



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIOLOGÍA

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN TROMBOSIS
HEMOSTASIA Y ATEROGÉNESIS, HOSPITAL GENERAL REGIONAL
No. 1. "DR. CARLOS MAC GREGOR SÁNCHEZ NAVARRO" IMSS.

**Generación y caracterización de células
formadoras de colonias
endoteliales a partir de sangre periférica de
pacientes con trombosis.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGA

P R E S E N T A :

HERNÁNDEZ CONTRERAS MARÍA DE LOS ÁNGELES

DIRECTOR DE TESIS

DR. JOSÉ ANTONIO
ALVARADO MORENO

ASESOR INTERNO

DRA. ROSALVA RANGEL
CORONA



MÉXICO, D.F. MARZO 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis (UIMTHA), del Hospital Regional no. 1, "Dr. Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro" del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

La investigación se realizó bajo la dirección de **Dr. José Antonio Alvarado Moreno**, a quien agradezco la oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, agradezco su confianza, su apoyo, la paciencia que me brindó durante mi estancia en la unidad y sobre todo el entusiasmo transmitido en cada una de las nuevas aportaciones, agradezco la formación que me brindó en este largo camino que es la investigación.

Sin duda, agradezco a cada uno de los miembros del jurado, el **Dr. José Antonio Alvarado Moreno**, la **Dra. Rosalva Rangel Corona**, el **M. en C. Edgar Ledesma Martínez**, el **Biol. Vicente Misael Hernández**, el **M. C Raúl Zavala Chavero**, por las observaciones, el tiempo, la comprensión y la dedicación que depositaron en este trabajo.

A mis amigos y compañeros que también son parte importante en este trabajo, **la Biol. Alicia López Díaz**, el **QFB. Pedro Cardoso Solís**, el **M. en C. Rubicel Hernández López**, agradezco a ustedes sus enseñanzas, los consejos, las risas y por hacer de cada día en el laboratorio una nueva experiencia.

Agradezco mucho a la **Dra. Antonieta Chávez González** y a su grupo de trabajo por cada una de sus observaciones por el tiempo dedicado, y por todo el apoyo que me brindaron durante este tiempo.

También debo agradecer al **Dr. Abraham Majluf Cruz**, por ser una guía en este trabajo de investigación, agradezco sus enseñanzas, su confianza y apoyo.

Debo un especial agradecimiento al **Dr. Edelmiro Santiago Osorio**, por ser uno de los pilares en mi formación como investigadora, agradezco el tiempo que me permitió estar en su laboratorio, agradezco todas y cada una de sus enseñanzas y la motivación que día con día depositaba en cada uno de nosotros.

A todos ustedes gracias han sido una fuente de enseñanzas.

DEDICATORIA

A **Dios** por demostrarme tantas veces su infinita existencia y con ello darme fuerzas para salir adelante de cada tropiezo, por darme el regalo más valioso, la vida y dentro de ella grandes bendiciones.

A **mis papas** Cristina Contreras Contreras y Jesús Hernández Hernández ustedes son mis maestros y gracias a su gran ejemplo y enseñanzas he llegado hasta aquí. Agradezco su inmenso amor, la paciencia con que me educaron, admiro el esfuerzo que día con día han hecho hasta el día de hoy para que salgamos adelante, admiro su fortaleza y el entusiasmo con que enfrentan la vida, agradezco a Dios que a pesar de todos los momentos difíciles que hemos vivido, sigamos firmes y hacia adelante. Este día especial en mi vida es gracias a ustedes, también es su logro el premio es suyo. Los amo mucho, gracias por todo!

A **mi familia**, mis hermanos Ricardo, David, Javier † y Pablo, a mis cuñadas Rosaura Sánchez y Mayra López, a mis tíos y primos en especial a Gaby y Martha agradezco su apoyo, los consejos, las risas, la alegría, y sobre todas las cosas el amor y las enseñanzas que cada uno de ustedes ha sabido darme. El enseñarme que la vida es un pequeño instante, y que aunque estemos lejos físicamente siempre estarán en mi corazón los amo y gracias.

A mi novio y amigo **Reynaldo Tiburcio** por llegar a mi vida, por ser una fuente de admiración y motivación, por tu apoyo y cariño gracias. Por enseñarme que todo lo que nos propongamos en la vida lo podemos alcanzar. Te quiero mucho!

A **mis amigos** Verónica Cruz D., Leticia Hernández T., Lirio Peña R., Sergio Martínez M., Cesar Fernández M., Daniel Hernández de Catilla, Mireya Rodríguez, Ana L. Zeferino, Guadalupe Tellez, Alicia López D. Pedro Cardoso S., Rubicel Hernández, Francisco Hernández, Viridiana Enríquez, Claudia Cordero, Liliana Villaseñor, Eladia Ibarra, Sandy Gutiérrez y Adriana Chávez e Isela por haber llegado a mi vida, por compartir con ustedes momentos agradables y momentos tristes, por escucharme y tener siempre el mejor consejo, por su cariño y apoyo, por dejar huella en mi vida por todo esto y mucho mas gracias.

El camino del Tao

“Sabio es el que conoce a los demás.

Iluminado, el que se conoce a sí mismo.

Fuerte es el que vence a los otros. Poderoso, el que se vence a sí mismo.

Rico es el que conoce la alegría.

Hombre de voluntad, el que se mantiene en su camino.

Sé humilde y permanecerás integro.

Inclínate, y permanecerás recto.

Vacíate, y permanecerás lleno.

Gástate, y permanecerás nuevo.

El sabio no se exhibe y por eso brilla.

No quiere destacar y por eso destaca.

No se aprecia y por eso es apreciado.

Y por qué no compite nadie en el mundo puede competir con él”

Lao Tze

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO	
Hemostasia.....	5
Trombosis.....	7
Endotelio vascular estructura y función.....	10
Células progenitoras endoteliales.....	13
JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVOS.....	19
II. MÉTODO	
Obtención de muestras de Sangre periférica.....	20
Obtención de Células Mononucleares.....	20
Generación de CFCE.....	21
Clonación de CFCE.....	21
Obtención y cultivo de HUVEC.....	22
Morfología de CFCE en cultivo.....	23
Inmunofenotipo de CFCE.....	23
Ensayo de estructuras tubulares <i>in vitro</i>	24
Análisis estadístico.....	24

III.	RESULTADOS	
	Cultivo de CMN y generación de CFCE.....	25
	Frecuencia de CFCE.....	30
	Inmunofenotipo de CFCE.....	33
	Formación de estructuras tubulares in vitro.....	38
IV.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	40
	Cultivo y morfología de CPE.....	41
	Inmunofenotipo.....	44
	Formación de estructuras tubulares.....	46
V.	CONCLUSIONES.....	48
VI.	PERSPECTIVAS.....	49
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	50

ABREVIATURAS

APC	Alofococianina
CAC	Células angiogénicas en circulación
CD	Grupo de diferenciación (por sus siglas en inglés Cluster of differentiation)
CE	Células endoteliales
CEC	Células endoteliales en circulación
CFCE	Células formadoras de colonias endoteliales
CMN	Células mononucleares
CPE	Células progenitoras endoteliales
CTH	Células troncales hematopoyéticas
EBM-2	Medio basal endotelial tipo-2 (por sus siglas en inglés Endothelial Basal Medium-2)
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EGM-2	Medio de crecimiento endotelial tipo-2 (por sus siglas en inglés Endothelial Growth Medium-2)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FvW	Factor de von Willebrand
HUVEC	Células endoteliales de vena umbilical humana (por sus siglas en inglés Human Umbilical Vein Endothelial Cells)
IAM	Infarto Agudo al Miocardio
KDR	Receptor con dominio cinasa (por sus siglas en inglés Kinase Insert Domain Receptor)
MEC	Matriz extracelular
MO	Médula ósea
PBS	Solución buffer de fosfatos
PE	Ficoeritrina
SFB	Suero fetal bovino
SP	Sangre Periférica
TVP	Trombosis venosa profunda
UFC-Hill	Unidades formadoras de colonias Hill

RESUMEN

Recientemente el estudio del endotelio vascular ha sido pieza clave en la elaboración de protocolos de investigación clínica, dirigidos al desarrollo, reparación o regeneración del sistema vascular, así como el tratamiento de ciertas enfermedades como la diabetes o el cáncer entre otras. Actualmente, existen diversos grupos de trabajo enfocados al estudio de la obtención y caracterización de células progenitoras endoteliales en condiciones normales. Hasta hace algunos años, se identificó a una población perteneciente a las células progenitoras endoteliales (CPE), a la cual se le dió el nombre de células formadoras de colonias endoteliales (CFCE), esta nueva población identificada ha sido considerada como un tipo celular poco frecuente en sangre periférica, con un alto potencial de proliferación y con la capacidad de regeneración en sitios de daño vascular. Dado que las CPE tienen relevancia en eventos cardiovasculares resulta interesante estudiar a las CFCE en patologías como la trombosis. Hasta ahora, se desconoce el papel de las CFCE en la biología de la trombosis, por lo que en éste estudio se generaron CFCE a partir de sangre periférica de donadores sanos y pacientes con trombosis, de esta manera, se observaron sus características morfológicas en cultivo así como su capacidad para generar colonias endoteliales, y se encontró que los pacientes con trombosis tienden a generar un mayor número de CFCE en menor tiempo de cultivo, en comparación con donadores sanos. Las CFCE fueron marcadas con anticuerpos de CE y al analizar por citometría de flujo se encontró que son positivas para los anticuerpos de células endoteliales, sin embargo, las CFCE de pacientes con trombosis presentaron un incremento en las proteínas de membrana CD34 y KDR comparadas con la línea celular HUVEC usadas como control interno, esto sugiere niveles tempranos de inmadurez de las CFCE. Así mismo, se analizó la capacidad para formar una estructura tubular *in vitro*, la cual fue semejante en los tres grupos analizados. Los resultados generados en este trabajo abren una puerta al estudio de las CFCE, como otro factor de riesgo asociado a los ya descritos en pacientes con predisposición a trombosis, así como su uso en terapias celulares a futuro.

I. INTRODUCCIÓN

La hemostasia es un proceso fisiológico responsable de evitar la pérdida de sangre por una lesión vascular, debido a que induce la formación de un coágulo en el sitio específico a la lesión (*Cordoba et al., 1999*); sin embargo, existen alteraciones en el sistema, que pueden dar como resultado el desarrollo de trombosis (*Arguelles et al., 2009*). La trombosis es una patología que sobrepasa los mecanismos de coagulación, dado que se induce la formación de un coágulo patológico en un lugar y tiempo inadecuado y es considerada como una enfermedad multifactorial (*Majluf, 2007*). En 1856 Rudolf Virchow clasifica una serie de factores que inducen el desarrollo de trombosis, hipercoagulabilidad de la sangre, daño a la pared vascular y estasis circulatoria (*Eichinger et al., 2009*). Los estados trombofílicos se asocian con un grupo de trastornos clínicos aumentando el riesgo a fenómenos trombóticos, los cuales se dividen en factores de riesgo adquiridos, genéticos y recientemente los factores de riesgo desconocido, que pueden ser dados por cambios funcionales en el endotelio (*Guideline et al., 2001; Murillo et al., 2005*).

Las células endoteliales expresan una gran variedad de factores que contribuyen a la hemostasia, incluyendo factores procoagulantes, anticoagulantes, moléculas de adhesión celular, sustancias vasomotoras y señales de sobrevivencia de las células (*Gross et al., 2000*). Debido al papel que juega el endotelio en los eventos trombóticos, resulta interesante estudiar su biología, abordando aspectos relacionados a su morfología, fenotipo y número de células formadoras de colonias endoteliales presentes en la SP, y así poder detectar posibles alteraciones en las células endoteliales de pacientes con trombosis. En 1997, el grupo de *Asahara*, demuestra por primera vez, la presencia de un tipo muy escaso de células endoteliales presentes en la SP de sujetos sanos, y las define como células progenitoras endoteliales (CPE). A partir de este estudio, diversos grupos de trabajo se han enfocado en la búsqueda de nuevas estrategias de aislamiento y caracterización de dichas células. Las técnicas hasta ahora utilizadas para aislamiento y caracterización de CPE se apoyan en diversos protocolos de cultivo,

ensayos de funcionalidad y particularmente en la expresión de antígenos de superficie. Basados en este paradigma las CPE han sido blanco de extensivos estudios para ser utilizadas como biomarcadores de enfermedades cardiovasculares, así como su posible contribución en la regeneración vascular en procesos de isquemia (*Fadini et al., 2010; Yoder et al., 2007*). Recientemente, *Ingram et al;* en el 2004 y *Yoder et al;* en el 2007, pertenecientes al mismo grupo de trabajo, identificaron y caracterizaron otro tipo de células endoteliales cuya presencia al igual que las descritas por *Asahara* en 1997 es escasa en SP y las definieron como Células Formadoras de Colonias Endoteliales (CFCE) no obstante a lo anterior este grupo de trabajo describe que éstas células pertenecen a la población de CPE, por su alto potencial proliferativo, de expansión y capacidad de regeneración vascular en ratones a los que se les ha provocado isquemia. Dado que la presencia de las CPE en SP ha sido muy estrechamente relacionada con enfermedades cardiovasculares, resulta también interesante estudiar a las CFCE en patologías como la trombosis, debido a la importancia que tiene el endotelio como barrera semipermeable y antitrombotica en la pared vascular de los vasos sanguíneos.

Hasta ahora resulta incierto el papel que tienen las CFCE en la biología de la trombosis, por lo que en esta investigación se determinó la presencia de las CFCE a partir de SP de pacientes con trombosis y se comparó con sujetos sanos. Los resultados indican que las CFCE generadas en este estudio son células con alto potencial de proliferación y con cierta inmadurez, lo que sugiere que podrían estar involucradas en la reparación del tejido dañando en la trombosis. Lo descrito en este estudio aporta información valiosa y trascendente en aspectos relacionados a la frecuencia y la capacidad regeneradora de las CFCE, particularmente en el abordaje de la aplicación de terapias vasculares y medicina regenerativa de pacientes con trombosis, entre otras.

MARCO TEÓRICO

HEMOSTASIA

La hemostasia es un proceso fisiológico responsable de evitar la pérdida de sangre y detener la hemorragia cuando se produce una lesión en el sistema vascular (*Córdoba et al., 1999*), dentro de este proceso intervienen múltiples elementos celulares como el endotelio, plaquetas, linfocitos y factores plasmáticos (*Martínez, 2009*). En condiciones fisiológicas normales, el sistema hemostático cumple diariamente su función que es mantener la sangre en estado líquido para que esta pueda circular, mientras que al mismo tiempo es capaz de convertir la sangre en un tapón insoluble en sitios donde ocurre una lesión vascular por ejemplo una herida (*López et al., 2004*).

El sistema hemostático se divide en dos sistemas dinámicos que funcionan paralelamente para lograr la obturación de las lesiones; la hemostasia primaria y la hemostasia secundaria. En la hemostasia primaria, una vez que se ha producido un daño en el sistema vascular y en presencia de factor tisular se produce vasoconstricción, su finalidad es producir enlentecimiento del flujo sanguíneo, ya que la capa muscular lisa se contrae cuando el vaso se daña y por tanto las pérdidas de sangre son mínimas (*Majluf y Pérez, 2006*); posteriormente la matriz subendotelial se expone confiriendo adherencia a las plaquetas, este proceso de adhesión depende de la unión del Factor de Von Willebrand (FvW), una glicoproteína presente en la membrana de la célula endotelial, para el cual las plaquetas tienen receptores en su superficie como son Ib, V, IX (*Córdoba et al., 1999*). Una vez producida la adhesión plaquetaria las plaquetas presentan cambios morfológicos en su citoplasma como la aparición de prolongaciones y liberación de gránulos que almacenan, lo que favorece la unión de las membranas plaquetarias, este fenómeno se denomina agregación plaquetaria, en el que intervienen el fibrinógeno y el complejo glicoprotéico IIb/IIIa (*Fuentes et al., 1998, Córdoba et al., 1999*). La hemostasia secundaria se caracteriza por la formación de un agregado plaquetario impermeable y consolidado que está entrelazado y rodeado de una red de fibrina inducida por la cascada de coagulación, durante

esta etapa la trombina favorece la formación de fibrinógeno en fibrina, confiriendo así permanencia en el coágulo plaquetario (*Fuster et al., 1997*) (**Figura. 1**). Es importante mencionar, que una vez que se activa el proceso de coagulación para detener la hemorragia, se continúa con el proceso de disolución del coágulo, este proceso recibe el nombre de fibrinólisis, el cual es uno de los mecanismos hemostáticos más importantes para prevenir el depósito de fibrina en la vasculatura e impedir la obstrucción del vaso sanguíneo (*Ceccotti et al., 2007*).

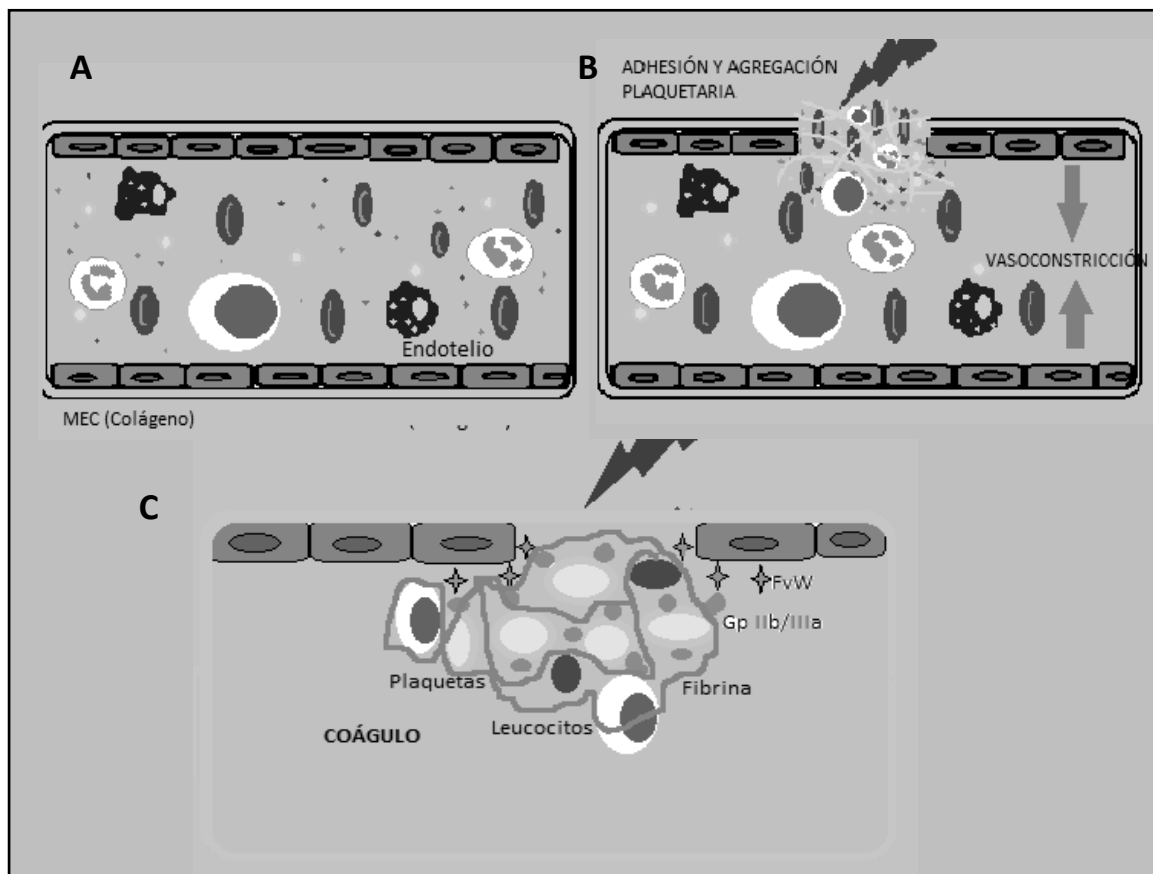


Figura 1. Hemostasia primaria y secundaria. La circulación de la sangre es un proceso continuo, en donde viajan elementos celulares como plaquetas, leucocitos, eritrocitos **A**. Ante un daño vascular ocurre la vasoconstricción, la adhesión y agregación plaquetaria, e incorporación de leucocitos y eritrocitos a sitio de daño **B**. La unión entre el endotelio y las plaquetas se da por medio de la expresión de FvW en la superficie endotelial, y la expresión de Gp IIb/IIIa para la unión de las plaquetas, para dar firmeza al coágulo se intercala fibrina **C**.

El sistema de coagulación es un mecanismo complejo y esencial para la vida, cualquier alteración en este ocasionará un estado patológico, por lo que es

importante mantener un equilibrio entre los factores procoagulantes y anticoagulantes. Una de las enfermedades conocidas y bien estudiadas es la trombosis causada por la alteración en el proceso de coagulación (Arguelles, 2009).

TROMBOSIS

La trombosis se define como la obstrucción local del flujo de la sangre en algún vaso sanguíneo arterial o venoso, que provoca que los tejidos y células irrigados por ese vaso sufran isquemia, es decir, falta de oxígeno pudiendo producir una lesión en las células que puede evolucionar a necrosis o algún tipo de muerte celular (Murillo, 2005). La masa que impide el paso de la sangre se llama trombo, el cual será un coágulo patológico en un tiempo y lugar inadecuado (Majluf, 2007) (**Figura 2**). Aunque las arterias y las venas son los sitios más frecuentes de aparición de trombosis, también puede ocurrir en los capilares (microcirculación) o dentro de las cavidades del corazón (Montero et al., 2010).

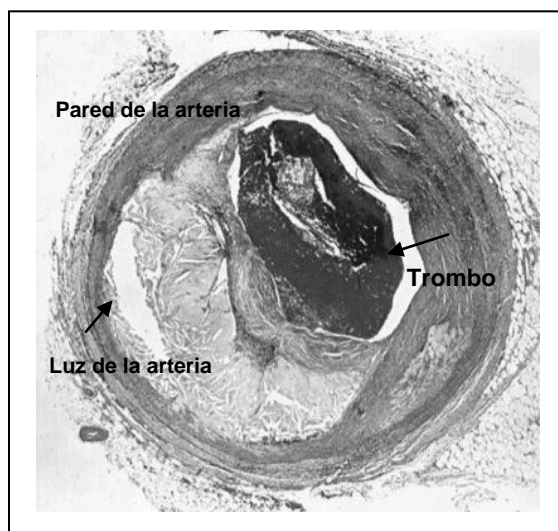


Figura 2. Corte transversal de una arteria humana. Se observa la oclusión de la luz de la arteria por la formación de un trombo. (Tomado de Sandoya, 2008).

La trombosis es considerada como una enfermedad multifactorial, y desde hace muchos años se ha estudiado los mecanismos que intervienen en el desarrollo de trombosis. En 1856 Rudolf Virchow clasifica una serie de factores que inducen el

desarrollo de trombosis, hipercoagulabilidad de la sangre, daño a la pared vascular y estasis circulatoria (Kyrle et al., 2009; Malone et al., 2006; Makin et al., 2002; Mammen, 1992) (**Figura 3**).

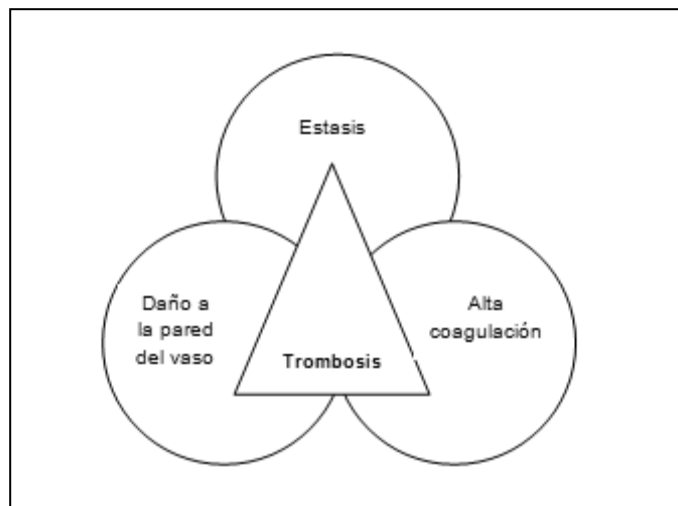


Figura 3. Triada de Virchow (1856). Virchow describe tres factores que predisponen a la trombosis: 1) estasis circulatoria (reducción de la velocidad del flujo), 2) hipercoagulabilidad (alteraciones en los componentes de la sangre) y 3) cambios en la pared del vaso sanguíneo. (Tomado de Kyrle 2005).

En la actualidad la triada fisiopatológica sigue vigente; por lo tanto, la alteración de alguno de sus componentes o desequilibrio provoca la aparición de un estado protrombótico. De esta forma se entiende que hay un desequilibrio en la inducción de un tapón hemostático en el lugar de la lesión, llevando a una inapropiada activación de los factores hemostáticos normales, como es la formación de trombos en la vasculatura no lesionada o la oclusión trombótica de un vaso tras una lesión menor (Montero et al., 2010). La tendencia a sufrir una trombosis es un fenómeno también llamado trombofilia el significado de este concepto dentro del campo de la hematología se refiere a un desorden de los mecanismos hemostáticos que predisponen a un estado trombótico (Arguelles, 2009; Guideline, 2001); los estados trombofílicos se asocian con un grupo de trastornos clínicos que aumentan el riesgo a fenómenos trombóticos, los cuales se dividen en factores de riesgo genéticos como es la deficiencia de proteínas importantes en el

proceso de coagulación por ejemplo, la deficiencia de antitrombina provoca el aumento de trombina y por lo tanto el desarrollo de trombos. También existen los factores de riesgo adquiridos que son mediados principalmente por el ambiente o el estilo de vida y recientemente los factores de riesgo desconocido asociados al endotelio como una unidad independiente las células endoteliales (Murillo et al., 2005; Malone et al., 2006; Pendás et al., 2002; Rosendaal, 1999) (Figura 4).

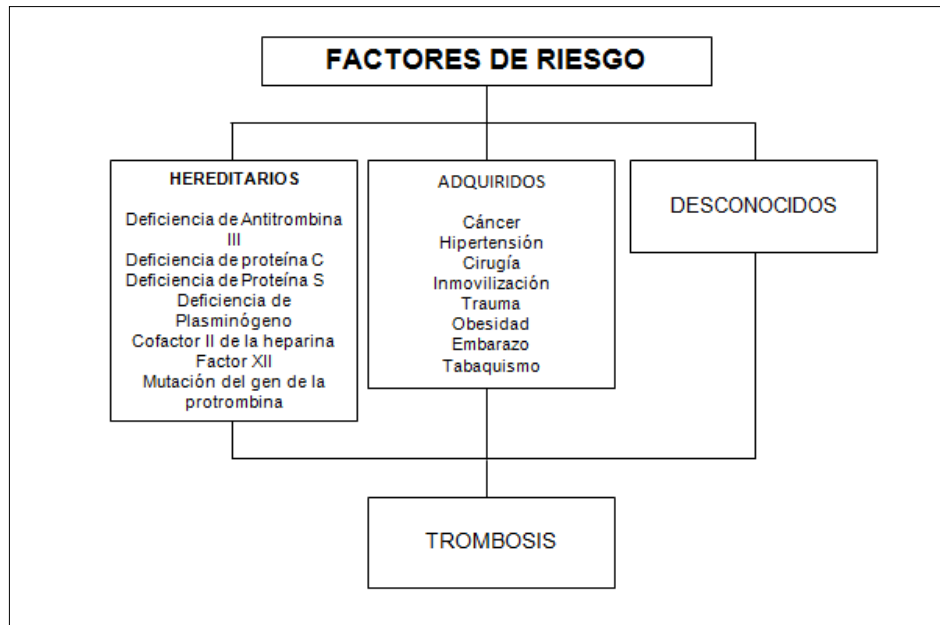


Figura 4. Factores de riesgo trombótico. Dentro de los factores de riesgo involucrados en el desarrollo de trombosis se incluyen los hereditarios, principalmente la deficiencia de proteínas necesarias para la coagulación, los adquiridos que son ocasionados por el ambiente y el estilo de vida. Y por último los factores de riesgo desconocidos como es los cambios que ocurren en el endotelio

De esta manera se entiende que la trombosis es consecuencia de una activación desbordada de la hemostasia que sobrepasa los mecanismos de regulación (Majluf et al., 2007; Dickson et al., 2004; Makin et al., 2002). La trombosis también es inducida por cambios funcionales del endotelio. El papel del endotelio vascular en los procesos trombóticos es importante debido a la expresión de una gran variedad de factores que contribuyen a la hemostasia, incluyendo factores que inducen o inhiben el proceso de coagulación, moléculas que intervienen en la

adhesión celular para inducir la formación del coágulo, sustancias que promueven vasoconstricción entre otras (*Gross et al., 2000*), por lo tanto el endotelio vascular en condiciones saludables es un semáforo biológico de su integridad y buen funcionamiento depende la estabilidad e inducción de la formación de un coágulo solo en sitios en donde es necesario.

ENDOTELIO VASCULAR ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.

El establecimiento de los islotes sanguíneos durante el desarrollo embrionario marca el inicio de la vasculogénesis y la hematopoyesis; estos islotes sanguíneos derivan de agregados celulares procedentes del mesodermo que colonizan la parte central del saco vitelino 7.25 días post coito en ratones, así como en humanos, las primeras células sanguíneas están compuestas principalmente por progenitores eritroides nucleados, las células endoteliales surgen paralelamente a estas. Durante las siguientes 12 H las células centrales que se encuentran dentro del agregado celular, darán origen a las células hematopoyéticas embrionarias mientras que las periféricas darán origen a las células endoteliales para formar las estructuras vasculares en donde posteriormente viajarán las células hematopoyéticas. Esta primera asociación entre los dos linajes hematopoyético y endotelial, ha conducido a la hipótesis de que surgen de un precursor común, el hemangioblasto (*Sabin, 1920; Murray, 1930; Wagner, 1980; Lacrin, 2009*). En 1980 el término hemangioblasto había sido utilizado para describir a una célula bipotente generada en el desarrollo embrionario y existe transitoriamente para el desarrollo del sistema vascular y sanguíneo (*Wagner, 1980*). Hasta el momento existe una controversia acerca del origen del sistema hematopoyético y el vascular. En un modelo murino, se propone identificar al hemangioblasto por la coexpresión de marcadores de membrana compartidos durante el desarrollo embrionario en el mesodermo por ejemplo Fkl-1 (*Hirschi, 2012*); y en humanos la coexpresión de características fenotípicas como la presencia de CD34 y *KDR* (*Choi et al., 1998*). Por lo tanto el endotelio vascular se genera durante el desarrollo embrionario a partir del mesodermo, mediante un proceso denominado vasculogénesis; una vez establecido el primer sistema vascular, el desarrollo de

nuevos vasos sanguíneos se produce por el surgimiento de nuevas células endoteliales que se asocian a las ya existentes, lo que dará origen a las venas y arterias, estos procesos son conocidos como angiogénesis y arteriogénesis. (*Ingram et al., 2005; Urbich y Dimmeler., 2004*). Para llevar a cabo la diferenciación, proliferación y mantenimiento el endotelio depende de la presencia de factores proangiogénicos y angiostáticos; los factores proangiogénicos incluyen factores de crecimiento. Los factores de crecimiento son proteínas que estimulan el crecimiento y la división celular se conocen varios factores que regulan los procesos de desarrollo, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento tipo insulina (IGF-I), factor de crecimiento fibroblástico (FGF) y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (*Alberts et al., 1996*) y citocinas como factor de necrosis tumoral (TNF) e interleucina 2 (IL-2) (*Fitridge et al., 2001*). El endotelio proporciona un revestimiento de los vasos sanguíneos y el sistema circulatorio, y forma una barrera estructural entre el espacio vascular y los tejidos existe adhesión entre las células endoteliales mediada por moléculas de adhesión incluyendo caderinas y moléculas de adhesión de células endoteliales y plaquetas (PECAM-1) o CD31, esta última molécula pertenece a la familia de las inmunoglobulinas y es expresada altamente en la vasculatura, se ha propuesto que también actúa como una molécula de acoplamiento de otras proteínas como las integrinas y de esta manera proporcionar más fuerza a las estructuras vasculares. En 1953 a través de estudios de microscopía electrónica Palade descubre pequeñas vesículas en el interior de las células endoteliales, que más tarde se describen como una de las principales características de dichas células actualmente conocidos como cuerpos de Weibel Palade encargados de secretar entre otras moléculas, el FvW, cuya función es importante en el sistema de coagulación (*Warner et al., 1995*). Más tarde se describió la asociación que existe entre las células endoteliales con las células sanguíneas, por ejemplo la regulación del paso de los linfocitos desde el espacio intravascular a sitios de extravasculares de inflamación, los mecanismos de trans migración de los leucocitos está mediada por moléculas de adhesión como las selectinas,

integrinas y algunas inmunoglobulinas; los leucocitos ruedan a través del endotelio para después migrar en un proceso llamado diapédesis, la migración se produce a través de las células endoteliales. Diversos estudios fueron enfocados en entender la fisiología del endotelio, en los años 70's se realizan los primeros cultivos de CE, en donde se puede observar que su replicación es extremadamente baja, por lo que se dice que estas células pueden ser quiescentes o con una tasa de replicación extremadamente baja (*Cisnes et al., 1998*). Actualmente se sabe que la monocapa de células endoteliales que cubren en conjunto el interior de los vasos sanguíneos del cuerpo humano adulto, mide aproximadamente 350 m² y pesa alrededor de 1100g (*Galley et al., 2004*); además de estar involucrado activamente en procesos cardiovasculares, incluyendo la regulación de la perfusión, regulación del tono vascular, permeabilidad permitiendo el paso de pequeñas y grandes moléculas, hemostasia, fibrinólisis, secreción de factores de crecimiento, procesos inflamatorios, angiogénesis y vasculogénesis (*Fadini et al., 2010; Pries et al., 2006; Makin et al., 2000*). El endotelio vascular como todos los órganos del cuerpo humano forma parte de un diseño perfecto. La superficie de las células endoteliales está cubierta por receptores con funciones específicas, también tienen la capacidad de sintetizar sustancias que inhiben o activan la agregación plaquetaria, coagulación de la sangre y fibrinólisis y por tanto desempeña un papel activo en la regulación de este sistema proporcionando un papel procoagulante y anticoagulante; la integridad del endotelio es necesaria para el buen funcionamiento de los vasos sanguíneos y mantenimiento de un estado no trombogénico (*Roger et al., 2007*).

CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES.

La formación de nuevos vasos sanguíneos ocurre vía vasculogénesis, angiogénesis y arteriogénesis (Conway, 2001). Desde 1997 la vasculogénesis postnatal es un mecanismo importante para la angiogénesis a través de células progenitoras endoteliales derivadas de MO (Yoder et al., 2007). Para identificar la población de CPE se utilizan parámetros como obtención de CMN de MO o SP sembradas en fibronectina o colágeno, en un medio con factores específicos, la detección de moléculas de superficie se realiza mediante citometría de flujo así como identificar las colonias *in vitro* (Critser et al., 2011). Sin embargo, cada método utilizado para identificar a esta población es diferente. En 1997 Ashara et al, aísla caracteriza y examina la función de una población de células humanas en sangre periférica CD34+, capaces de diferenciarse hacia células endoteliales y contribuir en procesos de vasculogénesis postnatal, a las que llama CPE (Asahara et al., 1997); se menciona que la vasculogénesis postnatal es un proceso importante de angiogénesis en el adulto, sugiriendo que las CPE son células derivadas de MO, y que se encuentran circulando en SP, principalmente reparando daños que pudiera sufrir el endotelio como isquemia, incluso en casos de angiogénesis tumoral (Ingram et al., 2005). Basados en este paradigma las CPE tienen un extensivo estudio como biomarcadores de enfermedades cardiovasculares y basadas en la terapia celular el uso para la reparación y regeneración de los vasos sanguíneos dañados (Fadini et a., 2010; Ingram et al., 2007). El marcador CD34 es una glicoproteína de superficie celular expresada en el desarrollo temprano de células progenitoras hematopoyéticas, células endoteliales y fibroblastos embrionarios, esta molécula se expresa en CMN de MO en un 1.5%; es un marcador de células inmaduras presentes en células madre y progenitoras hematopoyéticas, se ha sugerido por algunos grupos de trabajo que CD34 está implicado en procesos de adhesión celular de células hematopoyéticas al estroma de la medula ósea (Krause et al., 1996). Posteriormente Ito et al, en 1999 describe a una población de CPE positivas para Tie-2, CD31 y KDR presentes en circulación, menciona que su sobrevivencia esta mediada por angiostatinas ya que esta molécula inhibe la migración y proliferación e induce

muerte en CPE y pueden servir como terapia en procesos de angiogénesis tumoral, es importante resaltar que el efecto biológico antes descrito solo se presenta en CPE y no en células endoteliales maduras (*Ito et al., 1999*). El marcador de superficie Tie-2 es altamente expresado en el endotelio durante el desarrollo embrionario (*Dumont et al., 1992*), es el receptor para angiopoyetinas, las angiopoyetinas son factores de crecimiento requeridos para la formación de vasos sanguíneos, también es expresado en endotelio adulto incluyendo, venas, arterias y capilares (*Peters et al., 2004*). Por otro lado *Ito*, basa la caracterización de CPE en la expresión de CD31 también conocido como PECAM-1 pertenece a la familia de las inmunoglobulinas y es expresado en el endotelio vascular, también está envuelto en procesos de inflamación, durante la trans migración a través de las células endoteliales por los neutrofilos y monocitos a sitios de inflamación (*Demeure et al., 1996*). Dentro de la población de CPE se tiene caracterizada una fracción celular denominada CFU-Hill, las cuales tienen una baja tasa de proliferación, y están involucradas en procesos cardiovasculares, se menciona que existe un aumento de estas células en SP como un reflejo del daño en el endotelio y también pueden servir como marcadores pronósticos de daño endotelial (*Hill et al., 2003*), después de varios estudios para caracterizarlas se obtiene que tienen un origen hematopoyético esto debido a la presencia del marcador de leucocitos CD45 ya que este marcador pertenece a leucocitos. Por otro lado existe una hipótesis en donde se maneja que monocitos y macrófagos son potentes reguladores de la respuesta angiogénica en la circulación y son llamadas células angiogénicas en circulación (CAC) y juegan un papel importante en la regulación de la hemostasia y la iniciación de la neoangiogénesis durante isquemia, remodelación del tejido y tumorigénesis sin llegar a ser parte integral de la íntima del endotelio (*Hirschi et al., 2008*).

Por otra parte, diversos grupos de trabajo se enfocaron en estudiar la biología de las CPE, esto debido a la utilidad clínica que se le pudiera dar en un futuro como terapia celular. Un avance importante hacia el logro de una mejor comprensión de la biología vascular, es la identificación de una nueva jerarquía de CPE, las CFCE

(*Reinisch et al., 2009*). Las CFCE son consideradas como una población de células endoteliales raras, cuya presencia ha sido detectada en sangre periférica con una frecuencia muy baja (2 CFCE 100, 000, 000 CMN); pero que sin embargo tiene un alto potencial de proliferación (*Yoder et al., 2007; Critser et al., 2011*); una característica que las hace únicas dentro de las células endoteliales hasta ahora identificadas, es la capacidad de formar una estructura vascular *in vitro* e *in vivo*, lo que las ha caracterizado como las verdaderas células endoteliales en la etapa adulta (*Yoder et al., 2004; Yoder et al., 2007; Hirschi et al., 2008*). No obstante a lo anterior, las CFCE se han clasificado dentro de la población de CPE por su alto potencial clonogénico, por lo que se ha sugerido que estas células pueden circular en SP e intervienen en procesos intrínsecos como es el recambio de células endoteliales senescentes, en proceso de muerte celular programada (apoptosis) o bien en la regeneración de la red vascular causada por efectos extrínsecos como el daño mecánico, o bien la pérdida del tejido vascular por enfermedades vasculares (*Yoder et al., 2007; Blann et al., 2005*).

Por otra parte, se ha observado, que las CFCE comparten marcadores de linaje hematopoyético como es el antígeno de superficie CD34 y KDR, característico de células troncales y progenitoras hematopoyéticas, lo que podría relacionarse con su alto potencial clonogénico (*Hirschi et al., 2008*); asimismo estas células consideradas dentro de la población de las CPE, pueden ser identificadas por la expresión de antígenos de superficie, siendo la citometría de flujo la principal herramienta utilizada para identificar a las CTH y CPH, en donde marcadores de superficie como CD34 y KDR, ahora son usados para seleccionar y distinguir a las CPE, esto aunado a otras proteínas tales como CD31, CD146, así como de la ausencia de las proteínas CD45 y CD14, específicas de células hematopoyéticas y particularmente de los monocitos. Existen características establecidas para los tipos de CPE identificadas hasta el momento, en la **Tabla 1**, se describen algunas características de las UFC-Hill, CAC y CFCE.

	UFC-Hill	CAC	CFCE
Proliferación clonal	-	+	+
Capacidad de resiembra	-	-	+
Formación de estructuras tubulares <i>in vitro</i>	+/-	+/-	+
Formación de nuevos vasos sanguíneos <i>in vivo</i>	-	-	+
Homing a sitios de isquemia <i>in vivo</i>	+	+	+
Fagocitosis	+	+	-
Fenotipo	CD34+/-	CD34+/-	CD34+
	CD133+/-	CD133+/-	CD133-
	KDR+	KDR+	KDR+
	CD45+/-	CD45+/-	CD45-
	CD14+/-	CD14+/-	CD14-
	CD31+	CD31+	CD31+
	eNOS+	eNOS+	eNOS+
	FvW+	FvW+	FvW+

Tabla 1. Características de las UFC-Hill, CAC y de las CFCE. (Tomado de Hirschi 2008)

Estos hallazgos han permitido entender algunos aspectos de la biología de las CPE en condiciones fisiológicas normales. No obstante, hasta este momento no existen estudios en la literatura, relacionados a las características biológicas de las CPE, específicamente las CFCE en situaciones patológicas, tal es el caso de la trombosis, por lo que resulta interesante abordar aspectos relacionados con la presencia y función de las CFCE bajo estas condiciones en pacientes con trombosis.

JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Hoy en día se sabe que la trombosis es una enfermedad multifactorial ya que se asocia a factores de riesgo genéticos y adquiridos; sin embargo, también se ve involucrada en una serie de patologías como la diabetes, hipertensión, infartos y cáncer, siendo estas las primeras causas de muerte en México y en el mundo. Hasta ahora, gran parte de los estudios relacionados a la trombosis son epidemiológicos y clínicos, siendo pocos los estudios básicos. En la literatura se ha descrito la participación de tres factores que están asociados al desarrollo de la trombosis, en el que figura el daño a la pared del vaso, elemento clave de nuestro estudio. Las investigaciones hechas sobre el endotelio vascular como unidad mínima, es decir, la célula endotelial, en condiciones normales, ha sido abordada por muchos grupos de trabajo, lo que ha llevado a conocer su fenotipo y características funcionales, sin embargo, hasta el momento no existen reportes acerca de células endoteliales obtenidas de pacientes con trombosis, por lo que en este estudio se analizaron aspectos relacionados con la manera de obtenerlas, su caracterización fenotípica, ensayos de funcionalidad *in vitro*, así como la detección de alteraciones numéricas; las cuales fueron obtenidas a partir de una población de CMN de SP de pacientes con trombosis y donadores sanos, hasta la aparición de Células Formadoras de Colonias Endoteliales. Este estudio puede ser considerado la base de futuros estudios relacionados con la biología de la trombosis y muy probablemente en investigaciones de medicina regenerativa.

HIPÓTESIS

Existen estudios que demuestran la presencia de células formadoras de colonias endoteliales en sangre periférica de sujetos sanos; sin embargo también se menciona que ante un daño, el endotelio vascular sufre alteraciones en cuanto al número y funcionalidad de células endoteliales en sangre periférica como reflejo de la presencia y severidad de alguna patología vascular. Por lo antes mencionado, se esperaría que las células formadoras de colonias endoteliales obtenidas de sangre periférica de pacientes con trombosis presenten diferencias en cuanto a sus características fenotípicas, numéricas, estructurales y morfológicas en comparación con su contraparte normal.

OBJETIVO GENERAL

Obtener y caracterizar CFCE a partir de SP de pacientes con trombosis.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar la presencia de las CFCE procedentes de CMN de SP, de pacientes con trombosis y sujetos sanos en cultivos *in vitro*.
- Determinar la frecuencia de las CFCE de pacientes con trombosis y sujetos sanos.
- Evaluar la presencia de los antígenos de superficie CD14, CD31, CD34, CD45, KDR, CD90 y CD146 en las CFCE, de pacientes con trombosis y sujetos sanos.
- Analizar la morfología de las CFCE obtenidas.
- Demostrar la capacidad de las CFCE de pacientes con trombosis y sujetos sanos, para formar estructuras tubulares *in vitro*.

II. MÉTODO

Obtención de muestras de SP

Se obtuvieron entre 60-100 ml de sangre periférica de 24 pacientes con trombosis colectados con 2 ml de solución de heparina 5000 U/ml diluida 1:5; se utilizaron jeringas de 20 ml (Sensi Medical, JAYOR) para coleccionar la muestra, de los cuales 15 fueron mujeres y 9 hombres. Las muestras fueron obtenidas del Hospital General Regional No. 1 Dr. Carlos MacGregor Sánchez Navarro, del Instituto Mexicano del Seguro Social en la Unidad de Medicina de Investigación en Trombosis Hemostasia y Aterogénesis. De la misma forma se coleccionaron 16 muestras de voluntarios clínicamente sanos sin ninguna enfermedad hematológica de los cuales fueron 9 mujeres y 7 hombres.

Obtención de CMN

Las CMN se obtuvieron como se describe a continuación. La SP obtenida de los pacientes con trombosis y sujetos clínicamente sanos, sin ninguna enfermedad hematológica aparente, fue diluida con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (Invitrogen, Grand Island, NY) pH 7.2-7.4 y se llevó a un volumen equivalente con FicollHypaque (<1.007g) (Sigma, St Louis, USA) fueron centrifugadas a 1500 rpm, durante 30 minutos a temperatura ambiente, el botón celular fue lavado con 2 ml de PBS al 10% de SFB (Hyclone, USA). El conteo celular se realizó en una cámara de Neubauer de cristal (Mariendfeld, Germany). Para evaluar la viabilidad se realizó una prueba de exclusión al azul tripano, esta técnica se utiliza para determinar el número de células viables presentes en una suspensión de células, ya que este colorante es capaz de penetrar al interior de las células cuya membrana celular está dañada considerando a estas células no viables. Las células que no se tiñen de color azul se consideran vivas. Brevemente, se tomaron 20µl de PBS al 10% de SFB con CMN, adicionándoles 20µl de colorante, enseguida se contaron las células vivas y muertas en la cámara de Neubauer bajo el microscopio obteniendo el porcentaje de células vivas.

Generación de CFCE

Las CMN fueron resuspendidas en 2 ml de medio EGM-2 (Lonza, Walkersville, MD, USA), suplementado al 10% de Suero Fetal Bovino (FBS; Hyclone, Logan, UT) y 10 ng/ml de antibióticos como la penicilina/estreptomicina (GIBCO, USA) y gentamicina (Corporation Invitrogen, USA). Las células fueron sembradas en una placa de seis pozos (Corning, USA) previamente tratada con colágeno de rata tipo I (BD Biosciences, Bedford, MA) se sembraron alrededor de 30,000,000 de CMN en cada pozo, se incubaron a una temperatura de 37°C, en una atmósfera de 5 % de CO₂ y condiciones óptimas de humedad (Incubadora Nuaire, USA). Después de 24 h las células no adherentes fueron retiradas del medio y se adicionó 1 ml de medio EGM-2 fresco, así se procedió diariamente hasta que se logró detectar la presencia de CFCE. Una vez identificadas las CFCE fueron contadas por inspección visual, bajo el microscopio invertido a 10X (Q. Imaging, Olympus). Se analizó la morfología de las CFCE generadas de pacientes con trombosis, donadores sanos y HUVEC.

Clonación de Colonias de células endoteliales (CCE)

Las colonias de células endoteliales generadas, fueron aisladas del cultivo original por medio de un anillo de clonación (BEL-ART, USA) mediante el uso de tryPLE Express (Invitrogen, USA) para disociar a las CFCE, después de 3 min de estar en contacto con el tryPLE Express se adicionó inactivador de tryPLE Express (Invitrogen, USA), posteriormente fueron sembradas en un nuevo pozo de cultivo o en botellas de cultivo T75 cm² (Corning USA) previamente tratado con colágeno de rata tipo I (BD Biosciences, Bedford, MA), y resuspendidas en medio EGM-2 (Lonza, Walkersville, MD) y de esta manera se mantuvieron en cultivo hasta llegar a un 80% de confluencia, en promedio 30 días contando desde el día que se sembraron las CMN.

Obtención y cultivo de HUVEC

Como control interno del estudio se utilizaron células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) de partos normales a término. Fragmentos de vena de cordón umbilical fueron obtenidos en el servicio de ginecología, del hospital general de Zona Troncoso IMSS. Las muestras fueron transportadas al laboratorio en tubos de plástico de 50 ml con tapa de rosca (Falcon, USA), con PBS (Invitrogen, Grand Island, NY) al 10% de SFB (Hyclone, USA) y antibióticos como penicilina/estreptomicina (GIBCO, USA) y gentamicina (Corporation Invitrogen, USA). El procedimiento para obtener las HUVEC desde el nacimiento hasta el cultivo no tardo más de 6 h. Las HUVEC fueron aisladas por actividad enzimática, con liberasa durante 15 minutos a una temperatura de 37°C. Posteriormente se realizaron múltiples lavados con PBS (Invitrogen, Grand Island, NY), para coleccionar las células y posteriormente fueran centrifugadas, el botón celular fue resuspendido en medio específico EGM-2 (Lonza, Walkersville, MD) suplementadas con 10% de Suero Fetal Bovino (FBS; Hyclone, Logan, UT) y antibióticos. Fueron sembradas en cajas petri de 10 ml (Corning USA) tratada con colágena de rata tipo I (BD Biosciences, Bedford, MA) en condiciones de cultivo. Las colonias de pasajes 1 a 3 fueron expandidas y usadas como control de los experimentos.

Morfología de CFCE en cultivo

Las CMN fueron observadas bajo el microscopio invertido (Olympus, Japan) desde el día 1 y en los diferentes días de cultivo hasta la aparición de las CFCE (aproximadamente en el día 8 en pacientes con trombosis y en el día 13 en donadores sanos). Se captaron imágenes con una cámara fotográfica microPublisher 5.0 RTV (Qimaging, Canada), en donde se observaron los cambios morfológicos de las CMN hasta la detección de CFCE y posteriormente su expansión.

Inmunofenotipo de CFCE

Para determinar el inmunofenotipo de las CFCE, se utilizaron pasajes tempranos (1 a 3); en fase de confluencia se cosecharon las células utilizando un disociador enzimático tryPLE Express (Invitrogen, USA) durante 3 minutos a una temperatura de 37 °C, posteriormente se inactivó a la enzima con inactivador de tryPLE Express (Invitrogen, USA), las células se resuspendieron en 1ml de EBM-2 (Lonza, Walkersville, MD, USA) y se contaron. Posteriormente se colocaron 30,000 células endoteliales en un volumen 500 µl de PBS en un tubo para citómetro y fueron incubadas con 2µl de cada uno de los anticuerpos monoclonales específicos conjugados con los diferentes fluorocromos, el tiempo de incubación fue de 20-30 min a 4°C en oscuridad. Los anticuerpos utilizados son: antiCD146 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (FITC) (MASCs, MiltenyiBiotec), antiCD31 conjugado con alofocianina (APC) (eBioscience), antiCD34 conjugado con ficoeritrina (PE) (eBioscience), antiCD45 conjugado con PE (eBioscience), antiCD90 conjugado con APC (eBioscience), antiCD14 conjugado con FITC (eBioscience), antiKDR conjugado con APC (MASCs, MiltenyiBiotec). Posteriormente se realizaron lavados de las células con PBS y SFB al 3% para evitar el pegado inespecífico de los anticuerpos, después las células fueron fijadas con paraformaldehído al 5%. Finalmente fueron analizadas en un citómetro de flujo (FACS Calibur, BD Biosciences), para lo cual se

adquirieron 10,000 eventos. Los resultados fueron analizados mediante el Software FlowJo versión 7.6.5.

Ensayo de estructuras tubulares *in vitro*

Para realizar los ensayos de formación de estructuras tubulares, se obtuvieron CFCE de pasajes tempranos (1 a 3), las cuales fueron sembradas en una placa de 48 pozos fondo plano (Corning USA), con 40 μ l de matrigel (BD, Biosciences) a una densidad celular de 50,000 células por pozo, mismas que fueron diluidas en 40 μ l de medio EGM-2 suplementado con 10% de SFB. Transcurridas 24 h las células fueron analizadas visualmente por medio del microscopio invertido a diferentes aumentos 10X, 20X y 40X respectivamente.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos en este trabajo se sometieron a análisis estadístico t-student y ANOVA, mediante paquetes estadísticos de los programas Excel y Sigma Stat 3.5.

III. RESULTADOS

CULTIVO DE CMN Y GENERACIÓN DE CFCE.

Se ha reportado, que las CFCE son una población rara en SP y que se encuentran en una proporción de 1 CFCE/50, 000,000 de CMN. En la literatura se describen protocolos para la obtención y mantenimiento de las CE, a partir de SP de donadores sanos, sin embargo, la estrategia utilizada para obtenerlas varía en los diferentes grupos de trabajo. Por lo que en este estudio se partió de una estrategia de cultivo, en donde se siguió una secuencia de una población total de CMN obtenidas de SP de donadores sanos así como de pacientes con trombosis.

Las CMN obtenidas por gradiente de densidad fueron cultivadas en una placa tratada con colágena de rata tipo I, partiendo en promedio de 80 ml de SP de donadores sanos y pacientes con trombosis, de los cuales se obtuvieron un total de 85, 000,000 de CMN y una viabilidad del 98%. Se sembraron alrededor de 30,000,000 CMN en cada pozo. En el día 1 de cultivo se observa una alta densidad celular en suspensión, al igual que células de diferentes tamaños con morfologías variadas, por lo tanto se habla de diferentes poblaciones celulares como leucocitos, monocitos, incluso algunos eritrocitos también son observables (**Figura. 6-A, A**). El cambio de medio se realizó cada 24 h para retirar las células no adheridas en la placa de cultivo, la densidad celular en suspensión disminuyó cada vez que se realizaron los cambios de medio, sin embargo detecto la presencia de otra población celular, las características de esta nueva población identificada eran pequeños agregados de celulares que conforme pasó el tiempo y se realizaban los cambios de medio se iban desintegrando (**Figura. 6-A, B**). En promedio entre el día 12 y 18 se detecto la presencia de las primeras colonias de células endoteliales en donadores sanos y entre el día 8 y 15 la presencia de CFCE de pacientes con trombosis, las colonias de células endoteliales se observan formando un agregado de células con una morfología tipo coblestone, cuando aparecen estas colonias su tamaño es pequeño conformado por alrededor de 50 a 100 células (**Figura. 6-A, C**) pero conforme pasan los días en el cultivo entre los

días 18 y 23 las colonias aumentaron de tamaño, esto significa que incrementaron su proliferación pero sin perder su morfología (**Figura. 6-A, D**). Las CE siguieron creciendo en número, lo que favoreció la presencia de una colonia más grande, en donde se pudo observar una heterogeneidad en el tamaño de las células que forman la colonia: células pequeñas en el centro de la colonia y células de mayor tamaño hacia la periferia (**Figura. 6-B, E**). De la misma forma se detectó la capacidad de estas colonias de CFCE, para formar colonias secundarias. Las colonias generadas de SP de pacientes con trombosis en un principio fueron clonadas del cultivo inicial para ser sembradas en otra placa de cultivo con las características del cultivo primario; se observó que estas células clonadas tienen la capacidad de generar más colonias con las mismas características de la primera colonia (**Figura. 6-B, F**)

Las colonias de células endoteliales se mantuvieron en cultivo hasta llegar a confluencia, es decir, las colonias sembradas en una nueva placa continuaron proliferando hasta cubrir un 75% de la capacidad de la placa de cultivo. En este punto, ya no se observaron las colonias que dieron origen a estas células, pero si se detectó una alta confluencia, es importante mencionar que el tamaño de estas células fue homogéneo. En las imágenes se observa una comparación entre los dos cultivos HUVEC y CFCE obtenidas de SP de pacientes con trombosis (**Figura. 6-B, G y H**). Las CE de SP de pacientes con trombosis, donadores sanos y HUVEC se compararon visualmente bajo el microscopio a 20X y 40X, en donde se pudo observar que la morfología es un poco alargada para ambas, el tamaño de la célula no varía mucho siendo un poco más grande en HUVEC (**Figura. 7**).

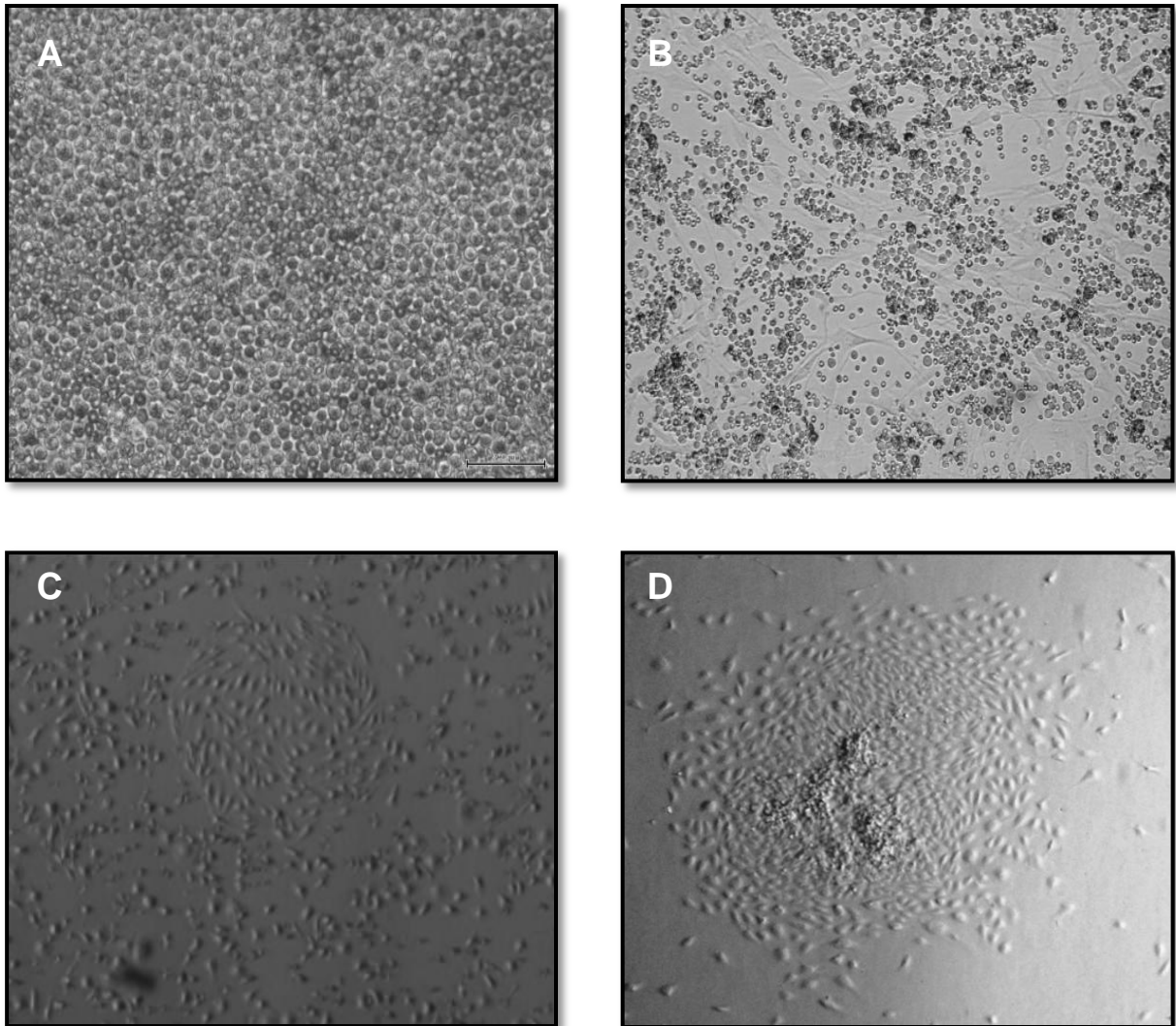


Figura 6-A. Cultivo de CMN de sangre periférica de pacientes con trombosis y generación de CFCE. 30,000,000 de CMN fueron sembradas en placas de 6 pozos previamente tratadas con colágena de rata tipo I, en presencia de medio EGM-2. Día cero **A**); 5 días de cultivo **B**); presencia de células grandes y pequeñas en los días 12 y 18 de cultivo **C**); Incremento en el tamaño de la colonia entre los días 18 **D**).

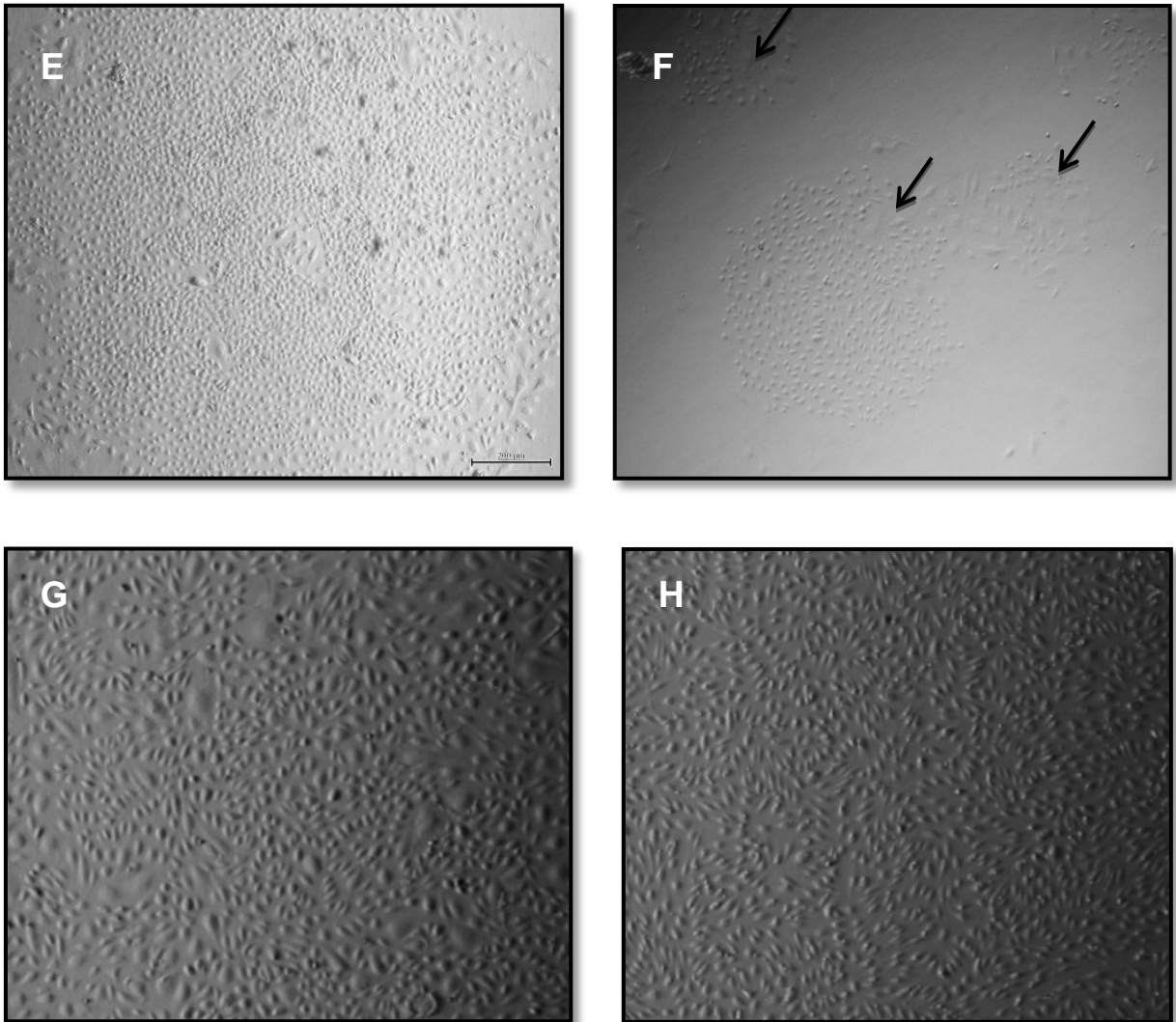


Figura 6-B. Cultivo de CMN de sangre periférica de pacientes con trombosis y generación de CFCE. Día 23 de cultivo E). Cultivo de células clonadas y presencia de colonias secundarias en el día 25 F). Confluencia de CFCE G). Cultivo confluyente de células HUVEC H). Las células en cultivo fueron analizadas mediante un microscopio de contraste de fases Olympus a 4X.

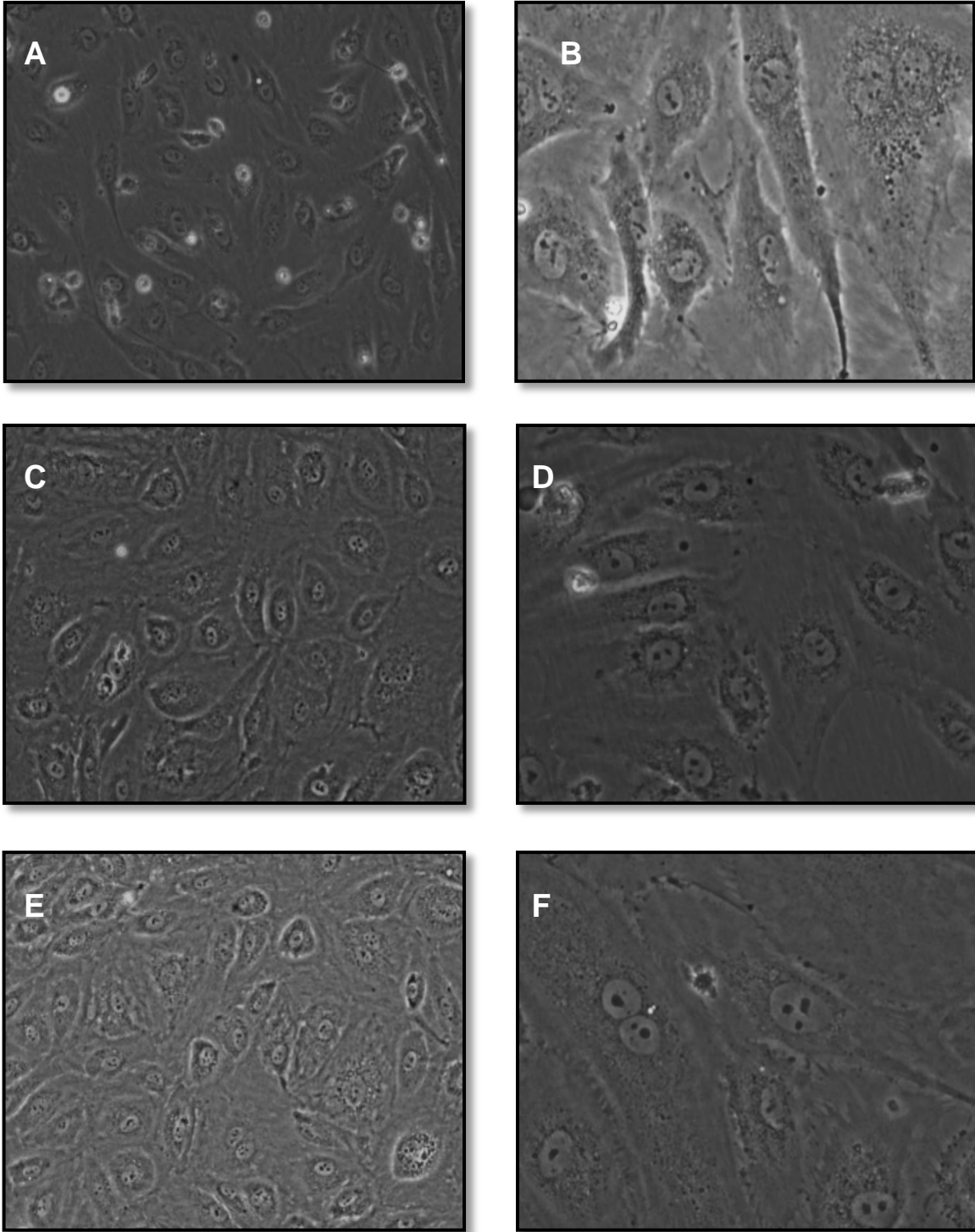


Figura 7. Comparación morfológica de CFCE pacientes con trombosis, HUVEC y donadores sanos. Células endoteliales de pacientes con trombosis 20X y 40X (A, B). HUVEC 20X y 40X (C, D). Células endoteliales de donadores sanos 20X y 40X (E, F), fueron comparadas morfológicamente después de 15 días de cultivo mediante microscopio de contraste de fases (Olympus, Japan).

FRECUENCIA DE CFCE

Dentro de los resultados obtenidos se tiene que las CFCE están presentes en SP de donadores sanos y pacientes con trombosis, sin embargo presentan diferencias en cuanto a su número en sangre periférica; por lo tanto al realizar un promedio 15 muestras de pacientes con trombosis y 15 muestras de donadores sanos se obtiene que por cada 7 colonias generadas de pacientes con trombosis, se obtienen 0.6 colonias de donadores sanos, esto representa una diferencia significativa con una $P < 0.05$ (t Student) **(Figura. 8)**.

Dentro de este análisis también se comparó el tiempo en que aparecen las colonias, siendo en los pacientes con trombosis en donde las colonias aparecen en promedio de las muestras procesadas, el día 13 y en sujetos sanos en el día 18, sin embargo la diferencia no fue significativa (t Student) **(Figura. 9)**.

También se evaluó el número de colonias en pacientes con trombosis respecto al sexo, en donde se obtiene que por cada 8 colonias generadas en mujeres con trombosis se generen 4 colonias en hombres con trombosis lo que representa una diferencia significativa al igual el tiempo en que se presentan las colonias es significativamente menor en mujeres en comparación con pacientes con trombosis **(Figura. 10 y 11)**.

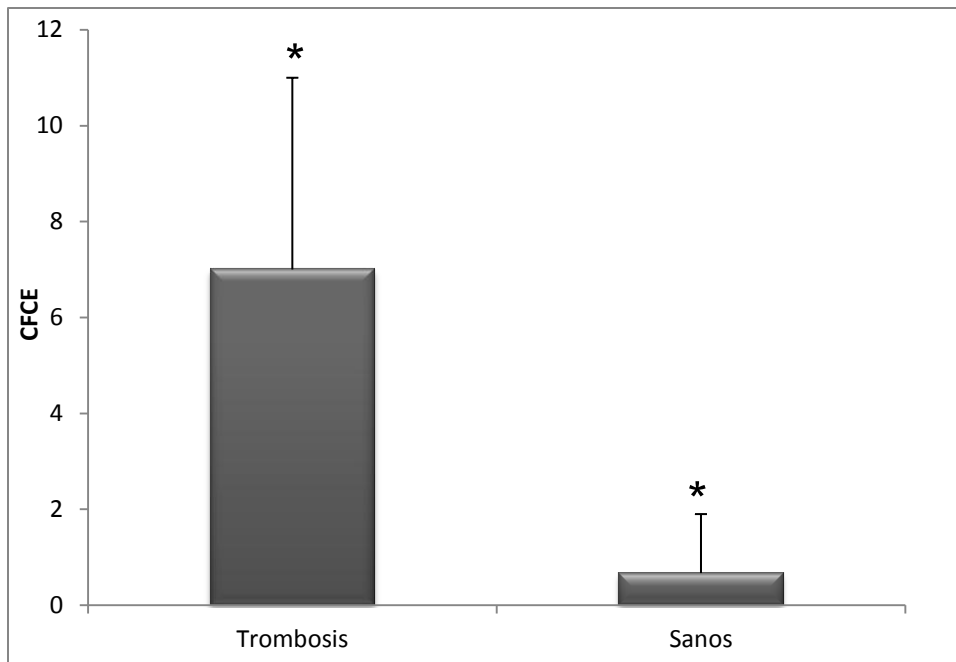


Figura 8. Promedio de 15 diferentes muestras de SP de pacientes con trombosis y sujetos sanos para conocer el número de CFCE generadas. *Diferencia significativa ($P < 0.05$ t Student test)

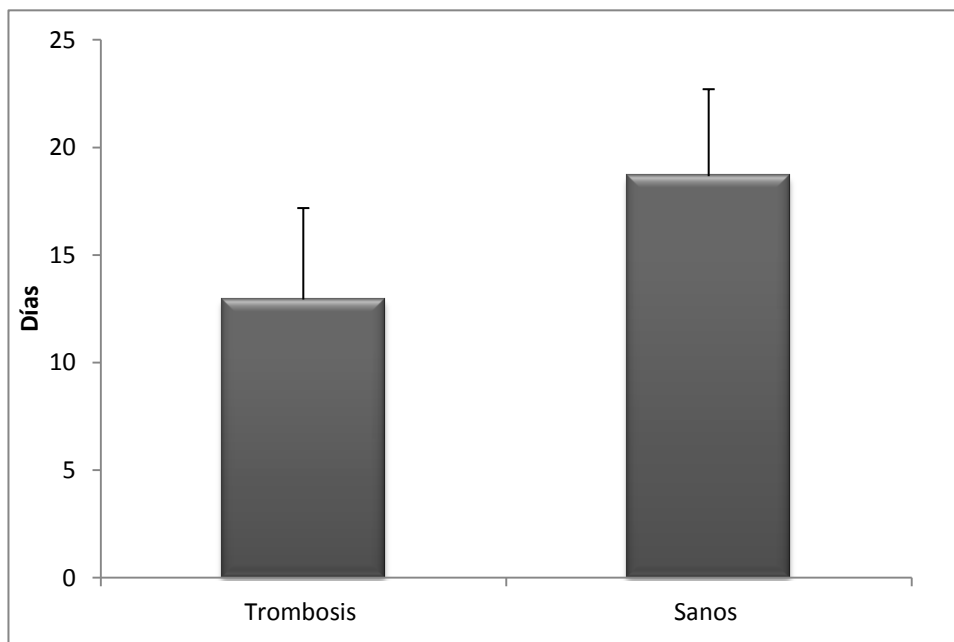


Figura 9. Promedio de 15 diferentes muestras de SP de pacientes con trombosis y sujetos controles en comparación en cuanto a la presencia en cultivo. Sin diferencia significativa.

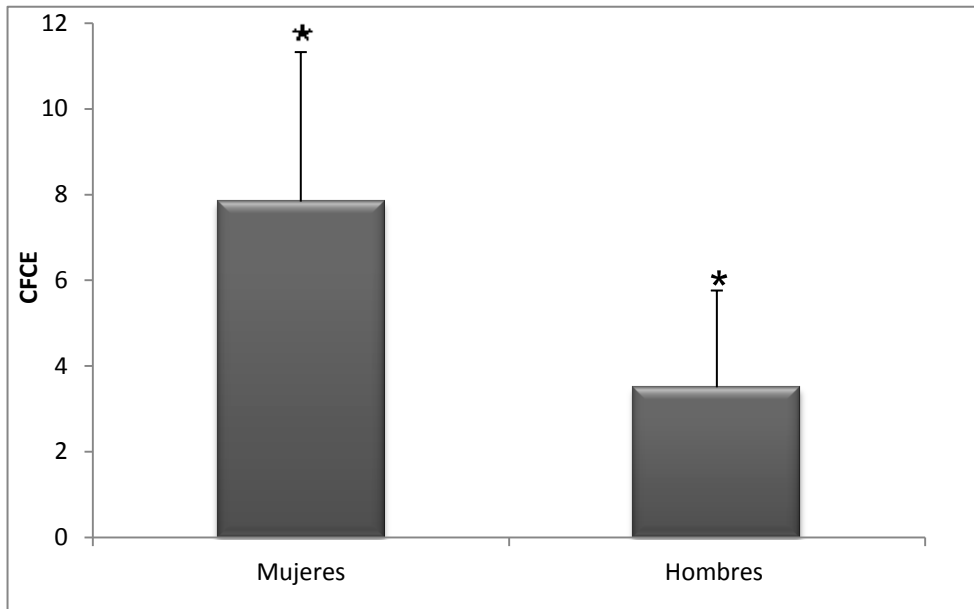


Figura 10. Promedio de 16 diferentes muestras de pacientes con trombosis haciendo una comparación entre ambos sexos. *Diferencia significativa ($P=0.01$ t Student test).

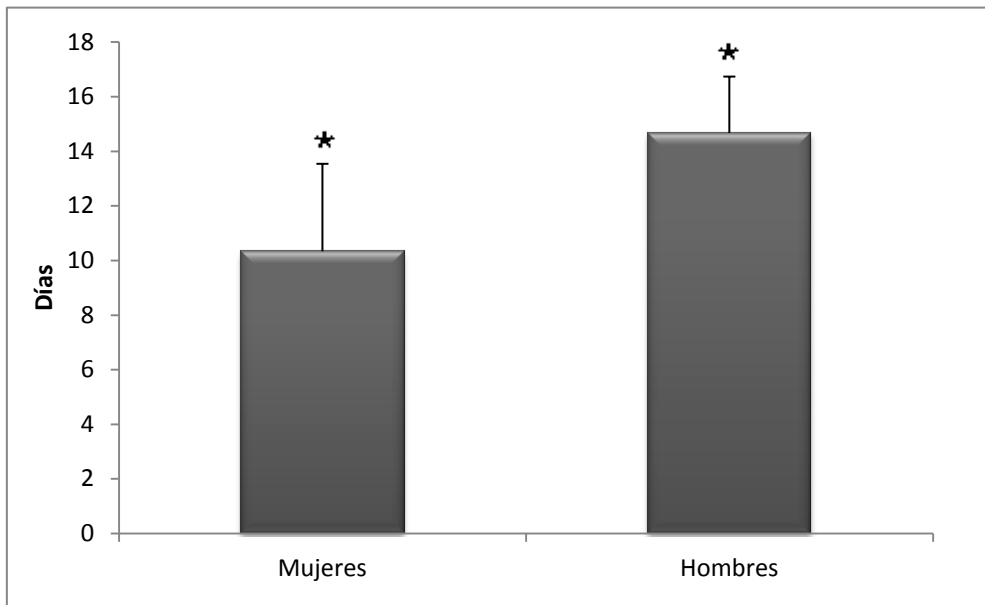


Figura 11. Promedio de 16 diferentes muestras de pacientes con trombosis, en cuanto a al tiempo en que se presentan en cultivo, haciendo comparación entre ambos sexos. *Diferencia significativa ($P=0.032$ t Student test).

INMUNOFENOTIPO DE LAS CFCE

Una de las aplicaciones de la citometría de flujo es la detección de antígenos de superficie celular por medio de un anticuerpo conjugado con un fluorocromo, siendo la intensidad de fluorescencia detectada por el citómetro, directamente proporcional al número de moléculas unidas al antígeno.

Las CFCE generadas fueron analizadas por medio de citometría de flujo. El inmunofenotipo reveló que las células HUVEC, las CE de pacientes con trombosis y las CE de donadores sanos expresan de manera semejante las proteínas de membrana específicas de células endoteliales como es la proteína CD31, CD146, CD34 y KDR (**Figura. 12**). Sin embargo existen diferencias sustanciales en la intensidad de fluorescencia de la proteína CD34 en pacientes con trombosis, al ser comparada con HUVEC y células endoteliales de donadores sanos (**Figura. 12 A, B y C**) así como de una marcada disminución en la expresión de la proteína CD146 de pacientes con trombosis al ser comparadas con HUVEC y CE de donadores sanos (**Figura. 12 D, E y F**). Para la proteína de membrana CD31, la intensidad de fluorescencia se mantiene similar en los tres grupos (**Figura. 12 G, H e I**). También se detecto la intensidad de fluorescencia de KDR, en donde se observa que en células HUVEC es significativamente menor comparada con CFCE de pacientes con trombosis y donadores sanos (**Figura. 12 J, K, L**).

De igual manera es, importante señalar el uso de anticuerpos monoclonales para descartar otros linajes celulares en los cultivos, en donde se obtiene que las colonias de CFCE generadas no expresen proteínas específicas de monocitos como CD14 (**Figura. 13 A, B y C**) y se descarta también la expresión de la proteína de membrana específica de células hematopoyéticas CD45 (**Figura. 13 D, E y F**) de la misma manera no expresan proteínas de membrana que caracterizan a las células mesenquimales o fibroblasto como es el caso de la proteína CD90 (**Figura. 13 G, H e I**).

En la **Tabla 2**, se muestra el promedio de tres experimentos independientes para demostrar el porcentaje de expresión de los antígenos de superficie específicos de

células endoteliales en las CFCE tanto de HUVEC, células de donadores sanos y células de pacientes con trombosis, así como de los antígenos de superficie de células hematopoyéticas CD45 y CD14 y de células mesenquimales o fibroblastos CD90; se observa que el porcentaje de expresión para CD31 y CD146 en las tres muestras se mantiene similar sin presentar una diferencia significativa, sin embargo el porcentaje de expresión de KDR en HUVEC es bajo en comparación con el porcentaje de expresión de CFCE de donadores sanos y pacientes con trombosis lo que representa una diferencia significativa. El porcentaje de expresión de KDR, en donadores sanos y pacientes con trombosis no presenta diferencias significativas. Dentro de la tabla también se muestra el porcentaje de expresión de CD34, los datos obtenidos indican que hay una elevada expresión de este marcador en CFCE de pacientes con trombosis ya que al comparar con los dos grupos, HUVEC y donadores sanos representa diferencia significativa; al comparar el porcentaje de expresión de este marcador en HUVEC y donadores sanos se obtiene que también hay una diferencia significativa, aun que no es muy marcada.

El porcentaje de expresión del marcador CD45 linaje hematopoyético, es muy bajo en las tres muestras y estadísticamente no se considera significativo, de la misma manera el marcador CD14 correspondiente a una población de monocitos se expresa en un porcentaje bajo y no representa diferencias significativas entre una muestra y otra; para el marcador CD90 el porcentaje de expresión es mínimo o no se expresa. Debido al bajo porcentaje de expresión de estos tres marcadores CD45, CD14 y CD90 no se considera significativo y por lo tanto las CFCE generadas no lo expresan.

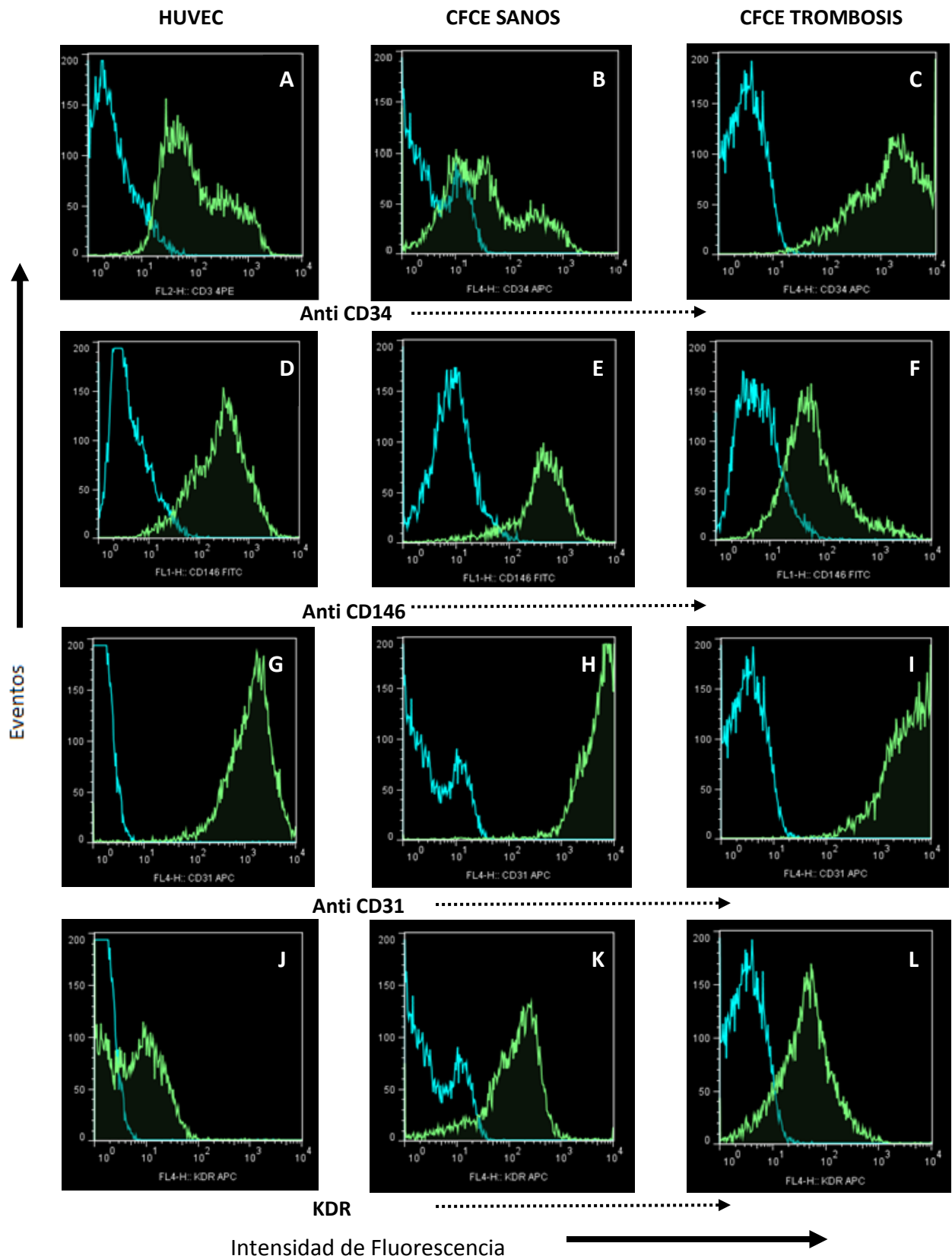


Figura 12. Expresión de CD31, CD34, CD146 y KDR en CFCE de pacientes con trombosis y sujetos sanos.

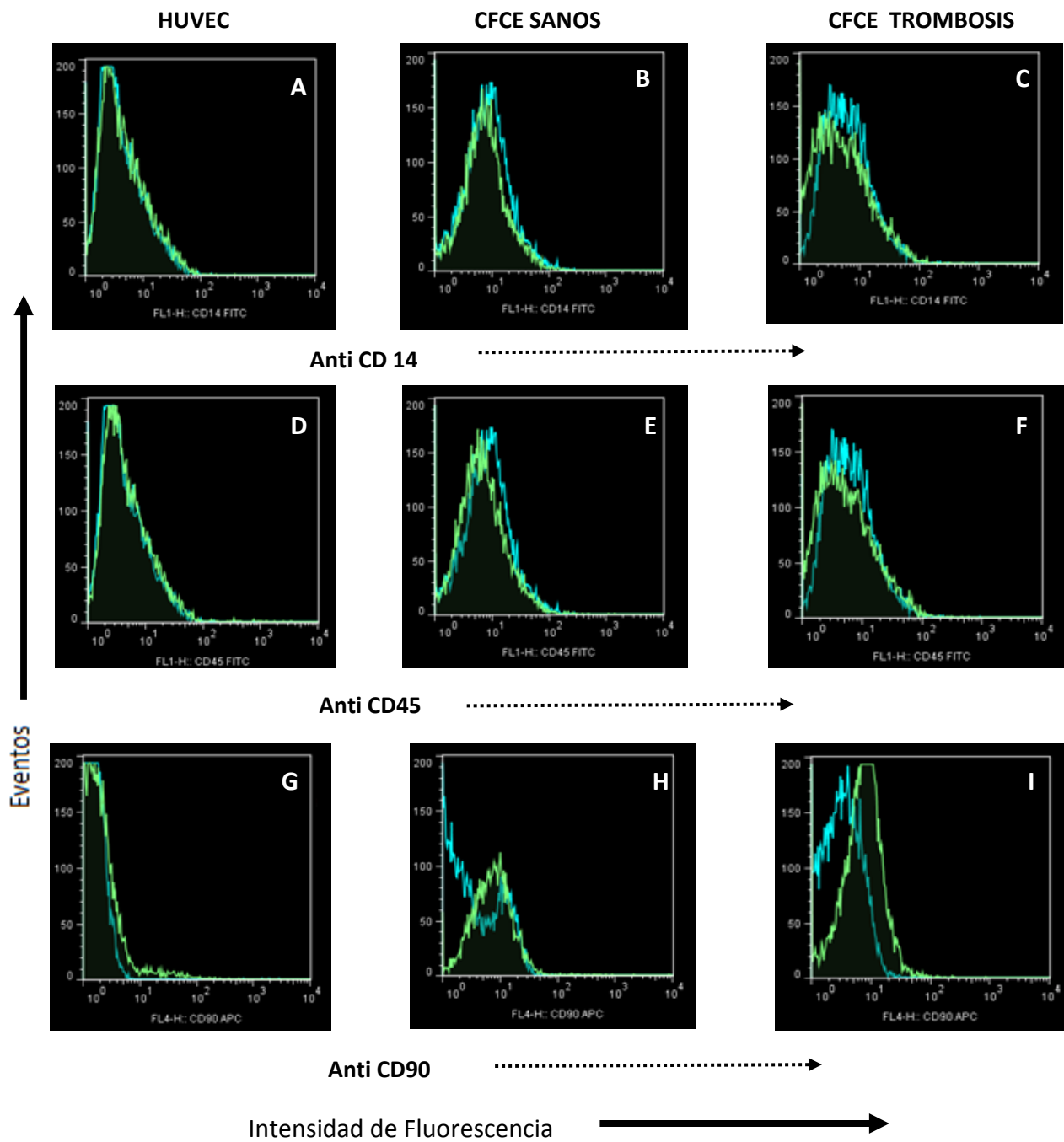


Figura 13. Expresión de CD 14, CD45 y CD90 en CFCE de pacientes con trombosis y sujetos sanos.

Tabla 2. Porcentaje de expresión de antígenos de superficie en células HUVEC, CFCE de sujetos sanos y pacientes con trombosis.

Antígeno	HUVEC	CFCE sujetos sanos	CFCE pacientes con trombosis.
CD31	94.6±3.1	88.3±3.7	94.9±3.2
CD146	84.5±6.4	78.1±5.3	73.5±12.7
KDR	13.5±1.2*†	78.3±1.9^†	67.7±4.2*^
CD34	35±3.8*†	46±1^†	87.5±4.6*^
CD45	4.8±2.2	1.7±1.6	.7±2
CD14	2.23±.8	1.84±.8	1±2
CD90	1.13±.8	.8±.3	1.3±.7

Porcentaje de expresión de CD31, CD146, KDR, CD34, CD45, CD14 y CD90, en HUVEC y en CFCE de donadores sanos y pacientes con trombosis. Se representa la media del porcentaje de expresión de tres experimentos independientes. Diferencia significativa ANOVA ($p \leq 0.05$).

* $P < .001$ ANOVA test CD34 HUVEC & Trombosis

† $P < .001$ ANOVA test CD34 HUVEC & Sanos

^ $P = .007$ ANOVA test CD34 Sanos & Trombosis

* $P < .001$ ANOVA test KDR HUVEC & Trombosis

† $P < .001$ ANOVA test KDR HUVEC & Sanos

FORMACION DE ESTRUCTURAS TUBULARES *in vitro*

La capacidad de las células endoteliales para formar una red vascular *in vitro*, es de vital importancia en el estudio de su biología, ya que nos habla de las cualidades que puede tener para regenerar sitios de daño *in vivo*. Por lo tanto, para demostrar lo anterior, se utilizaron CFCE de pasaje 3, en un cultivo semisólido enriquecido con VEGF, y después de 24 H, se detectó la capacidad de las células endoteliales generadas para formar una estructura tubular *in vitro*, esto se observó en las CFCE de los pacientes con trombosis, los sujetos sanos y en el control interno, las células HUVEC. Es importante mencionar, que el tiempo en el que se detectaron dichas estructuras fue el mismo para las diferentes muestras **(Fig. 14)**.

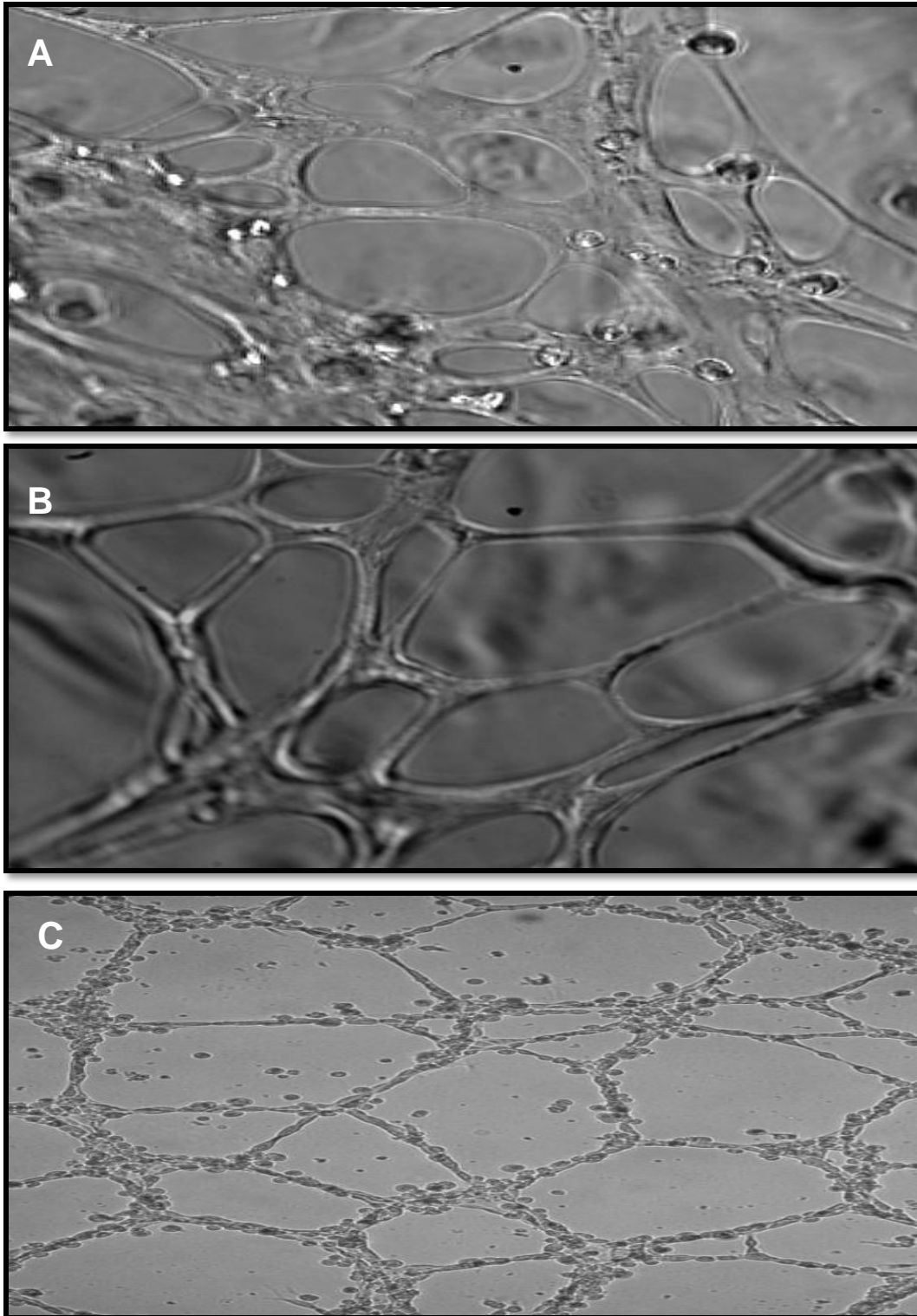


Figura 14. Formación de estructuras tubulares *in vitro*. Fueron sembradas 50,000 CE de pasajes tempranos en un medio semisólido (Matrigel) transcurridas las 24H se observó bajo el microscopio la capacidad de las CE para unirse y formar una red. Red vascular de CFCE de pacientes con trombosis después de 24 H en cultivo 20X **(A)**. Estructura de donadores sanos después de 24 H en cultivo 20X **(B)**. HUVEC después de 24 H en cultivo 10X **(C)**.

IV. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En los últimos años las enfermedades relacionadas con el síndrome metabólico han sido consideradas la primera causa de muerte (WHO, 2011). La trombosis se encuentra dentro de este tipo de enfermedades, representando un alto porcentaje de muerte; existen factores genéticos y adquiridos que predisponen a un estado trombotico, sin embargo también se desconocen algunos de los factores que desencadenan la trombosis. El rol de las CPE está dentro de los factores desconocidos, ya que su aplicación en la regeneración en el sitio de daño endotelial ha sido y sigue siendo un blanco terapéutico para las posibles aplicaciones clínicas a futuro. Es bien sabido, que las CE son aparentemente una fuente restringida de proliferación *in vivo*, pero conservan un potencial proliferativo y se pueden expandir *in vitro* (Huang *et al*; 2009). Para entender las bases celulares y moleculares de la formación del endotelio, es necesario entender la remodelación, reparación y regeneración de la vasculatura y de esta manera contribuir en nuevas áreas de la investigación. El endotelio ha tenido un reconocimiento, gracias a las cualidades de las células endoteliales y los importantes roles que pueden jugar en el mantenimiento de la hemostasia vascular y la patogénesis de una variedad de enfermedades (Aird *et al*; 2007).

Recientemente algunas tecnologías permiten la identificación de las CPE, y son propuestas por representar un componente normal, forman elementos de la circulación sanguínea y juegan roles importantes en la patogénesis de diversas enfermedades.

Un gran número de investigaciones de la última década, hacen referencia a un artículo publicado en 1997 por Ashara y colaboradores, en donde se aísla, caracteriza y examina la función *in vivo* de una población celular, las cuales reciben el nombre de CPE obtenidas de sangre periférica (Ashara *et al*; 1997). Este primer artículo presenta algunas evidencias para considerar la emergencia de un nuevo paradigma en el proceso de neovascularización y una posible vasculogenesis postnatal. Los aspectos tomados en cuenta para caracterizar este

tipo celular son la morfología, el método de cultivo utilizado, marcadores celulares de superficie y ensayos de funcionalidad *in vitro* e *in vivo* (Hirschi *et al*; 2008).

CULTIVO Y MORFOLOGÍA DE CPE

Los estudios acerca de la biología de las CPE son diversos, por lo que existen muchos grupos de investigación enfocados al estudio de las células progenitoras endoteliales. En 1997 Ashara y colaboradores aíslan, caracterizan y examinan *in vivo* la función de una población de CPE de sangre periférica humana (Ashara *et al*; 1997). Ashara hace una relación entre las proteínas de superficie compartidas por el angioblasto y las células madre hematopoyéticas, y de esta manera poder identificar la población de angioblastos circulando en SP de adultos, por lo tanto, en el artículo menciona que el 15.7% de las células presentes en sangre periférica humana adulta expresan CD34, él supone que se podría tratar de una población de CPE, realiza una selección con perlas magnéticas de una población CD34+ y la siembra en una placa de cultivo tratada con fibronectina, dentro de esta investigación se observa que hay células adheridas al fondo de la placa formando clúster *in vitro* con 5 días de cultivo. Esta aportación es retomada por Ito *et al*, quien aísla CMN de sangre periférica y las siembra en una placa de cultivo tratada con fibronectina, después de 24 H retira las células no adherentes del cultivo y las siembra en una nueva placa de cultivo tratada con fibronectina, en donde observa que el número de clúster emerge en el día 7 de cultivo, y las llama colonias de derivadas de CPE.

Por otra parte Hill *et al* modificó la técnica, siembra CMN de sangre periférica durante 48 H en una placa tratada con fibronectina después retira las células no adherentes para posteriormente observar como emergen las CPE. Las células obtenidas por Hill *et al*, reciben el nombre de UFC-Hill. Hirschi *et al*, tiene demostrado que sembrando CMN de sangre periférica en una placa tratada con fibronectina y la presencia de un medio optimizado con factores de crecimiento de células endoteliales, después de algunos días de cultivo aparecen colonias compuestas de agregados celulares en forma de esferas y en la base de esta

colonia surgen células alargadas. Sin embargo, los métodos de cultivo antes mencionados hablan de una población de células hematopoyéticas con algunas características de CPE, las células generadas no tienen la capacidad de seguir proliferando después de ser sembradas en una nueva placa de cultivo, además de que sus características morfológicas en cultivo hablan de agregados celulares que con los cambios de medio pueden desaparecer; más tarde *Lin et al* aísla CMN de sangre periférica de pacientes con trasplante de médula ósea, y las siembra en una placa de cultivo tratada con colágena de rata tipo I, dentro de su investigación encuentra la presencia de dos poblaciones celulares, la primera surge en la primer semana de cultivo y presenta una tasa de proliferación baja, pero también surge otra población entre el día 14 a 21, presentando una alta tasa de proliferación, sugiriendo que el origen es de médula ósea del donante.

Tomando en cuenta los diferentes tipos de cultivos realizados para identificar a una población verdadera de CPE en este trabajo se partió de una población total de CMN de SP de pacientes con trombosis y donadores sanos (**Figura 6 A y B**), sin una selección previa como lo hecho por Ashara, las células fueron sembradas en una placa tratada con colágeno de rata tipo I y el cambio de medio cada 24 H, esta técnica de cultivo se tenía reportada por *Ingram y cols 2004*. Conforme avanzan los días de cultivo, entre los días 12 y 18 para pacientes con trombosis y 15 y 21 para donadores sanos se detecta la presencia de las CFCE (**Figura 6**). Según lo reportado por *Ingram et al 2004* y *Yoder et al, 2007* estas células surgen entre el día 10 al 20 de cultivo lo que sugiere que las células generadas en este trabajo entrarían dentro del rango de aparición en cultivo (*Prater et al; 2007*).

Otra característica descrita por *Ingram y cols*, es que estas células tendrán una alta capacidad de proliferación y que después de ser aisladas de cultivo original y sembradas en una nueva placa de cultivo, logran llegar a confluencia (*Ingram et al; 2004*). Lo observado en este estudio es que estas células tienen una alta proliferación y llegan a confluencia en el día 25 de cultivo (**Figura 6 G**). La morfología encontrada en las CFCE generadas en este trabajo descrita es tipo cobbleston o empedrado, misma que se encontró en otros trabajos (*Ingram et al; 2004, Yoder et al 2007*) (**Figura 7**) lo que confirma que son las verdaderas CFCE.

De igual manera el grupo de trabajo de *Yoder et al*, tiene identificada a esta población celular en sangre periférica de donadores sanos y vena de cordón umbilical, el nombre que recibe esta población es células formadoras de colonias endoteliales CFCE (*Yoder et al; 2004*). Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo indican que existe una mayor frecuencia de CFCE en SP de pacientes con trombosis en comparación con donadores sanos (**Figura 8**), se ha reportado que en patologías cardiovasculares como hipertensión e infartos existen niveles incrementados de CPE en sangre periférica ya que son el resultado de daño mecánico, incluso algunas patologías relacionadas con el sistema inmune como trombocitopenia purpura y en pacientes con insuficiencia cardiaca aguda se correlaciona significativamente con los números de CPE elevados y los niveles de citocinas como el factor de necrosis tumoral también son elevados (*Shantsila et al; 2003*) es claramente indicado en la literatura que el aumento en el número de células endoteliales refleja un daño endotelial (*Francoise et al; 2004*).

Por otro lado también es importante mencionar que las CPE son movilizadas de MO para reparar daños en sitios de isquemia ocasionados por algunas patologías vasculares como por ejemplo en pacientes que sufren infarto agudo al miocardio (IAM) se encuentran altos números de CPE en SP (*Shintani et al; 2001*) partiendo de esta lógica se sugiere que los altos niveles de CFCE encontrados en SP de pacientes con trombosis pueden ser causa de una migración de MO a SP, en un intento por reparar el daño en sitios de isquemia como los ocasionados por la trombosis debido a que en un proceso trombótico existe isquemia y si se prolonga ocasiona necrosis, por lo tanto, las células endoteliales presentes en el vaso sanguíneo, son dañadas secretando algunos quimioatrayentes necesarios para la migración de CFCE indispensables en la reparación vascular.

Otro aspecto importante para determinar el rol de las CFCE en enfermedades vasculares, fue lo realizado por *Güven et al*, quien aísla CFCE y CAC de pacientes con estenosis coronaria, los pacientes de esta investigación fueron clasificados según la severidad de la enfermedad, en donde se encuentra que niveles elevados de CFCE se correlacionan con la gravedad de enfermedad, curiosamente se encuentra que existen altos niveles de CFCE entre más severa

sea la estenosis coronaria (*Güven et al; 2006*). También se hizo una comparación entre la frecuencia de las CFCE y el día en que aparecen tanto en mujeres así como en hombres con trombosis (**Figura 10 y 11**) en donde se observa que la frecuencia de CFCE de SP en mujeres con trombosis es alta y su presencia en cultivo ocurre entre el día 10 en comparación con los hombre que ocurre en el día 15 de cultivo, presentando una diferencia significativa. Existen algunos estudios en donde se correlaciona el efecto de la terapia de estrógenos, ya que el aumento en los niveles de estrógeno en la sangre se correlaciona con el número de CPE circulantes. En un modelo animal de lesión carotidea, el tratamiento con estradiol mostró efectos estimulantes sobre la movilización, proliferación, migración, actividad mitogénica en CPE así como la inhibición de la apoptosis (*Iwakura et al; 2003*).Lo que sugiere que el aumento obtenido en CFCE de mujeres con trombosis se puede deber a una terapia hormonal.

INMUNOFENOTIPO

Existe una controversia acerca de fenotipo presente en las CPE, ya que hasta el momento no hay un marcador específico para este tipo celular (*Hirschi et al; 2008*). *Ashara et al*, hace una relación entre las proteínas de superficie compartidas por el angioblasto y las células troncales hematopoyéticas, partiendo de esta información, poder identificar la población de CPE circulando en SP de adultos, el antígeno CD34 fue desde entonces, una molécula de interés porque es extensamente reconocido como el marcador principal utilizado para aislar CTH humanas en un trasplante (*Verfaillie et al; 2002*) es una sialomucina expresada en el mesodermo durante en desarrollo embrionario, por lo tanto estará presente en sangre, endotelio, epitelio y en poblaciones de células troncales cancerosas; partiendo de esta información en este trabajo se utilizo a la proteína CD34 para caracterizar la población de CFCE, en donde se obtiene que las CFCE generadas de donadores sanos, pacientes con trombosis son positivas para este marcador (**Fig. 12 A, B y C**), el porcentaje de expresión en donadores sanos y HUVEC se expresa en un 46% y 35% respectivamente sin embargo, llama la atención que en

CFCE de pacientes con trombosis el porcentaje de expresión se eleva hasta un 87.5%; en la literatura se maneja que CD34 es una molécula de adhesión y se ha planteado que desempeña un papel en la localización y adhesión de células troncales y progenitoras en el estroma de la médula ósea (*Krause et al; 1996, Carlo et al; 1995*). Por otro lado el marcador CD34 nos habla de inmadurez en el caso de las células hematopoyéticas con una alta proliferación y capacidad de regeneración (*Krause et al; 2001*) relacionando estos datos a los obtenidos en este trabajo, específicamente por la alta expresión de la proteína CD34 en CFCE de pacientes con trombosis, nos hablaría de CPE inmaduras, con una alta tasa de proliferación y quizá con la capacidad de regeneración en sitios de daño.

Acerca del estudio original reportado por *Ashara et al;* utilizando una población enriquecida con 15-20% de células CD34 y KDR fueron localizadas en áreas de neoangiogénesis *in vivo*, KDR es el Receptor del Factor de Crecimiento Endotelial vascular (por sus siglas en inglés VEGFR) y está presente en órganos derivados del mesodermo, como endotelio y tejido cardíaco.

En este trabajo también se determinó la presencia de KDR, siendo positivos en los tres grupos (**Figura 12**) se observa que en CFCE de pacientes con trombosis el porcentaje de expresión es alto comparada con HUVEC (**Tabla 2**) lo que podría sugerir que estas células pudieran estar contribuyendo a la formación de vasos sanguíneos, ya que en la literatura se maneja que la asociación en la expresión de KDR y CD34 pudiera estar contribuyendo a la neoangiogenesis en adultos (*Hirschi et al; 2008*). *Vasa et al*, encuentra una expresión de vWF y KDR en las CPE que genera y menciona que existe una relación entre la concentración de CPE en circulación y el incremento del factor de riesgo para el desarrollo de enfermedad arterial coronaria en humanos (*Vasa et al; 2001*), sin embargo, se tiene reportado que estas células co-expresan los antígenos CD45, CD14, CD68 y E-selectina, presentando la habilidad de fagocitar bacterias, una característica principal de los macrófagos (*Rhode et al, 2007; Zhang et al, 2006; Rehman et al; 2003*). Los datos obtenidos en este trabajo indican que las CFCE generadas son completamente negativas para la expresión de CD45 y CD14 (**Figura 13**) lo que sugiere que se tratan de verdaderas CFCE; ya que en la literatura se maneja que esta población

es completamente negativa para que indica que no tiene un origen hematopoyético CD45, CD14 y CD115 por lo tanto no tienen la habilidad de fagocitar bacterias (*Yoder et al; 2007*). También se determinó la expresión de CD146, en donde se observa que las tres muestras son positivas para este marcador (**Figura 12**), se detecta una alta expresión de CD146 en células HUVEC en comparación con CFCE de pacientes con trombosis (**Tabla 2**), hasta hace algún tiempo se creía que CD146 se expresaba en endotelio maduro, sin embargo se estudió a una población de CPE de pacientes con IAM y los resultados demostraron que existe una población de CPE que son positivas para CD146, tienen la capacidad de seguir proliferando y expandirse en cultivo sin alterar sus características morfológicas y funcionales, teniendo actividad proangiogénica (*Delorme et al; 2005*) lo que confirmaría que las CFCE generadas en este trabajo tienen una alta capacidad de proliferación.

Ingram et al 2004, utiliza este marcador para identificar a la población de CFCE por medio de citometría de flujo y encuentra resultados similares en cuanto a la expresión de CD146 tanto en HUVEC como en SP de donadores sanos. De igual forma se evaluó la expresión de CD31, la cual pertenece a la familia de las inmunoglobulinas y es expresada altamente en la vasculatura, por lo que se ha propuesto que también actúa como una molécula de acoplamiento de otras proteínas como las integrinas, y de esta manera proporcionar más fuerza a las estructuras vasculares. En este trabajo la expresión de CD31 es alta (**Tabla 2**) al comparar nuestros resultados no encontramos diferencias en cuanto a las nuestro control interno HUVEC, CFCE de donadores sanos y pacientes con trombosis, semejante a lo reportado por *Ingram et al 2004* sobre la expresión de CD31 para HUVEC y CFCE de sujetos sanos.

FORMACIÓN DE ESTRUCTURAS TUBULARES

La formación de una estructura tubular *in vitro* requiere de una matriz usualmente compuesta de colágena o fibronectina y parece ser una característica única de las células endoteliales. En algunas estructuras que se forman por uniones celulares, las células se extienden en cultivo formando una línea, ya que muchos tipos celulares tienen esta capacidad, incluyendo células epiteliales de mamíferos, sin embargo, su fenotipo y función no es de células endoteliales. En contraste, la formación de una estructura tubular es un proceso mucho más complejo ya que requiere la elongación y coalescencia de las células endoteliales en cultivo (*Hirschi et al; 2008*). Las células endoteliales están constantemente en contacto con la matriz extracelular (MEC) debido a que es necesaria para su mantenimiento principalmente colágena. Recientemente *Davis y cols.* desarrollan otro método de cultivo para obtener estructuras tubulares, en donde utilizan un gel y siembran en placas de pozos, después de que la gelatinización es completa, se aplica medio de cultivo, este método ayuda para la formación de estructuras tubulares *in vitro*. Por otro lado *Sieveking et al;* desarrolla *in vitro* el ensayo de estructuras tubulares con CPE descritas por *Ashara* y las encontradas por *Lin et al;* sin embargo, las población de CPE no tienen la capacidad de formar una estructura tubular y las CFCE tienen la capacidad de formar una estructura tubular *in vitro*. Por tanto, en este trabajo las CFCE tienen la capacidad de generar una estructura tubular *in vitro* (**Figura 14**) por lo que no se descarta que en un futuro, después de detalladas investigaciones básicas, puedan utilizarse estas células como una posible aplicación terapéutica para la reparación y regeneración de vasos dañados por algunas enfermedades.

V. CONCLUSIONES

- En las CMN de SP de pacientes con trombosis, existe una alta frecuencia de CFCE.
- Las CFCE de pacientes con trombosis son detectadas en menor tiempo de cultivo y con un alto potencial de proliferación.
- El potencial de proliferación de las CFCE de pacientes con trombosis detectado *in vitro* podría estar relacionado con alta expresión del antígeno CD34 y la de KDR.
- Las CFCE de pacientes con trombosis tienen la capacidad de formar estructuras tubulares *in vitro*, semejante a la de los sujetos sanos.

VI. PERSPECTIVAS

- En base a lo observado en la obtención y caracterización de células formadoras de colonias endoteliales de pacientes con trombosis se propone realizar ensayos de funcionalidad *in vivo* utilizando ratones inmunodeficientes con inducción de isquemia y de esta manera probar su capacidad de regeneración.
- Sería de interés, obtener células mononucleares de medula ósea de pacientes con trombosis e inducir su diferenciación hacia células formadoras de colonias endoteliales para corroborar su presencia en sangre periférica y de esta manera elucidar su posible origen.
- Extender los ensayos de caracterización de células formadoras de colonias endoteliales a otras patologías como diabetes, hipertensión, cáncer entre otras para determinar posibles alteraciones.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aird William C. (2008). Endothelium in health and disease. *Pharmacological Reports* 60: 139-143
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Biología molecular de la célula*. 3. a ed. Barcelona: Ediciones Omega, 1996.
- Amaru Ricardo, Silvestre Julio, Torres Gina (2005). Primera experiencia en aislamiento de células endoteliales humanas en Bolivia. *Cuadernos del Hospital de clínicas*. 50: 2 49-54.
- Ashara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*.; 275: 964-967.
- Blann Andrew D. (2005). Circulating cells: biomarker of disease vascular. *Thrombosis and hemostasis*., 93:228-235.
- Carmelo Carlo Stella, Mario Cazzola, Paolo De Fabritiis, Armando De Vincentiis, Alessandro Massimo Gianni, Francesco Lanza, Francesco Lauria, Roberto M. Lemoli, Corrado Tarella, Paola Zanon, Sante Tura (1985). CD34-positive cells: biology and clinical relevance. *Haematologica* 80:367-387.
- Choi Kyunghee, Marion Kennedy, Alexander Kazarov, John C. Papadimitriou and Gordon Keller (1998). A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 125: 725-732.
- Chung Irene (2004). Virchow's Tria Revisited: Blood Constituents. *Pathophysiol Haemost Thromb*. 33:449-454.
- Cines Douglas B., Eleanor S. Pollak, Clayton A. Buck, Joseph Loscalzo, Guy A. Zimmerman, Rodger P. McEver, Jordan S. Pober, Timothy M. Wick, Barbara A. Konkle, Bradford S. Schwartz, Elliot S. Barnathan, Keith R. McCrae, Bruce A. Hug, Ann-Marie Schmidt, and David M. Stern (1998). Endothelial Cells in Physiology and in the Pathophysiology of Vascular Disorders. *Blood*91:10.

- Conway, E.M., Collen, D., and Carmeliet, P. (2001). Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc. Res.* 49,507–521.
- Critser Paul J. and Yoder M.C. (2010) Endothelial Colony Forming Cell role in neoangiogenesis and tissue repair. *Curr Opin Organ Transplant* 15: 68-74.
- Delorme B. ,Basire A. , Gentile C. , Sabatier S. , Monsonis F. , Blot Chabaud M. (2005). Presence of Endothelial Progenitor cells, distinct from mature endothelial cell, within CD146+ blood cells. *Thrombosis and Hemostasis* 94: 1270-1279.
- Demeure E. C. Byun D. G. Yang L. P. Vezzio N., Delessesse G. (1996). CD31 (PECAM-1) is a differentiation antigen lost during human CD4 T-cell maturation into Th1 or Th2 effector cells. *Immunobiology* 88:110-115.
- Dickson Brenda Craig (2004). Venous Thrombosis: On the History of Virchow's Triad. *University of Toronto Medical Journal.* 81: 3-18.
- Dumont DJ, Yamaguchi TP, Conlon RA, Rossant J, Breitman ML (1992). A novel tyrosine kinase gene located on mouse chromosome 4, is expressed in endothelial cells and their presumptive precursors. *Oncogene* 7:1471–1480.
- Fadini Gian Paolo and Angelo Avogaro (2010). Cell-based methods for ex vivo evaluation of human endothelial biology. *Cardiovascular Research* 87, 12–21.
- Fitridge Robert and Matthew Thompson (2007). The vascular endothelium: structure and function. *Mechanisms of Vascular Disease: A Textbook for Vascular Surgeons.* pp 434.
- Forrai Ariel, Robb Lorraine (2003). The hemangioblast between blood and vessels. *Cell Cycle.* 2:86-90.
- Francoise Dignat- George, José Sampol Gregory Lip, Andrew D. Blann (2004). Circulating Endothelial cells: realities and promises in vascular disorders. *Pathophysiology of hemostasis and thrombosis* 33:495-499.
- Fuentes Arderiu X. (1998). *Bioquímica clínica y patología molecular.* Editorial Reverte S. A. España pp541.

- Fuster Valentín (1997). Atherosclerosis y enfermedad arterial coronaria. Editorial GEA. E.UA. pp63.
- Galley H. F. and N. R. Webster (2005). Physiology of the endothelium. *British Journal of Anaesthesia* 93 (1): 105-13.
- Guideline A. (2010). Investigation and Management of Heritable Thrombophilia. *British Journal of Haematology* 114, 512-528.
- Guven H, Shepherd RM, Bach RG, Capoccia BJ, Link DC (2006). The number of endothelial progenitor cell colonies in the blood is increased in patients with angiographically significant coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 48: 1579–1587.
- Harraz Maged, Chunhua Jiao, Heather D. Hanlon, Rebecca S. Hartley, Gina C. Schattman (2001) CD34– Blood-Derived Human Endothelial Cell Progenitors. *Stem Cells* 19:304- 312.
- Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T (2003). Circulating endothelial progenitor cells vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 248:593–600.
- Hirschi Karen K. (2012). Hemogenic endothelium during development and beyond. *Blood*.119: 4823-4827.
- Hirschi Karen K., David A. Ingram, Mervin C. Yoder (2008). Assessing Identity, Phenotype, and Fate of Endothelial Progenitors Cells. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 28: 000-000.
- Hristov Mihail, Wolfgang Erl and Peter C. Weber (2003). Endothelial progenitor cell: mobilization, differentiation and homing. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 23:1185-1189.
- Huang Lan, Matthew Harkenrider, Meredith Thompson, Pingyu Zeng, Hiromi Tanaka, David Gilley, David A. Ingram, Joseph A. Bonanno, and Mervin C. Yoder (2010). *Association for Research in Vision and Ophthalmology*. 51: 3943-3949
- Ingram David A., Laura E. Mead, Daniel B. Moore, Wayne Woodard, Amy Fenoglio, and Mervin C. Yoder (2005). Vessel wall–derived endothelial cells

rapidly proliferate because they then contain a complete hierarchy of endothelial progenitor cells. *Blood* 105: 2783-2786.

- Ingram David A., Laura E. Mead, Hiromi Tanaka, Virginia Meade, Amy Fenoglio, Kelly Mortell, Karen Pollok, Michael J. Ferkowicz, David Gilley and Mervin C. Yoder (2004). Identification of novel Hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 104: 2752-2760.
- Ingram David A., Noel M. Caplice and Mervin C. Yoder (2005). Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 106: 1525-1531.
- Ito Hideaki, Ilsa I. Rovira, Michael L. Bloom (1999). Endothelial Progenitor Cells as Putative Targets for Angiostatin. *Cancer Research* 59: 5875-5877.
- Iwakura A, Luedemann C, Shastry S. (2003). Estrogen-mediated, endothelial nitric oxide synthase– dependent mobilization of bone marrow– derived endothelial progenitor cells contributes to reendothelialization after arterial injury. *Circulation* 108:3115–21.
- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR (1973). Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins: Identification by morphologic criteria. *J Clin Invest* 52:2745.
- Hur Jin, Chang-Hwan Yoon, Hyo-Soo Kim, Jin-Ho Choi, Hyun-Jae Kang, Kyung-Kook Hwang, Byung-Hee Oh, Myoung-Mook Lee and Young-Bae Park (2004). Characterization of Two Types of Endothelial Progenitor Cells and Their Different Contributions to Neovasclogenesis. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 24:288-293.
- Kleinman K. Hynda and Martin George R. (2005) Matrigel: Basement membrane matrix with biological activity. *Cancer Biology*. 15: 378-386.
- Krause D,S. Fackler MJ. Civin Cl. and May WS. (1996) CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blodd* 87: 1-13.
- Kyrle Paul A. and Eichinger Sabine (2009) Is Virchow's triad complete?. *Blood*, 114: 1138-1139.

- Lambiase PD, Edwards RJ, Anthopoulos P, Rahman S, Meng YG, Bucknall CA (2004). Circulating humoral factors and endothelial progenitor cells in patients with differing coronary collateral support. *Circulation* 109: 2986–2992.
- Lancrin Christophe, Patrycja Sroczynska, Catherine Stephenson, Terry Allen, Valerie Kouskoff, and Georges Lacaud (2009). The haemangioblast generates haematopoietic cells through a haemogenic endothelium stage. *Nature*. 12:892-904.
- Leone Antonio Maria, Marco Valgimigli, Maria Benedetta Giannico, Vincenzo Zaccone, Matteo Perfetti, Domenico D' Amario, Antonio Giuseppe Rebuzzi, and Filippo Crea (2009). From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells. *European Society of Cardiology* 30:890-899.
- Lin Y, Weisdorf DJ, Solovey A, Hebbel RP (2000). Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 105:71–77.
- López José A., Clive Kearon, and Agnes Y.Y. Lee (2004). Deep Venous Thrombosis. *American Society of Hematology*.
- Majluf Cruz Abraham (2007). *Fisiopatología de la trombosis*. Medicgraphic; 143: 11-14.
- Majluf Cruz Abraham, Oscar de Jesús Pérez (2006). *Hematología básica*. Editorial Garmarte. México pp311.
- Makin, S. H. Silverman and G.Y.H Lip (2002). Peripheral vascular disease and virchow ´s triad for thrombogenesis. *Q J Med* 95: 199-210.
- Malone P.C. and P.S. Agutter (2006). The etiology of deep venous thrombosis. *Q J Med* 99:581–593.
- Mammen Eberhard F (1992). Pathogenesis of venous thrombosis. *Chest*. 102: 640-644.
- Martínez Murillo Carlos (2009). *Hemostasia y trombosis*. Guía rápida. Editorial Padro pp105.

- Mazza Joseph (2004). Hypercoagulability and Venous Thromboembolism: A Review. *Wisconsin Medical Journal* 102: 41-49.
- Michiels Carine (2003). Endothelial cells Functions. *Journal of Cellular Physiology* 196:430–443.
- Montero Granados Cindy y Monge Jimenez Tatiana (2010). Patología de la trombosis. *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica*. 591: 73-76.
- Mund Julie A., Myka L. Estes, Mervin C. Yoder, David A. Ingram, Jr. and Jamie Case (2012). Flow Cytometric Identification and Functional Characterization of Immature and Mature Circulating Endothelial Cells. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 32:1045-1053.
- Murray, P. D. F. (1932). The development *in vitro* of the blood of the early chick embryo. *Proc. Roy. Soc. London* 11, 497-521.
- Ozkor Muhiddin A., Jonathan R. Murrow, and Arshed A. Quyyumi (2010). Endothelium: Dysfunction and Repair. *Advances in Vascular Medicine*. 125: 80-92.
- Pearson J.D. (2009). Endothelial progenitor cells – hype or hope?. *Thrombosis and Haemostasis*, 7: 255–262.
- Pendás Rodrigo Jose Angel (2002) trombosis Venosa. *Guia clínica* 26 1-5.
- Peters G. Kevin, Kontos D, Lin Charles, Wonng Adrainne, Rao Prema, Sankar Sabita (2004). Functional Significance of Tie-2 signaling in the adult vasculature. *The endocrine society* 59: 51-71.
- Prater D. N. J. Case, DA Ingram and MC. Yoder (2007). Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells. *Leukemia* 21:1141-1149.
- Pries AR, Kuebler WM (2006). Normal endothelium. *Hand Exp Pharmacol*. 176 Pt 1:1-40.
- Rehman Jalees, Jingling Li, Christie M. Orschell and Keith L. March (2003). Peripheral Blood "Endothelial Progenitor Cells" Are Derived From Monocyte/Macrophages and Secrete Angiogenic Growth Factors. *Circulation* 107:1164-1169.

- Reinisch Andreas, Nicole A. Hofmann, Anna C. Obenauf, Karl Kashofer, Eva Rohde, Katharina Schallmoser, Karin Flicker, Gerhard Lanzer, Werner Linkesch, Michael R. Speicher and Dirk Strunk (2009). Humanized large-scale expanded endothelial colony-forming cells function in vitro and in vivo. *Blood* 113: 6716-6725.
- Roger H. Linen, Jef M. Arnout, and Desire Collen (2007). *Vascular Endothelial Cell Function and Thrombosis*. Cardiovascular Medicine. Springer. Pp 1567-1580.
- Rohde E. Bartmann C. Schallmoser K, Reinisch A, Lanzer G, Strunk (2007). Immune cells mimic the morphology of endothelial progenitor colonies in vitro. *Stem Cells* 25:1746-17452.
- Rosendaal F. R. (1999). Venous Thrombosis: Prevalence and Interaction of Risk Factors. *Haemostasis*. 29: 1-9
- Rosendaal F. R. (1999). Venous Thrombosis: Prevalence and Interaction of Risk Factors. *Haemostasis* 29 1:1-9.
- Rubanyi Gabor (1993). The role of endothelium in cardiovascular homeostasis and diseases. *Journal of cardiovascular pharmacology* 4: S1-S14.
- Ruiz Arguelles G.J. (2009). *Fundamentos de hematología*. Editorial panamericana. México. pp342.
- Sabin, F. R. (1920). Studies on the origin of blood vessels and of red corpuscles as seen in the living blastoderm of the chick during the second day of incubation. *Contributions to Embryology* 9, 213-262.
- Schatteman GC, Awad O. (2004). Hemangioblasts, angioblasts, and adult endothelial cell progenitors. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol*. 276:13-21.
- Serrato Ortiz A (2002). Trombosis Venosa Profunda. Urgencias en atención primaria. Manual pp126.
- Shantsila Eduard, Timothy Watson, and Gregory Y.H. Lip (2007). Endothelial Progenitor Cells in Cardiovascular Disorders. *JACC. J. Am. Coll. Cardiol*. 49:741-752.

- Shintani Satoshi, Toyoaki Murohara, Hisao Ikeda, Takafumi Ueno, Tomoki Honma, Atsushi Kato (2001). Mobilization of Endothelial Progenitor Cells in Patients With Acute Myocardial Infarction. *Circulation* 103: 2776-2779
- Timmermans Frank, Jean Plum, Mervin C. Yoder, David Ingram, Jaime Case (2009). Endothelial progenitor cells: identity defined?. *J. Cell Molecular. Med* 13:87-102.
- Urbich Carmen and Stefanie Dimmeler (2004). Endothelial Progenitor Cells: Characterization and Role in Vascular Biology. *Circ Res.*95:343-353.
- Vasa Mariuca, Stephan Fichtlscherer, Alexandra Aicher, Klaudia Adler, Carmen Urbich, Hans Martin, Andreas M. Zeiher and Stefanie Dimmeler (2001). Number and Migratory Activity of Circulating Endothelial Progenitor Cells Inversely Correlate With Risk Factors for Coronary Artery Disease. *Circulation Research* 89:1-7.
- Verdejo París Juan (2006). Función endothelial. *Medigraphic Artemisa.* 76:164-169.
- Verfaillie CM (2002). Hematopoietic stem cells for transplantation. *Nat. Immunol* 3: 314–317.
- Wagner, R. C. (1980). Endothelial cell embryology and growth. *Adv. Microcirc.* 9, 45-75.
- Wakefield Thomas W. Myers Daniel and Henke Peter. (2008). Mechanisms of Venous Thrombosis and Resolution. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 28:387-391.
- White Richard H. (2003) The Epidemiology of Venous Thromboembolism. *Circulation Research.* 107:I-4-I-8.
- Wolff Goldsmith, Katz Gilchiest Paller (2009). Dermatología en medicina general. Editorial panamericana.
- Yoder M. C. (2009). Defining human endothelial progenitor cells. *Thrombosis and Haemostasis,* 7:49-52.
- Yoder M. C. (2010). Is Endothelium the Origin of Endothelial Progenitor Cells? *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 30: 1094-1103.

- Yoder M.C. Kingler Pauline and Ingram David A. (2009). The definition of EPCs and other bone marrow cells contributing to neoangiogenesis and tumor growth; Is there common ground for understanding the roles of numerous marrow-derived cells in the neoangiogenic process?. *Biochim Biophys Acta* 1:50-61.
- Yoder Mervin C., Laura E. Mead, Daniel Prater, Theresa R. Krier, Karim N. Mroueh, Fang Li, Rachel Krasich, Constance J. Temm, Josef T. Prchal and David A. Ingram (2007). Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood*. 109: 1801-1809.
- Zhang SJ, Wei YJ, Su WJ, Liao ZK, Zhou JY, Hu SS (2006). Adult endothelial progenitor cells from human peripheral blood maintain monocyte macrophage function throughout in vitro culture. *Cell Res*. 16: 577-584.