



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Medicina

División de Posgrado

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

UMAE Hospital General “Gaudencio González Garza”

Centro Médico Nacional La Raza

**Evaluación funcional de células endoteliales provenientes de médula ósea
normal.**

ASESOR: DR. JOSÉ ANTONIO ALVARADO MORENO

**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA
CLÍNICA**

LUZ CRISTINA VITAL ARRIAGA

AÑO: 2015



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.

**EVALUACIÓN FUNCIONAL DE CÉLULAS ENDOTELIALES PROVENIENTES
DE MÉDULA ÓSEA.**

**DRA. LUZ ARCELIA CAMPOS NAVARRO
DIRECTORA DE EDUCACIÓN E INVESTIGACIÓN EN SALUD**

**DR. ABRAHAN SALVADOR MAJLUF CRUZ
JEFE DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA DE TROMBÓSIS,
HEMOSTASIA Y ATEROGÉNESIS.**

**DR. JOSÉ ANTONIO ALVARADO MORENO
INVESTIGADOR ASESOR DE TESIS**

**M. C. JOSÉ RUBICEL HERNÁNDEZ LÓPEZ
INVESTIGADOR COLABORADOR**

**LUZ CRISTINA VITAL ARRIAGA
TESISTA**

El presente trabajo se realizo en el laboratorio de cultivo celular de la Unidad de Investigación Médica en Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis del Hospital Gral. Regional No. 1. Dr. Carlos Macgregor Sánchez Navarro del IMSS bajo la dirección del Dr. Jose Antonio Alvarado Moreno

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por ser mi ejemplo, mi fuerza y apoyo incondicional.

CONTENIDO

	Página
I. Índice general.....	5
II. Abreviaturas.....	7
III. Introducción.....	8
IV. Marco teórico	8
IV. 1 Médula ósea	8
IV. 2 Hematopoyesis.....	9
IV. 3 Microambiente hematopoyético	9
IV. 4 Nicho Hematopoyético	10
IV .5 Célula progenitora endotelial	11
IV. 6 Célula endotelial.....	12
IV. 7.1 El endotelio como regulador del equilibrio hemostático	13
IV. 7.2 El endotelio y reparación tisular	14
IV. 7.2 a) Equilibrio celular	14
IV. 7.2 b) Endotelio y angiogénesis	15
IV. 7.3. Fisiopatología de la célula endotelial	15
IV. 7.2 b) Endotelio y angiogénesis	16
Planteamiento del problema.....	18
Justificación.....	18
Hipótesis.....	18
Objetivo.....	18
Material y Métodos.....	19
Resultados.....	23
Discusión.....	30

Conclusiones.....	32
Referencias.....	33

ABREVIATURAS

MO. Medula ósea

CE. Célula endotelial

CPE. Célula progenitora endotelial.

HSC. Célula madre hematopoyética (por sus siglas en ingles Hematopoietic Stem Cell).

GLUT. Transportador de glucosa.

NO. Oxido nítrico.

PGI₂. Prostaciclina I₂.

TXA₂. Tromboxano A₂.

ET-1. Endotelina-1.

AGM. Aorta-Gonadal-Mesonefros.

CFCE. Células formadoras de colonias endoteliales.

INTRODUCCIÓN

El endotelio es un órgano muy extenso el cual reviste todos los vasos sanguíneos de nuestro organismo, ejerciendo la comunicación entre el torrente sanguíneo y los tejidos, una de las principales funciones es mantener la hemostasia, la sangre en estado líquido, al ser un secretor de diversos factores anti y procoagulantes.

Son pocos los estudios en endotelio dirigidos a enfermedades de la hemostasia y coagulación.

La intención del presente trabajo de tesis es obtener cultivos de endotelio a partir de Médula ósea, en donde se sabe se encuentran las células progenitoras encargadas de su diferenciación y maduración, para su posterior estudio en pacientes diagnosticados con Trombosis.

Se irán exponiendo los aspectos básicos que sustentan el conocimiento necesario para alcanzar los objetivos que en esta tesis se plantean.

A este aspecto se abordará La médula ósea como Microambiente idóneo para células progenitoras endoteliales, así como la naturaleza estructural, funcional y fisiopatológica de la célula endotelial.

MÉDULA ÓSEA

La médula ósea es un tejido esponjoso, que se encuentra en el interior de algunos huesos como una estructura reticular dentro de las trabéculas óseas, como tejido de sostén se encuentran los adipocitos y los fibroblastos del estroma; en su interior se lleva a cabo la Hematopoyesis, la producción de células sanguíneas a partir de células troncales hematopoyéticas que proliferan y se diferencian dando lugar a diferentes tipos de células maduras circulantes. Vega Robledo, 2009.

El componente vascular de la médula engloba los vasos sanguíneos y los sinusoides, y sus espacios intersticiales aparecen ocupados por grupos de células

hematopoyéticas (nichos hematopoyéticos)) que configuran el compartimento hematopoyético.

HEMATOPOYESIS

La hematopoyesis es un proceso donde se generan todos los linajes celulares de la sangre, tales como: eritrocitos, megacariocitos, plaquetas, células mieloides (monocitos, macrófagos y granulocitos), mastocitos, linfocitos T y B, células NK y células dendríticas. Su desarrollo inicia a partir de las células madre hematopoyéticas (HSC por sus siglas en inglés Hematopoietic Stem Cell), dando lugar progresivamente a progenitores más comprometidos hacia un determinado linaje hematopoyético, y terminando en células sanguíneas totalmente diferenciadas.

Se han identificado diferentes tipos celulares de acuerdo al grado de maduración celular, las células más primitivas son las llamadas células troncales hematopoyéticas (CTH), éstas dan origen a las células progenitoras hematopoyéticas (CPH) que a su vez dan lugar a células precursoras las cuales ya presentan características específicas de acuerdo a su linaje, para posteriormente madurar y así generar las células sanguíneas circulantes. Mayani, 2007.

MICROAMBIENTE HEMATOPOYÉTICO

La celularidad hematopoyética en la medula ósea contiene varios tipos de células estromales junto con una matriz extracelular, que contribuyen a conformar el denominado “microambiente medular”, contribuye a la regulación de la hematopoyesis a través de varios mecanismos, entre los que se encuentran la producción de factores de crecimiento (citoquinas) con actividad paracrina, el atrapamiento en el glicocáliz de citoquinas, producidas bien localmente o bien a distancia (actividad endocrina), la interacción mediante moléculas de adhesión y la interacción a través de factores de crecimiento expresados en la membrana

celular. Es aquí en donde las células pueden permanecer indiferenciadas y quiescentes o diferenciarse, Zampetaki, 2008

NICHO HEMATOPOYÉTICO:

Para que la hematopoyesis se lleve a cabo es necesario que las células tengan el ambiente idóneo con las mejores condiciones, a éste sitio se le conoce como nicho hematopoyético, Un tejido local con microambiente que mantiene y regula directamente un tipo particular de célula troncal o célula progenitora. Los nichos de células troncales hematopoyéticas, se encuentran presentes en diversos tejidos a través del desarrollo intrauterino, empezando en el mesonefros aortogonadal, en el saco vitelino, la placenta, hígado fetal, el bazo y la médula ósea. Mohammad, 2015.

En el posnatal la médula ósea es el sitio primario de hematopoyesis y mantenimiento de células madre, pero en respuesta a estrés hematopoyético el nicho puede cambiar a un lugar extramedular. Morrison y Scadden, 2014

Existen tres tipos de nichos íntimamente relacionados entre sí, que protegen y tienen las características necesarias para el mantenimiento de las células troncales.

- Osteoblástico: los osteoblastos producen factores que tienen la capacidad de regular la quiescencia y el mantenimiento de las células troncales hematopoyéticas tales como: angiopoietina- 1 (Arai, Hirao et al. 2004), la osteopontina (Nilsson, Johnston et al. 2005) o la CXCL- 12 (Petit, Szyperkravitz et al. 2012).
- Reticular: Relacionado con el transporte de las células troncales dentro de los nichos, contiene células mesenquimales.
- Vascular: Las células endoteliales sinusoidales de la médula ósea expresan quimiocinas como CXCL- 12 y moléculas de adhesión como E- selectina y

VCAM- 1 que son importantes para la movilización, injerto y alojamiento de las células troncales hematopoyéticas en medula ósea (Butler, Nolan et al. 2010).

CÉLULA PROGÉNITORA ENDOTELIAL

Las células progenitoras endoteliales han sido definidas como células circulantes que expresan una variedad de marcadores celulares de superficie similares a los que expresan las células del endotelio vascular y participan en la formación de nuevos vasos sanguíneos. Yoder 2012.

La diferenciación de células mesodérmicas a angioblastos y posteriormente a células endoteliales se creía que ocurría exclusivamente en el desarrollo embrionario, esto fue refutado en 1997 por Ashara y colegas cuando publicaron células progenitoras hematopoyéticas CD34+ purificadas de adultos podían diferenciarse ex vivo a fenotipo endotelial. Estas células fueron nombradas células progenitoras endoteliales (EPCs Endothelial progenitor cells). Asahara 1997

En 1998 Rafii y sus colaboradores reportaron la existencia de “células progenitoras endoteliales circulantes derivadas de Médula ósea” (CEPCs circulating endothelial progenitor cells) en el adulto, igual células troncales hematopoyéticas CD34+ que demostraron diferenciación a linaje endotelial y expresaban marcadores endoteliales como vWF; entonces estos estudios sugirieron que hay hemangioblastos circulantes en el adulto. Ruffi et al 1994

De acuerdo a los primeros descubrimientos las Células progenitoras endoteliales fueron definidas para ser positivas para marcadores hematopoyéticos como CD34 y la proteína endotelial VEGFR2 (Vascular endotelial growth factor receptor 2) CD34 no es exclusivo de células troncales hematopoyéticas, también en bajos niveles en células endoteliales maduras, los nuevos estudios han utilizado el marcador de inmadurez CD133 y demostrado que células purificadas CD133+ pueden diferenciarse en células endoteliales in vitro.

CD133 también conocido como prominina o AC133, es un antígeno expresado en células stem hematopoyéticas pero ausente en células endoteliales maduras y en monocitos. Urbich 2004.

Se ha descrito que en SP existen células endoteliales circulantes provenientes de la médula ósea, las cuales expresan diferentes antígenos de superficie

- 1.- origen a partir del hemangioblasto células troncales hematopoyéticas
- 2.- Células mieloides, que se pueden diferenciar a células endoteliales bajo presión selectiva de cultivos.
- 3.- Otras células progenitoras circulantes (población vecina o de al lado)
- 4.- Células endoteliales maduras circulantes que se adhieren al plato de cultivo.

Hebbel y sus colegas demostraron que de células mononucleares de sangre periférica pueden crecer diferentes poblaciones de células endoteliales en cuanto su morfología y función. Yoder, 2010.

Para la descripción morfológica se han utilizado diversas técnicas para cultivo de estas células, describiéndose dos: CPE “tempranas” que aparecen 4-7 días de cultivo con forma de huso y que expresan marcador endotelial (Factor von Willebrand), así como marcador monocítico (CD14). Las CPE “tardías” que se desarrollan después de 2-3 semanas de cultivo y tienen características de linaje endotelial como el patrón en empedrado (coblestone) y la expresión de Oxido nítrico sintetasa endotelial. Sven Möbius-Winkler, 2009.

Dos poblaciones obtenidas de MO: temprana: VEGFR2+/VE-caderina+/CD14+ (mieloide)/ CD45+ (leucos) Tardias: CD14-/CD34+/VEGFR2+/AC133+.

Ambas pueden inducir reovasculaturas. Goligorskym 2013.

CÉLULA ENDOTELIAL

Es la célula constitutiva de vasos sanguíneos y linfáticos, tienen muchas funciones, y juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la sangre líquida (forman parte del control de la coagulación y la trombólisis), el tono

vascular, permeabilidad vascular, inflamación, reparación de tejidos, así como angiogénesis y vasculogénesis; también poseen funciones en conjunto con los órganos aledaños. E. Solder,2012.

Las células endoteliales se unen entre sí conformando una capa semipermeable que tapiza los vasos de todo nuestro organismo. El endotelio es considerado como un órgano por su gran extensión y por sus múltiples funciones. Se trata de un epitelio de revestimiento monoestratificado que representa el elemento más importante del vaso sanguíneo, donde integra la túnica íntima. Sus células son poligonales y planas, con eje mayor orientado en sentido del flujo sanguíneo, de entre 25 y 50 micras y entre 10 y 15 micras el eje transversal. El núcleo celular suele orientarse en el sentido del eje mayor de la célula. En su citoplasma se aprecian con microscopia electrónica, aparte de los organelos habituales, los característicos cuerpos de Weibel-Palade, que son gránulos secretorios donde se almacena el factor de von Willebrand. El citoesqueleto de la célula endotelial está formado por tres tipos de estructuras bien definidas: microtúbulos, microfilamentos (filamentos de actina) y filamentos intermedios, que están formados por vimentina; estos definen la forma y la arquitectura interna celular, permite el transporte intracelular, mediante procesos de endocitosis y exocitosis, participan activamente en la mitosis y en los procesos de modulación de receptores de superficie y participan en los procesos de interacciones intercelulares. (Yoon M, 1998; Bouis D, 2001; Sumpio B, 2002; Howell GJ, 2004).

EL ENDOTELIO COMO BARRERA DE PERMEABILIDAD SELECTIVA

Permite por vía transcelular el paso del agua, gases respiratorios, pequeñas moléculas grasas e incluso ciertas macromoléculas. Por vía paracelular, la trans migración de leucocitos. En las uniones intercelulares se encuentran las zonas ocluyentes y las uniones adherentes. Ambos sistemas de unión tienen un fuerte anclaje al citoesqueleto. Las células endoteliales están expuestas a fuerzas de cizallamiento y a la presión hidrostática por parte del flujo sanguíneo, teniendo la capacidad de adaptar sus propiedades de barrera frente a las presiones

sistémicas. Dentro de las uniones adherentes se encuentra la VEcadherian, cuya fosforilación influye directamente en la permeabilidad vascular, angiogénesis, transmigración de leucocitos e inhibición del crecimiento por contacto de la célula endotelial. Shin, 2003; Washke J, 2005, Chiu Y, 2004.

EL ENDOTELIO COMO REGULADOR DEL TONO VASCULAR

La célula endotelial sintetiza y libera sustancias vasodilatadoras: óxido nítrico (NO), prostaciclina y adenosina, que se contrarrestan en un equilibrio constante con otras vasoconstrictoras como la endotelina-I, la angiotensina-II y el tromboxano A2. El óxido nítrico deriva de la L-arginina por acción de la óxido nítrico sintasa (NOS), que puede tener varias isoformas. La NOS-III o NOS-Endotelial es calcio-calmodulina dependiente y de expresión constitutiva. Tiene efecto antiagregante y adherente plaquetario, inhibe la adhesión de leucocitos a la pared vascular, disminuye la proliferación y migración de células musculares lisas e inhibe la apoptosis de la célula endotelial mediante inhibición de la activación de la caspasa 3 (Makhoul R, 1999; Dimmeler S, 1999).

EL ENDOTELIO COMO REGULADOR DEL EQUILIBRIO HEMOSTÁTICO

Las sustancias procoagulante o antifibrinolítica que sintetiza y libera el endotelio son: factor von Willebrand (vWF), factor tisular-tromboplastina (TF), platelet-activating factor (PAF), inhibidor del plasminógeno activado (PAI-1 y PAI-2), tromboxano A2 (TXA2), Factor V. Las sustancias anticoagulantes o fibrinolítica son: prostaciclina (PGI2), óxido nítrico (NO), trombomodulina, proteína S, heparan sulfato, proteoglicanos, activador del plasminógeno tisular, antitrombina III. Sumpio B, 2002.

De forma natural la relación PGI2/TXA2 siempre es mayor a uno en los endotelios sanos. La carga electronegativa que los proteoglicanos le confieren al endotelio también repelle la carga positiva de las plaquetas. Hay dos mediadores liberados por células endoteliales activadas que favorecen la agregación plaquetaria: el

factor activador plaquetario (PAF), sintetizado por estas células cuando son estimuladas por la trombina, histamina o citosinas. El segundo es el factor de von Willebrand (vWF), cuya fuente principal es el endotelio, que es constitutivamente secretado en el plasma y la matriz subendotelial. Este factor se almacena en grandes cantidades en los corpúsculos de Weibel-Palade, que pueden ser movilizados en respuesta de trmmmbina u otros activadores. Además el vWF fija y estabiliza el factor VIII, necesario para la agregación plaquetaria al endotelio dañado. En las células endoteliales, la trombina provoca también la aparición de P-selectina y citosinas. Las células endoteliales también cambian su perfil e incrementan érmeabilidad. Estos cambios inician n estado procoagulante y proinflamatorio. Es por ello que un estado séptico grave puede llevar a la coagulación intravascular diseminada. Michiels C, 2003, Esmon Ch, 2004.

ENDOTELIO Y REPARACIÓN TISULAR

EQUILIBRIO CELULAR

Las células endoteliales están normalmente en una fase quiescente. En el adulto su ciclo celular varía de meses a años. Sólo las células endoteliales de vasos endometriales y del cuerpo lúteo tienen un ciclo de semanas. Sin embargo, tras un daño celular se activan, modifican su fenotipo, migran y proliferan para cicatrizar-reepitelizar la lesión en pocos días. Bachetti T, 2000.

La célula endotelial tiene una serie de estímulos fisiológicos que la hacen persistir en el tiempo, bloqueando la apoptosis.

1.- Contacto intercelular, célula – célula o bien con la membrana basal. La pérdida de los anclajes físicos supone el desencadenamiento de la apoptosis. La matriz extracelular genera señales de supervivencia que suprimen el gen P-53.

2.- Factores de crecimiento, in vivo e in vitro. La presencia de VEGF, FGF y ECGF se relaciona con la inhibición de la apoptosis de la célula endotelial.

3.- Angiopoyetina-1, ligada a su receptor Tie-2, promueve señales de supervivencia.

4.- Fuerzas de cizallamiento del torrente circulatorio. El shear stress provoca sobreexpresión del gen de la eNOS, lo cual produce niveles altos de NO local, que inhibe la activación de la caspasa-3. Dimmeler S, 1999

La célula endotelial tiene también innumerables potenciales desencadenantes de la muerte celular por apoptosis. La exposición al factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o al interferón gamma (IF- γ), angiostatina, monocitos preactivados por lipopolisacáridos bacterianos o por radiaciones ionizantes, desencadenan apoptosis. Mallat Z 2000.

El potencial de proliferación endotelial no es equivalente en todas las células endoteliales. Además las recientes referencias dicen que las células endoteliales proliferativas estén probablemente retenidas y estacionarias en la íntima, pero es posible que estas células se puedan convertir en migratorias incluso movilizadas con activación.

El exacto estímulo para inducir replicación endotelial sigue sin saberse, pero pudiera representar un mecanismo para reemplazar células dañadas o senescentes sin exposición de membrana basal.

La pérdida endotelial por lesión y el resultado de pérdida de inhibición por contacto podría ser un estímulo para inducción de migración y replicación endotelial, es probable que las células dañadas emitan algún mensaje a las células saludables aledañas, que puede estimular tan lejos como 240 μ m (micras). Yoder, 2010.

ENDOTELIO Y ANGIOGÉNESIS

El término angiogénesis hace referencia a la capacidad especial de crear estructuras vasculares ex novo a partir de otras preexistentes. Representa un fenómeno fisiológico en la cicatrización de heridas y reparación tisular en general. Rodríguez-Morata A, 2003

Las células endoteliales son el elemento necesario para la angiogénesis. La llegada de factores angiogénicos a la superficie endotelial, como es exclusivo del VEGF y de miocitos de la pared vascular (VEGF y FGF), desencadena un aumento de la permeabilidad vascular, en ambos casos mediada por el NO. El fibrinógeno se libera al intersticio donde se polimeriza en una red de fibrina que sirve de anclaje para células endoteliales activadas (en mitosis) y pericitos adventiciales. La disrupción de la membrana basal y degranulación de la matriz extracelular es llevada a cabo fundamentalmente por metaloproteasas (estreptomelisin, colagenasa, gelatinasa) y plasmina, sintetizadas localmente, penetrando así las células endoteliales por fibrinólisis en esa red, migrando, proliferando y finalmente, organizándose en nuevas estructuras tubulares. Kleinmann H, 2003.

FISIOPATOLOGÍA DE LA CELULA ENDOTELIAL

La pérdida de la capacidad del endotelio para modular el comportamiento fisiológico del lecho vascular es lo que se denomina como disfunción endotelial.

La disfunción endotelial y el estrés oxidativo.

La presencia de factores de riesgo de aterosclerosis conduce, directa o indirectamente, a la disfunción endotelial como una reducida biodisponibilidad del NO en todo el territorio arterial, con sus consecuencias.

El estrés oxidativo (definido por un aumento del cociente Radicales libres derivados del O₂/ antioxidantes del organismo) es tolerable hasta cierto punto si su incremento es gradual. Sin embargo, llega el momento en que la situación oxidativa es excesiva y ocurre muerte celular. Jeremias A, 2004.

Se ha demostrado una íntima relación entre el estado del endotelio con diferentes patologías, una que tiene un fuerte impacto en salud pública es la Trombosis, que puede ser arterial y desencadenar Infarto agudo al miocardio o venosa, que puede desencadenar una Tromboembolia pulmonar la cual tiene una alta tasa de mortalidad.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han descrito diversas técnicas de obtención de células progenitoras endoteliales de sangre periférica aunque su frecuencia es muy baja, se sabe que la fuente de esas CPE son los nichos de la Médula ósea, por lo que la obtención de ésta fuente considerando que hay un mayor número de éstas células, podrían facilitar la caracterización y evaluación funcional, para futuros estudios de endotelio.

JUSTIFICACIÓN

La generación de CE a partir de sus progenitores, ha sido abordada por diversos grupos de trabajo, lo que ha llevado a conocer su fenotipo y características funcionales. Sin embargo, en lo que respecta a la MO, poco se conoce acerca de la diferenciación endotelial, partiendo de poblaciones inmaduras hasta llegar a un estado maduro y funcional, por lo que en este estudio se abordaron aspectos relacionados con la formación de estructuras vasculares *in vitro* a partir de poblaciones de CMN provenientes de MO normal, las cuales han sido seleccionadas hasta el establecimiento de células endoteliales. Este estudio permitirá en un futuro determinar pruebas funcionales e identificación de CE obtenidas de MO de pacientes con trombosis y detectar posibles alteraciones funcionales descritas como disfunción endotelial, consideradas como otro factor de riesgo para la predisposición a trombosis.

HIPOTESIS

Diversos estudios han reportado la presencia de células progenitoras endoteliales en sangre periférica normal humana y si consideramos que estas células pueden tener un origen común al tejido hematopoyético, es probable que en médula ósea existan células endoteliales con características fenotípicas y funcionales semejantes a los ya descritos en sangre periférica.

OBJETIVO GENERAL

Obtener *in-vitro*, células con características fenotípicas y funcionales de CE a partir de CMN provenientes de médula ósea normal.

Objetivos particulares

- Obtener y sembrar CMN provenientes de médula ósea de sujetos de clínicamente.
- Identificar por citometría de flujo en el día 28 de cultivo, células adherentes con fenotipo específico para células endoteliales: CD146.
- Evaluar en las células endoteliales obtenidas, la formación de estructuras tubulares en una matriz de medio de cultivo semisólido.

MATERIALES Y METODOS

MUESTRAS CONGELADAS

Para el desarrollo del presente protocolo, se descongelaron 10 diferentes muestras de células mononucleares (CMN) de médula ósea normal, las cuales fueron colectadas de sujetos clínicamente sanos, previo consentimiento informado

de las caderas que se seccionan quirúrgicamente (y que normalmente son sometidas a cremación ya que no tienen ninguna otra utilidad) y que requieren un reemplazo articular en el Servicio de Cirugía de Reemplazo de Cadera del HGR/UMMA No. 2 Villa Coapa del IMSS. Dichas muestras fueron previamente congeladas y almacenadas a -170°C , en el laboratorio de cultivo celular de la Unidad de Investigación Médica en Trombosis Hemostasia y Aterogénesis del Hospital Gral. Regional No. 1. Dr. Carlos Macgregor Sánchez Navarro del IMSS.

De igual manera, como control positivo de CE descongelamos y usamos las células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC), que fueron obtenidas de cordones umbilicales de nacimientos a término, tanto de cesáreas como partos normales, del Hospital General de Zona Troncoso, del IMSS. Las muestras de MO y cordón umbilical se obtuvieron de acuerdo con las Normas Institucionales y del Comité de Ética del Hospital General Regional No. 2 Villa Coapa y del Hospital General de Zona Troncoso IMSS.

Cultivo de células endoteliales (CE)

Las CMN se resuspendieron en medio-199 (GIBCO, USA) al 10% de Suero Fetal Bovino (SFB), suplementado con 10 ng/mL de penicilina/estreptomicina (GIBCO, USA) y Gentamicina (Corporation Invitrogen, USA) antimicótico, 10 ng/mL de Anfotericina B (GIBCO, USA). Las células fueron sembradas en placas de plástico para cultivo de 6 y 24 pozos (Corning, USA), 200,000 células/pozo, se incubaron a una temperatura de 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 y condiciones de humedad (Incubadora Nuair, USA). El número de células nucleadas y CMN viables fue determinado mediante el uso de una cámara de Neubauer (Marienfeld, Germany) con solución diluyente de Turk y azul tripano respectivamente (Hycl, México). Cada 3 días el medio de cultivo fue sustituido por medio fresco, hasta que las células llegaron una confluencia del 60 al 80 %. Al cuarto día se recolectaron las células del sobrenadante (no adherentes) y fueron utilizadas para otros estudios. A las células adheridas en los primeros días se les puso medio fresco, respectivamente, las cuales una vez ubicadas (Invitrogen, USA) para

disociar a las CE, posteriormente fueron sembradas en un nuevo pozo y así se mantuvieron por otros 7 días más hasta en cultivo o 28 días en total desde el inicio; en este punto llegaron a una confluencia del 60 al 80%, es aquí donde ya obtuvimos CE, libres de otras *células* contaminantes tales como células hematopoyéticas, mesenquimales y fibroblastos.

Morfología celular

Se observaron las células con un microscopio invertido (Olympus, Japan) y se tomaron imágenes con una cámara fotográfica microPublisher 5.0 RTV (Qimaging, Canada), en los días cero y 28 de cultivo, para analizar los cambios morfológicos observados en las células obtenidas.

Inmunofenotipo de las CE

Las células sembradas en el día cero y las detectadas en el día 28, en fase de confluencia fueron cosechadas con Tripsina al 0.05% en EDTA (Invitrogen, USA) por 5 min a 37 °C, se inactivo a la enzima con SFB y se resuspendieron en medio 199 y se contaron. Se colocaron 1×10^5 células en tubos de plástico (Eppendorf, Germany). Posteriormente fueron centrifugadas a 500 g y el sobrenadante fue eliminado; las células fueron incubadas (4°C por 30 min) con 5 µl de los anticuerpos monoclonales anti-humano de ratón, conjugados con diferentes fluorocromos, los anticuerpos a una concentración de: 20 µg/mL de CD45 (MACS, FITC), CD90 (eBioscience, APC), CD146 (MACS, FITC). Posteriormente se realizó un lavado a las células con PBS al 3% de SFB. Finalmente se adquirieron 30,000 eventos en un Citómetro de Flujo (FACS Calibur) (Becton Dickinson, Co. USA). También se realizó el análisis por citometría de flujo a las CMN cuando se obtuvieron en el inicio del cultivo (día 0).

Ensayo de estructuras tubulares

Las CE del día 28 (2×10^5 por 75 cm^2) se sembraron en medio 200PRF con un suplemento de crecimiento bajo en suero (GIBCO, USA) en un volumen total de 15 mL. Se hicieron cambios de medio cada 24 horas durante 5 días, hasta tener una confluencia de las CE aproximadamente del 80%. Al día 6 se trató un pozo de una placa de 96 pozos con 50 μL de Geltrex™ (GIBCO, USA), se cosecharon las células del pozo con Tripsina al 0.05% (Invitrogen, USA). Se sembraron $3.5\text{-}4.5 \times 10^4$ células junto con el medio suplementado en la placa pre-tratada previamente, se incubaron toda la noche y se observaron las estructuras tubulares al día 7 del ensayo.

RESULTADOS

1.- Microscopia óptica:

En las células HUVEC de pasaje 3 se observaron colonias con características de semiconfluencia, en el que la monocapa celular presenta su aspecto clásico de “empedrado” (cobblestone). Fig 1

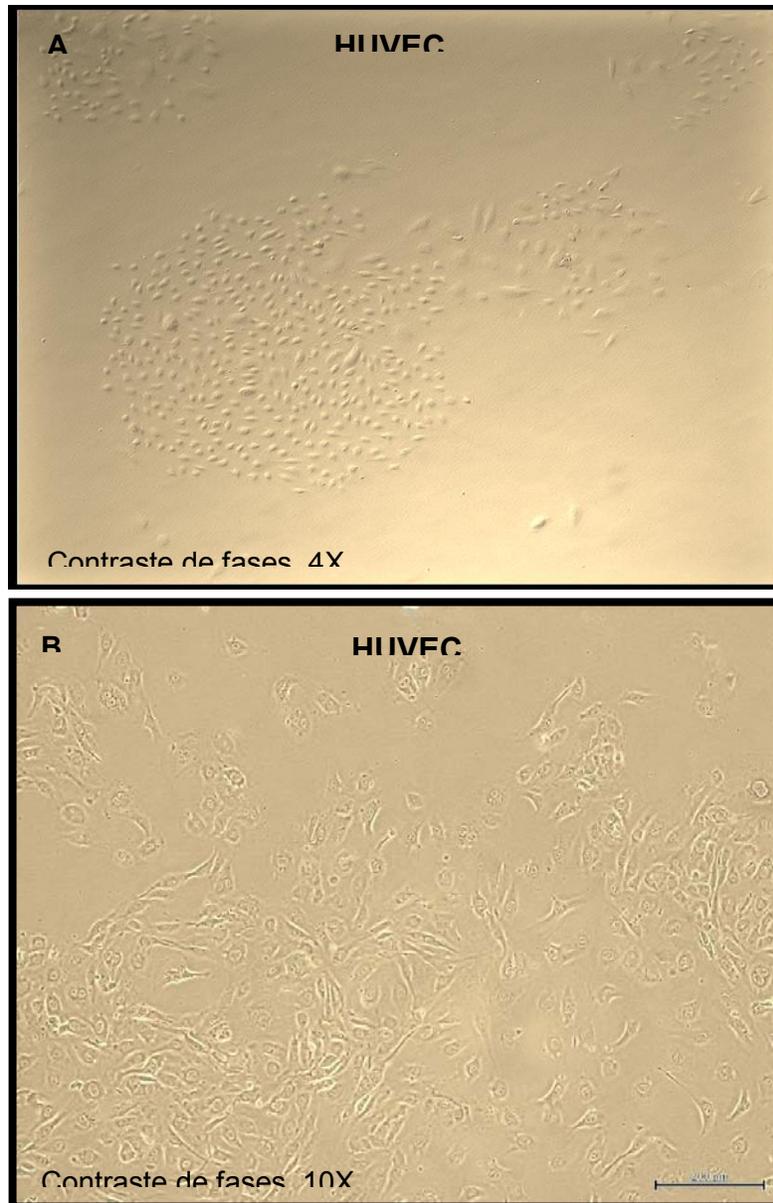


Fig. 1. Cultivo de células HUVEC. Las células HUVEC obtenidas de la vena del cordón umbilical humano fueron sembradas, expandidas y usadas como control en el pasaje 3, en donde se

observan células grandes y pequeñas. **A)** Colonia de CE formado por células pequeñas y **B)** Región tomada de una colonia formada por células grandes.

En las células Mononucleares de Médula ósea adherentes en el día cero se observan muchas células esféricas, pero conforme se realizan los cambios de medio forman colonias de poca densidad celular con anclajes individuales progresivamente más firmes, adquiriendo su morfología poligonal habitual para el día 14, en el día 21 se siguen observando conglomerados celulares, con células que crecen íntimamente unidas por uniones intercelulares, hasta llegar al estado de semiconfluencia, en el que la monocapa celular, con su aspecto clásico de “empedrado” (cobblestone) en el día 28, (Fig 2).

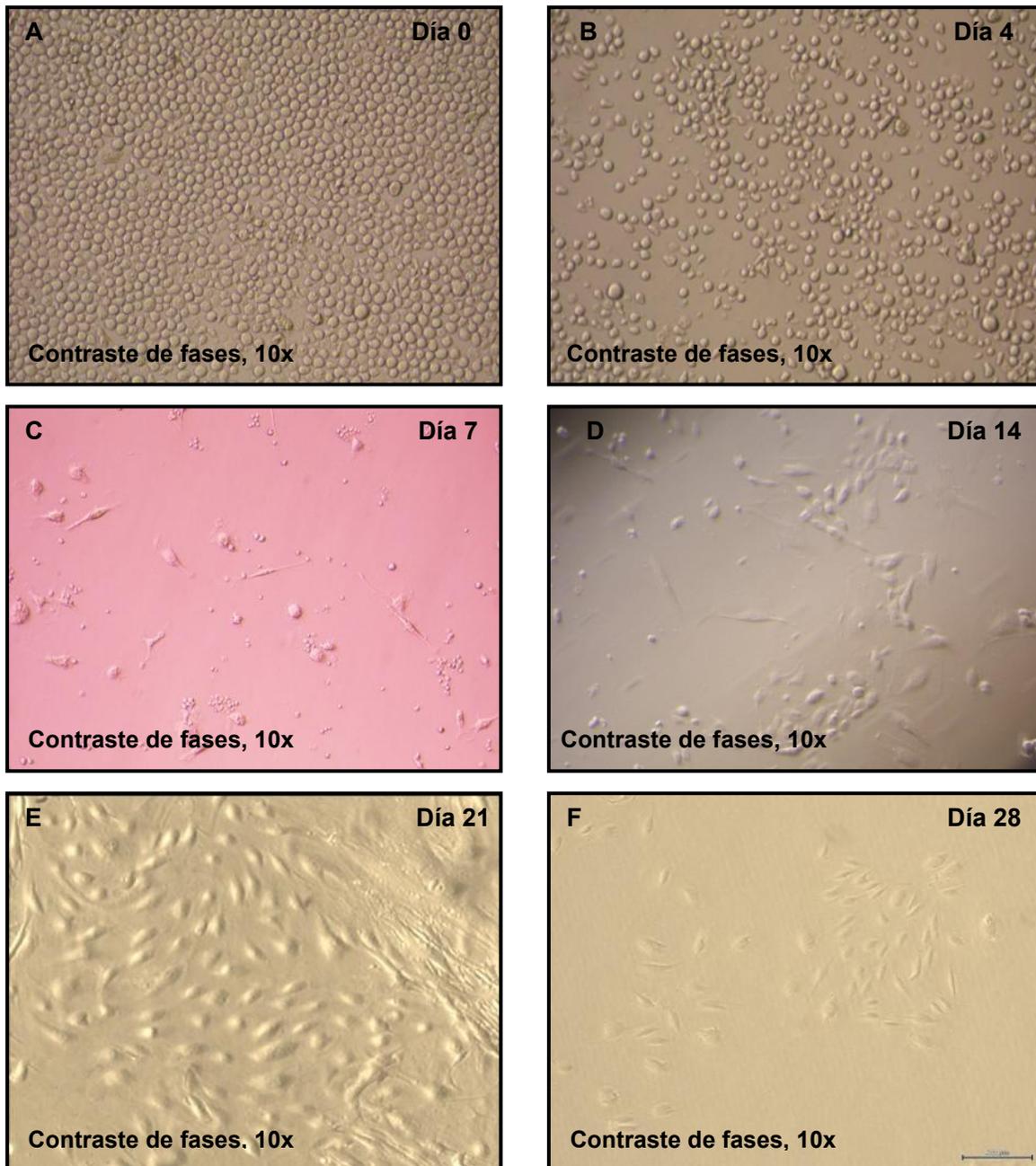


Fig. 2. Cultivos de CMN de MO adherentes. A) CMN sembradas desde el inicio del cultivo, conocido como día cero; B) 4 días de cultivo; C) 7 días de cultivo; D) 14 días de cultivo, se pueden ver grupos de CE tempranas; E) 21 días de cultivo, en donde se detectan grupos de células endoteliales y F) cultivo de colonias de células endoteliales cosechadas en el día 21, sembradas y analizadas a día 28. Las imágenes fueron captadas en microscopio de contraste de fases.

2.- Expresión de antígenos de superficie.

En los histogramas de la citometría de flujo se observa que el marcador de superficie CD 146 específico de endotelio se encuentra con una intensidad de fluorescencia positivo en color azul en el control (HUVEC), en las células mononucleares en el día 0 no se detecta este antígeno pero en el día 28 se encuentra francamente positivo.

En cuanto al CD 45, antígeno de superficie de células hematopoyéticas en el control se observa una intensidad de fluorescencia que se interpreta como negativo, en las células mononucleares en el día 0 se encuentra positivo pero al medir las células en el día 28 se encuentra negativo.

Respecto al CD 90 marcador de superficie de células mesenquimales en las células control se encuentra negativo, en las células mononucleares se encuentra positivo al día 0, pero negativo en el día 28. (Fig 3)

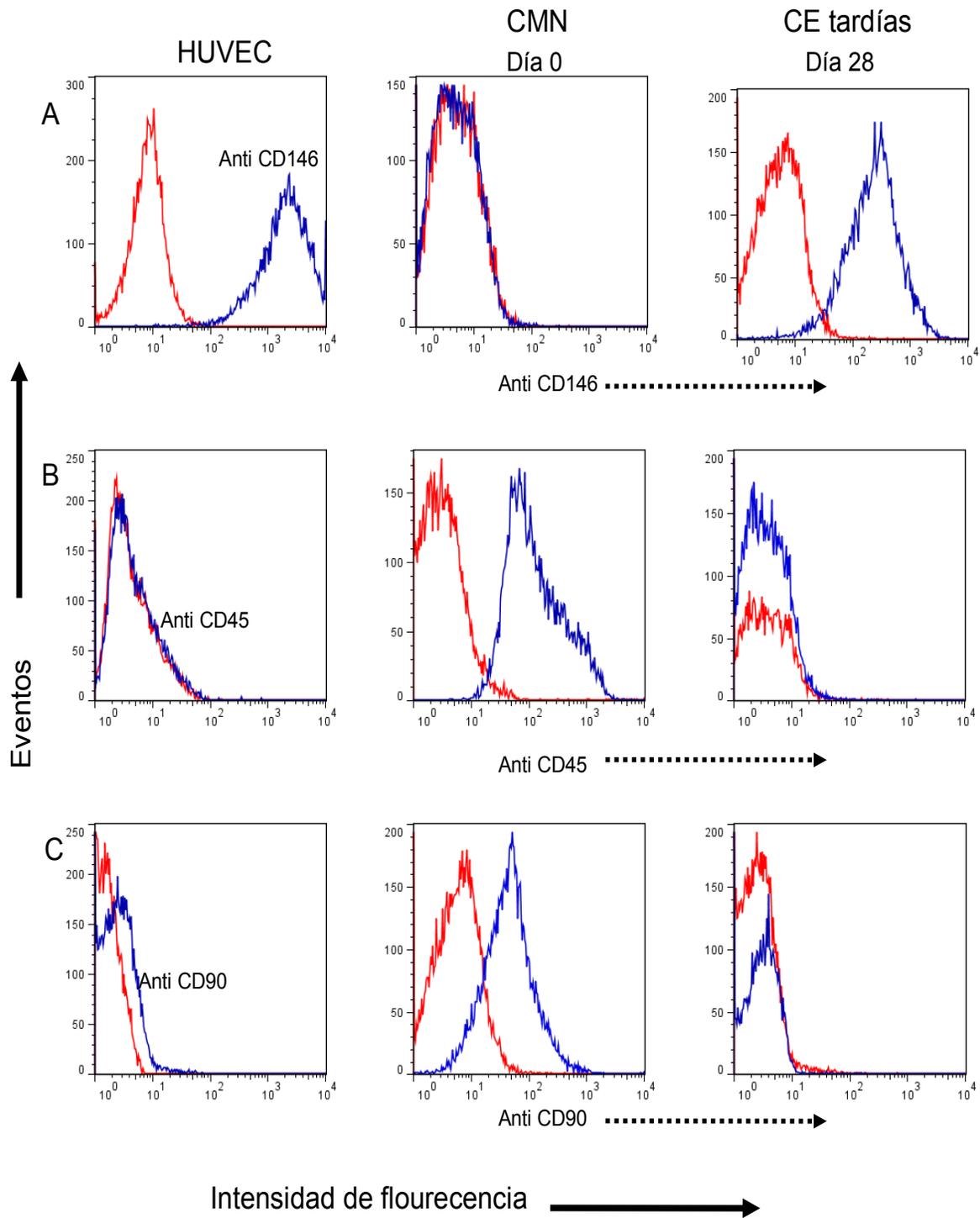


Fig. 3. Expresión de antígenos de superficie de CE, hematopoyéticas y mesenquimales. La presencia de CD146 es negativa en CMN (día cero), pero positiva en el día 28 de las células adherentes. **A)** Las proteínas de células mesenquimales (CD90) y hematopoyéticas (CD45) es positivo en el inicio del cultivo de las CMN (Día cero) y ausente en el día 28 **B)** y **C)** respectivamente. Se usaron a las células HUVEC como control del experimento. La figura muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes.

3.- Formación de estructuras tubulares de células adherentes.

Se pudo observar que a las 24 hrs de ser sembradas las células en gelatina (Geltrex) éstas presentan uniones célula- célula dando apariencia de una red. Presentando prácticamente la misma morfología que las células HUVEC.

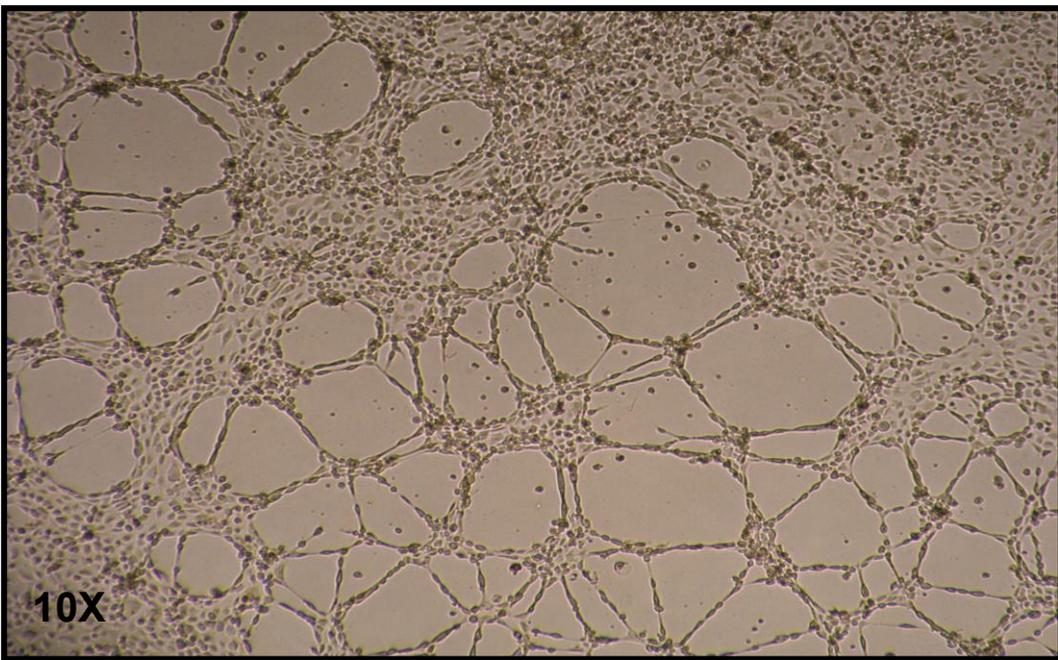
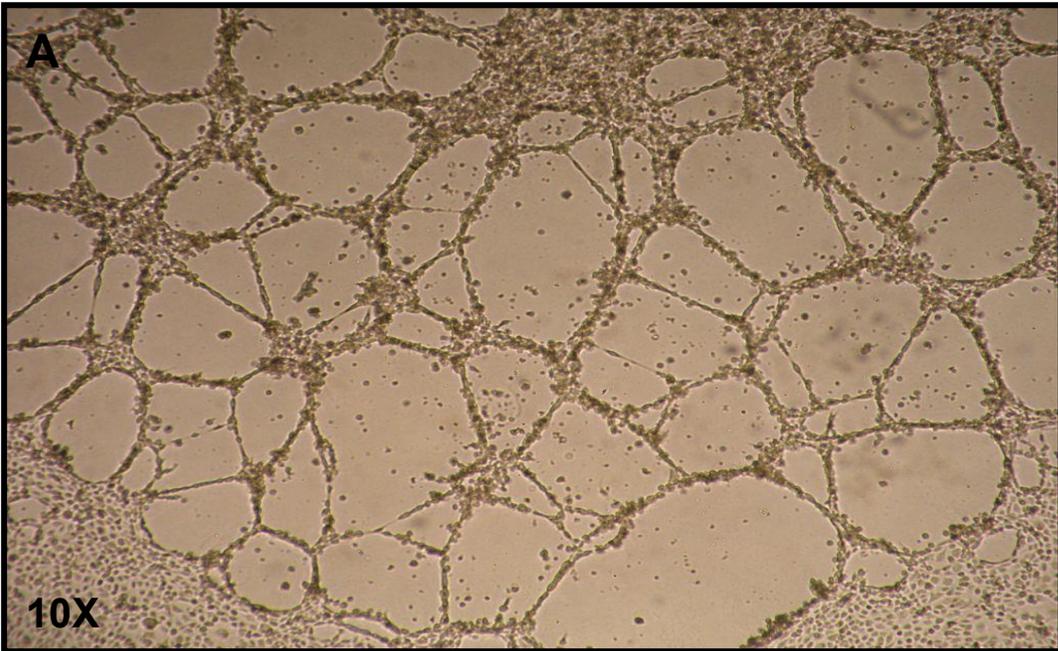


Fig. . Formación de estructuras tubulares de células adherentes. 4×10^4 de CE purificadas, tratadas por una semana con medio 200PRF suplementado por LSGS, fueron sembradas sobre una base de gelatina (Geltrex) y a las 24 se observaron las uniones célula-célula dando la apariencia de una red. **A)** HUVEC **B)** CE adherentes a los 28 días de cultivo.

DISCUSIÓN.

Desde que Asahara et al, describieron CPE a partir de CMN adherentes obtenidas de MO en 1997, diversas técnicas se han descrito de diferentes fuentes de obtención, así como diferentes medios de cultivo.

Las células mononucleares obtenidas de Médula ósea fueron abundantes, con una morfología esférica en el día cero, posteriormente y conforme a los lavados y a la acción de los antibióticos fueron agrupando en conglomerados con forma poligonal que pudimos observar en el día 14, en la siguiente observación en el día 21 se empiezan a ver con mayores uniones intercelulares hasta llegar a un estado de semiconfluencia con aspecto de “empedrado” (cobblestone). Möbius-Winkler, 2009.

Las células control HUVEC fueron observadas en el pasaje 3, presentan la morfología típica de semiconfluencia con aspecto de “empedrado” (cobblestone).

Por lo que podemos sugerir que las células mononucleares obtenidas de médula ósea, eran un pool de diversas estirpes celulares, y conforme se fueron realizando los lavados, es decir retirando células no adherentes, las células ancladas que permanecen en el medio de cultivo tienen características morfológicas concordantes con células endoteliales.

Hasta el momento no se ha descrito el mejor marcador de superficie para caracterizar las CPE, una de las limitaciones es la baja frecuencia de CPE en SP, pues representan 0.01-0.0001% de las CMN (Möbius 2009). Diferentes autores utilizan diferentes combinaciones de marcadores de superficie y funcionales. Las CPE serán definidas con ausencia o negativos para marcadores de inmadurez de células no endoteliales como son CD133, CD34,c-Kit, Sca-1 Ausencia o negativos para marcadores Hematopoyeticos como CD45 y CD14(Leone et al, 2009) .Presentar o adquirir marcadores endoteliales como CD146, CD 144, CD31,

CD105, vWF, VEGFR-2. Capaces de realizar expansión clonal y adherencia. (Caiado 2012, Leone et al 2009, Li 2012)

. En cuanto a la expresión de antígenos de superficie en los histogramas correspondientes de las células control (HUVEC) que sabemos son endoteliales, presentan un patrón CD146+, CD45-, CD90-.

Las células mononucleares adherentes obtenidas de MO, presentan lo siguiente:

El marcador de superficie endotelial CD146 en el día cero no es detectado pero en el día 28 se detecta como positivo. Esto sugiere que la frecuencia de las células endoteliales en la obtención es muy baja, y por este motivo no es detectado, pero al conservar las células adherentes en los medios de cultivo, y retirar por medio de lavados los otros tipos celulares, es posible detectar CD 146 al día 28.

El marcador de superficie específico de células hematopoyéticas es positivo en el día cero y negativo en el día 28. Retomando lo anterior, la frecuencia de las células endoteliales es muy bajo, pero sabemos que la frecuencia de las células progenitoras hematopoyéticas en los nichos hematopoyéticos es muy alta, es por eso que en el día cero este antígeno es detectado, y al carecer las células hematopoyéticas de capacidad adherente, son retiradas en los lavados, es por eso que “desaparece” el CD 45 para el día 28.

Respecto al CD 90 marcador de superficie de células mesenquimales se encuentra positivo al día 0, pero negativo en el día 28, la situación es similar con el marcador CD45, la frecuencia de las células mesenquimales en MO es muy mayor comparado con las células endoteliales, además de no presentar capacidad de adhesión.

Por consiguiente las células endoteliales adherentes en el día cero presentan un patrón: CD146-, CD45+, CD90+, que sugiere un pool de células de linaje hematopoyético y mesenquimal, carentes de linaje endotelial, pero que pudiera deberse a la baja frecuencia de éstas en MO; pero el patrón que presentan éstas células en el día 28 es: CD 146+, CD45-, CD90-, el cual coincide con las células

de control, carentes de marcador mesenquimal y hematopoyético, presentando antígeno de superficie endotelial.

Entonces, las células mononucleares adherentes obtenidas de MO, en el día 28 presentan morfología típica de semiconfluencia con aspecto de “empedrado” (cobblestone), con un inmunofenotipo CD146+, CD45- y CD90-, que coincide con células endoteliales.

Se sabe que las CPE participan en la angiogénesis, es por esto que realizamos la evaluación de esa habilidad in vitro. Una de las pruebas mas específicas para evaluar la capacidad de angiogénesis de CE o sus progenitores es la medición de formación de estructuras tridimensionales (Formación de estructuras tubulares). Möbius-Winkler, 2009.

Además de presentar la capacidad de formar estructuras tubulares 24 hrs después de ser sembradas en una gelatina.

CONCLUSIONES

Las células mononucleares obtenidas de Médula ósea son de linaje mesenquimal, hematopoyético y en baja frecuencia endotelial.

Las células endoteliales en el día 28 de cultivo presentan morfología típica de semiconfluencia con aspecto de empedrado.

Las células endoteliales presentan antígeno de superficie positivo para CD146 y negativo para CD45 y CD90.

Las células endoteliales tienen la capacidad de formar estructuras tubulares al ser sembradas en una gelatina previamente preparada.

BIBLIOGRAFÍA

A

Aamer Sandoo, Jet J.C.S. Veldhuijzen van Zanten, George S. Metsios, Douglas Carroll and George D. Kitas, The endothelium and its role in regulating vascular tone, *The open Cardiovascular Medicine Journal*, 2010 (4):302-312,

Alfred P. Fishman, Endothelium: A distributed organ of diverse capabilities, *Annals New York Academy of sciences*, 1982, (82): 401

Ashara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis, *Science* 275, 964 (1997)

B

Bachetti T, Morbidelli L. Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol Res*, 2000; (42); 1: 9-19

Basile David P. and Yoder Mervin C., Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells, *J Cell Physiol*. 2014 January ; 229(1): 10–16

Boulais Philip E. And Frenette Paul S., Making sense of hematopoietic stem cell niches, *BLOOD*, 2015, 125(17): 2621-2629

Burbrige MF, Coge F, Galizzi J, Boutin J, West D, Tucker G. The role of the matrix metalloproteinases during in vitro vessel formation. *Angiogenesis* 2002; (5):215-226

C

Caiado Francisco and Dias Sérgio, Endothelial progenitor cells and integrins: adhesive needs, *Fibrogenesis & Tissue Repair* 2012, 5:4, 1-13

Chiu Y, Kusano K, Thomas T, Fujiwara K. Endothelial cell-cell adhesion and mechanosignal transduction endothelium, 2004, 11:69-73

Critser Paul J. and Yoder Mervin C., Endothelial Colony Forming Cell role in neoangiogenesis and tissue repair, *Curr Opin Organ Transplant*, 2010; 15(1): 68-72

Critser P. J., S. L. Voytik-Harbin, and M. C. Yoder, Isolating and defining cells to engineer human blood vessels, *Cell Prolif* . 2011 April ; 44(Suppl 1): 15–21

D

Dimmeler S, Hermann C, Galle J, Sella A. Upregulation of superoxide dismutase and nitric oxide synthase mediates the apoptosis-suppressive effects of shear stress on endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; (19): 656-664

Drela Ewelina , Katarzyna Stankowska, Arleta Kulwas, Danuta Rość, Endothelial Progenitor Cells in Diabetic Foot Syndrome , *Adv Clin Exp Med* 2012, 21, 2, 249–254

E

Esmon Ch. Crosstalk between inflammation and thrombosis. *Maturitas* 2004, 47: 305-314

F

Finney M, Greco N, Haynesworth S., Martin J., Hedrick D., Swan J., Winter D., Kadereit S., Joseph M., Fu P., Pompili V., Laughlin M., Direct comparison of umbilical cord blood versus Bone Marrow-Derived Endothelial Precursor Cells in mediating neovascularization in response to vascular ischemia, *Biology of blood and Marrow transplantation*, 2006, (12): 585-595

G

Goligorsky Michel S., Salven Petri, Concise Review: Endothelial Stem and Progenitor

H

Howell GJ, Herbert SP, Smith JM, Mitar S, Ewan LC, Mohammed M, Hunter AR, Simpson N, Turner AJ, Zachary I, Walker JH, Ponnambalam S. Endothelial cell confluence

I

Ivanovska I, Shin J., Swift J, Discher D., Stem cell mechanobiology: diverse lessons from bone marrow Review, trends in cell biology, 2015 (30): 1-9

J

Jain Rakesh, Molecular regulation of vessel maturation, Nature Medicine 91 (6): 685-693

Jeremias A, Dussa C, Forudib F, Jacobsenc D, Vinned G, Nissenb S, Tuzcub EM. N-acetyl-cysteine in the prevention of vascular restenosis after percutaneous ballon angioplasty. International Journal of Cardiology 2004, (95) 255-260

K

Kleinman H, Philp D and Hoffman M. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. Current Opinion in Biotechnology 2003, 14;526-532

L

Leone Antonio Maria, Marco Valgimigli, Maria Benedetta Giannico, Vincenzo Zaccone, Matteo Perfetti, Domenico D'Amario, Antonio Giuseppe Rebuzzi, and Filippo Crea, From bone marrow to the arterial wall: the ongoing tale of endothelial progenitor cells, European Heart Journal (2009) 30, 890–899

Li Da-Wei, Zhi-Qiang Liu, Jun Mei, Ying Liu and Lin-Sen Hu, Contribution of endothelial progenitor cells to neovascularization (Review), International Journal of molecular medicine, 2012 (30): 1000-1006

M

Makhoul R, Fields Ch, Cassano A. Nitric oxide and the vascular surgeon. *J Vasc Surg* 1999, 30:569-572

Mallat Z, Tedgui A. Apoptosis in the vasculature: mechanisms and functional importance. *British J Pharm* 2000; (130): 947-962

Masuda Haruchika and Asahara, Clonogenic assay of endothelial progenitor cells, *Trends in cardiovascular medicine* 23, 2013 : 99-103

Masuda Haruchika, Cantas Alev, Hiroshi Akimaru, Rie Ito, Tomoko Shizuno, Michiru Kobori, Miki Horii, Toshiya Ishihara, Kazuya Isobe, Mitsuhiro Isozaki, Johbu Itoh, Yoshiko Itoh, Yoshinori Okada, Brendan A.S. McIntyre, Shunichi Kato, Takayuki Asahara, Methodological Development of a Clonogenic Assay to Determine Endothelial Progenitor Cell Potential, *Circ Res.* 2011;109:20-37

Mayani Héctor, Eugenia Flores-Figueroa, Rosana Pelayo, Juan José Montesinos, Patricia Flores-Guzmán y Antonieta Chávez-González, Hematopoyesis, *Cancerología* 2 (2007): 95-107

Mead Laura E, Daniel Prater, Mervin C. Yoder, and David A. Ingram, Isolation and Characterization of Endothelial Progenitor Cells from Human Blood, *Curr. Protoc. Stem Cell Biol*, 2008

Michiels C. Endothelial cell functions. *J Cel Physiol* 2003; (196):430-443

Möbius-Winkler Sven, Robert Höllriegel, Gerhard Schuler, Volker Adams, Endothelial Progenitor Cells: Implications for Cardiovascular Disease, *Cytometry Part A* 2009, (75): 25-37

Mohammad A. Al-Drees, Jia Hao Yeo, Badwi B. Boumelhem, Veronica I. Antas, Kurt W. L. Brigden, Chanukya K. Colonne, and Stuart T. Fraser, Making Blood: The Haematopoietic Niche throughout Ontogeny, *Stem Cells International* Volume 2015,

Moncada S. and Higgs E., The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology, *British Journal of Pharmacology* (2006) 147, S193–S201

Morrison Sean J. and David T. Scadden, The bone marrow niche for haematopoietic stem cells, *NATURE*, Vol 505, 16 January 2014.

Q

Qi-Ru Wang, Qi Yan, Soluble factors from bone marrow endothelial cells regulate differentiation and proliferation of hematopoietic and endothelial lineages and embryonic stem cells, *Acta Physiologica Sinica*, 2013, 65(4): 433–444

R

Rafii Shahin, Fred Shapiro, Julio Rinnarachin, Ralph L. Nachrnan, Barbara Ferris, Babette Weksler, Malcolm A.S. Moore, and Adam S. Asch, Isolation and Characterization of Human Bone Marrow Microvascular Endothelial Cells: Hematopoietic Progenitor Cell Adhesion, *Blood*, VOI 84, NO 1 (July I), 1994: 10-19

Rodriguez-Morata A, Ros-Die E. Implicaciones fisiopatológicas de la angiogénesis en la patología vascular. *Angiología* 2003; 55:352-60

S

Shin H, Bizios R, Gerritsen ME. Cyclic pressure modulates endothelial barrier function. *Endothelium*, 2003, 10:179-187

Sölder Elisabeth, Böckle B., Nguyen V, Fürhapter C, Obexer P., Erdel M., Stössel H., Romani N., Sepp N., Isolation and characterization of CD133+ CD34+ VEGFR-2+ CD45- fetal endothelial cells from human term placenta, *Microvascular Research* 84 (2012) 65–73

Sumpio B, Riley JT, Dardik A. Cell in focus: endothelial cell. *Intern J Bioch and Cell Biol* 2002; (34): 1508-1512

U

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

W

Waschke J, Curry FE, Adamson RH, Drenckhahn D. Regulation of actin dynamics is critical for endothelial barrier functions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005, 288: H1296-H1305

Wei Qi Huang and Qi Ru Wang, Bone marrow endothelial cells secrete thymosin β 4 and AcSDKP, *Experimental Hematology* 29 (2001): 12-18

Y

Yin Tong and Linheng Li, The stem cell niches in bone Review, *The Journal of Clinical Investigation* 2006 (116): 1195-1201

Yoon M, Moir RD, Prahlad V, Goldman RD. Motile properties of vimentin intermediate filament networks in living cells. *J Cell Biol* 1998; 143: 147-157

Yoder Mervin C., Human endothelial progenitor cells, *Cold spring harb perspect med*, 2012(2):a006692

Yoder Mervin C., Laura E. Mead, Daniel Prater, Theresa R. Krier, Karim N. Mroueh, Fang Li, Rachel Krasich, Constance J. Temm, Josef T. Prchal, David A. Ingram, Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals, *BLOOD*, 2007, 109(5): 1801-1809

Z

Zampetaki Anna, Paul Kirton John, Xu Qingbo, Vascular repair, *Cardiovascular Research* (2008) 78, 413–421

