chan, E.R., Kumar, S., Kang, D.W., Zhang, R.,

- Liao, X., Lu, Y., Sugi, K., et al. (2017). KLF2 and KLF4 control endothelial identity and vascular integrity. *JCI Insight* 2.
- Savage, A.M., Kurusamy, S., Chen, Y., Jiang, Z., Chhabria, K., MacDonald, R.B., Kim, H.R., Wilson, H.L., van Eeden, F.J.M., Armesilla, A.L., et al. (2019). tmem33 is essential for VEGF-mediated endothelial calcium oscillations and angiogenesis. *Nat. Commun.* 10, 1–15.
- Schmittgen, T.D., and Livak, K.J. (2008). Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* 3, 1101–1108.
- Seidel, T., Edelmann, J.-C., and Sachse, F.B. (2016). Analyzing Remodeling of Cardiac Tissue: A Comprehensive Approach Based on Confocal Microscopy and 3D Reconstructions. *Annu. Biomed. Eng.* 44, 1436–1448.
- Sekiya, F. (2013). Phospholipase C. *Encycl. Biol. Chem. Second Ed.* 3, 467–471.
- Shen, J., Rossato, F.A., Cano, I., and Ng, Y.S.E. (2021). Novel engineered, membrane-tethered VEGF-A variants promote formation of filopodia, proliferation, survival, and cord or tube formation by endothelial cells via persistent VEGFR2/ERK signaling and activation of CDC42/ROCK pathways. *FASEB J.* 35, e22036.
- Shi, Y.H., and Fang, W.G. (2004). Hypoxia-inducible factor-1 in tumour angiogenesis. *World J. Gastroenterol.* 10, 1082–1087.
- Shi, L., Li, B., Chen, G., Huang, Y., Tian, Z., Zhang, L., Tian, L., and Fu, Q. (2022). MEF2D Participates in Microglia-Mediated Neuroprotection in Cerebral Ischemia-Reperfusion Rats. *Shock* 57, 118–130.
- Shutter, J.R., Scully, S., Fan, W., Richards, W.G., Kitajewski, J., Deblandre, G.A., Kintner, C.R., and Stark, K.L. (2000). Dll4, a novel Notch ligand expressed in arterial endothelium. *Genes Dev.* 14, 1313–1318.

- Siemerink, M.J., Klaassen, I., van Noorden, C.J.F., and Schlingemann, R.O. (2013). Endothelial Tip Cells in Ocular Angiogenesis: Potential Target for Anti-Angiogenesis Therapy. *J. Histochem. Cytochem.* *61*, 101–115.
- Simon, T., Taleb, S., Danchin, N., Laurans, L., Rousseau, B., Cattan, S., Montely, J.M., Dubourg, O., Tedgui, A., Kotti, S., et al. (2013). Circulating levels of interleukin-17 and cardiovascular outcomes in patients with acute myocardial infarction. *Eur. Heart J.* *34*, 570–577.
- Smani, T., Gómez, L.J., Regodon, S., Woodard, G.E., Siegfried, G., Khatib, A.M., and Rosado, J.A. (2018a). Trp channels in angiogenesis and other endothelial functions. *Front. Physiol.* *9*, 1731.
- Smani, T., Gómez, L.J., Regodon, S., Woodard, G.E., Siegfried, G., Khatib, A.-M., and Rosado, J.A. (2018b). TRP Channels in Angiogenesis and Other Endothelial Functions. *Front. Physiol.* *9*, 1731.
- De Smet, F., Segura, I., De Bock, K., Hohensinner, P.J., and Carmeliet, P. (2009). Mechanisms of vessel branching: Filopodia on endothelial tip cells lead the way. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* *29*, 639–649.
- Song, N., Huang, Y., Shi, H., Yuan, S., Ding, Y., Song, X., Fu, Y., and Luo, Y. (2009). Overexpression of platelet-derived growth factor-BB increases tumor pericyte content via stromal-derived factor-1 α /CXCR4 axis. *Cancer Res.* *69*, 6057–6064.
- Stapor, P., Wang, X., Goveia, J., Moens, S., and Carmeliet, P. (2014). Angiogenesis revisited – role and therapeutic potential of targeting endothelial metabolism. *J. Cell Sci.* *127*, 4331–4341.
- Staton, C.A., Reed, M.W.R., and Brown, N.J. (2009). A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int. J. Exp. Pathol.* *90*, 195–221.
- Sun, X., and Kaufman, P.D. (2018). Ki-67: more than a proliferation marker.

Chromosoma 127, 175.

Takeshita, K., Satoh, M., Ii, M., Silver, M., Limbourg, F.P., Mukai, Y., Rikitake, Y., Radtke, F., Gridley, T., Losordo, D.W., et al. (2007). Critical Role of Endothelial Notch1 Signaling in Postnatal Angiogenesis. *Circ. Res.* 100, 70.

Tammela, T., Zarkada, G., Wallgard, E., Murtomäki, A., Suchting, S., Wirzenius, M., Waltari, M., Hellström, M., Schomber, T., Peltonen, R., et al. (2008). Blocking VEGFR-3 suppresses angiogenic sprouting and vascular network formation. *Nature* 454, 656–660.

Teichert, M., Milde, L., Holm, A., Stanicek, L., Gengenbacher, N., Savant, S., Ruckdeschel, T., Hasanov, Z., Srivastava, K., Hu, J., et al. (2017). Pericyte-expressed Tie2 controls angiogenesis and vessel maturation. *Nat. Commun.* 8, 1–12.

Teleanu, R.I., Chircov, C., Grumezescu, A.M., and Teleanu, D.M. (2020). Tumor angiogenesis and anti-angiogenic strategies for cancer treatment. *J. Clin. Med.* 9.

del Toro, R. Del, Galeano-otero, I., Bevilacqua, E., Guerrero-Márquez, F., Falcon, D., Guisado-Risco, A., Díaz-de la Llera, L., Barón-Esquivias, G., Smani, T., and Ordóñez-fernández, A. (2022). Predicted Value of MicroRNAs , Vascular Endothelial Growth Factor , and Intermediate Monocytes in the Left Adverse Ventricular Remodeling in Revascularized ST-Segment Elevation Myocardial Infarction Patients. 9, 1–12.

Del Toro, R., Prahst, C., Mathivet, T., Siegfried, G., Kaminker, J.S., Larrivee, B., Breant, C., Duarte, A., Takakura, N., Fukamizu, A., et al. (2010). Identification and functional analysis of endothelial tip cell-enriched genes. *Blood* 116, 4025–4033.

Tran, Q.K., Ohashi, K., and Watanabe, H. (2000). Calcium signalling in endothelial cells. *Cardiovasc. Res.* 48, 13–22.

- Trebak, M. (2008). STIM1/Orai1, ICRAC and Endothelial SOC. *Circ. Res.* 23, e56–e57.
- Tung, J.J., Tattersall, I.W., and Kitajewski, J. (2012). Fate determination and mechanisms of tubulogenesis during angiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 1–14.
- Upadhyay, N., Tilekar, K., Safuan, S., Kumar, A.P., Stalin, J., Ruegg, C., and Ramaa, C. (2021). Recent Anti-angiogenic Drug Discovery Efforts To Combat Cancer. *ChemistrySelect* 6, 5689–5700.
- Vashisht, A., Trebak, M., and Motiani, R.K. (2015). STIM and orai proteins as novel targets for cancer therapy. A review in the theme: Cell and molecular processes in cancer metastasis. *Am. J. Physiol. - Cell Physiol.* 309, C457–C469.
- Werner Risau (1997). Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386, 671–674.
- Wu, B., Ramaiah, A., Garcia, G., Hasiakos, S., Arumugaswami, V., and Srikanth, S. (2022). ORAI1 Limits SARS-CoV-2 Infection by Regulating Tonic Type I IFN Signaling. *J. Immunol.* 208, 74–84.
- Wu, L.W., Mayo, L.D., Dunbar, J.D., Kessler, K.M., Baerwald, M.R., Jaffe, E.A., Wang, D., Warren, R.S., and Donner, D.B. (2000). Utilization of distinct signaling pathways by receptors for vascular endothelial cell growth factor and other mitogens in the induction of endothelial cell proliferation. *J. Biol. Chem.* 275, 5096–5103.
- Wu, X., Reboll, M.R., Korf-Klingebiel, M., and Wollert, K.C. (2021). Angiogenesis after acute myocardial infarction. *Cardiovasc. Res.* 117, 1257–1273.
- Xie, X., Zhu, T., Chen, L., Ding, S., Chu, H., Wang, J., Yao, H., and Chao, J. (2018). MCP1-induced autophagy mediates ischemia/reperfusion injury in endothelial cells via HMGB1 and CaSR. *Sci. Rep.* 8, 1–12.

Yao, X.X., Lu, J.B., Ye, Z.D., Zheng, L., Wang, Q., Lin, Z.Q., Liu, H., Wan, H., Fu, F.Y., Huang, X.Y., et al. (2017). Hairy/enhancer of Split Homologue-1 Suppresses Vascular Endothelial Growth Factor-induced Angiogenesis via Downregulation of Osteopontin Expression. *Sci. Rep.* 7, 1–12.

Ye, J., Huang, J., He, Q., Zhao, W., Zhou, X., Zhang, Z., Li, Y., Wei, J., and Zhang, J. (2018). Blockage of store-operated Ca^{2+} entry antagonizes Epstein–Barr virus-promoted angiogenesis by inhibiting Ca^{2+} signaling-regulated VEGF production in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Manag. Res.* 10, 1115–1124.

Yokota, Y., Nakajima, H., Wakayama, Y., Muto, A., Kawakami, K., Fukuhara, S., and Mochizuki, N. (2015). Endothelial Ca^{2+} oscillations reflect VEGFR signaling-regulated angiogenic capacity in vivo. *Elife* 4, 1–26.

Yoo, S.Y., and Kwon, S.M. (2013). Angiogenesis and its therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm.* 2013.

Youvella, S., Aman, A.K., and Akbar, N. (2021). Correlation between Increased Serum Vascular Endothelial Growth Factor Levels and 30-Day-Outcome After Acute Myocardial Infarction. *Indones. J. Clin. Pathol. Med. Lab.* 27, 265–270.

Zarkada, G., Howard, J.P., Xiao, X., Park, H., Bizou, M., Leclerc, S., Künzel, S.E., Boisseau, B., Li, J., Cagnone, G., et al. (2021). Specialized endothelial tip cells guide neuroretina vascularization and blood-retina-barrier formation. *Dev. Cell* 56, 2237–2251.e6.

Zecchin, A., Kalucka, J., Dubois, C., and Carmeliet, P. (2017). How endothelial cells adapt their metabolism to form vessels in tumors. *Front. Immunol.* 8.

Zhang, H., He, Y., Dai, S., Xu, Z., Luo, Y., Wan, T., Luo, D., Jones, D., Tang, S., Chen, H., et al. (2008). AIP1 functions as an endogenous inhibitor of VEGFR2-mediated signaling and inflammatory angiogenesis in mice. *J. Clin. Invest.* 118, 3904–3916.

- Zhang, J., Yao, C., Chen, J., Zhang, Y., Yuan, S., and Lin, Y. (2016). Hyperforin promotes post-stroke functional recovery through interleukin (IL)-17A-mediated angiogenesis. *Brain Res.* 1646, 504–513.
- Zhang, X., Xin, P., Yoast, R.E., Emrich, S.M., Johnson, M.T., Pathak, T., Benson, J.C., Azimi, I., Gill, D.L., and Monteith, G.R. (2020). Distinct pharmacological profiles of ORAI1, ORAI2, and ORAI3 channels. *Cell Calcium* 91, 102281.
- Zhao, T., Zhao, W., Chen, Y., Liu, L., Ahokas, R.A., and Sun, Y. (2013). Differential Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Isoforms and Receptor Subtypes in the Infarcted Heart. *Int. J. Car* 167, 2638–2645.
- Zhou, H.J., Xu, Z., Wang, Z., Zhang, H., Simons, M., and Min, W. (2018a). SUMOylation of VEGFR2 regulates its intracellular trafficking and pathological angiogenesis. *Nat. Commun.* 9.
- Zhou, M.H., Zheng, H., Si, H., Jin, Y., Peng, J.M., He, L., Zhou, Y., Muñoz-Garay, C., Zawieja, D.C., Kuo, L., et al. (2014). Stromal interaction molecule 1 (STIM1) and Orai1 mediate histamine-evoked calcium entry and nuclear factor of activated T-cells (NFAT) signaling in human umbilical vein endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 289, 29446–29456.
- Zhou, X. liang, Zhu, R. rong, Liu, S., Xu, H., Xu, X., Wu, Q. cai, and Liu, J. chun (2018b). Notch signaling promotes angiogenesis and improves cardiac function after myocardial infarction. *J. Cell. Biochem.* 119, 7105–7112.
- Zhou, Y., Ramachandran, S., Oh-hora, M., Rao, A., and Hogan, P.G. (2010). Pore architecture of the ORAI1 store-operated calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107, 4896–4901.
- Zhu, T., Yao, Q., Hu, X., Chen, C., Yao, H., and Chao, J. (2015). The Role of MCPIP1 in Ischemia/Reperfusion Injury-Induced HUVEC Migration and Apoptosis. *Cell. Physiol. Biochem.* 37, 577–591.

Zomot, E., Achildiev Cohen, H., Dagan, I., Militsin, R., and Palty, R. (2021). Bidirectional regulation of calcium release-activated calcium (CRAC) channel by SARAF. *J. Cell Biol.* 220.

Zudaire, E., Gambardella, L., Kurcz, C., and Vermeren, S. (2011). A computational tool for quantitative analysis of vascular networks. *PLoS One* 6.