



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
SERVICIO DE PATOLOGÍA CLÍNICA  
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD CARDIOLOGÍA  
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI  
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN TROMBOSIS,  
HEMOSTASIA Y ATEROGÉNESIS  
HOSPITAL REGIONAL 1 "CARLOS MC GREGOR  
SÁNCHEZ NAVARRO"

**"Identificación de células endoteliales  
provenientes de aspirados de médula ósea  
normal"**

TESIS  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
ESPECIALISTA EN PATOLOGÍA CLÍNICA

PRESENTA:  
SÁNCHEZ JIMÉNEZ ROBERTO FRANCISCO

DIRECTOR DE TESIS:  
JOSÉ ANTONIO ALVARADO MORENO

MÉXICO, D.F. JULIO 2015





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## HOJA DE FIRMAS

---

Dr. Gilberto Pérez Rodríguez

Director General

U.M.A.E Hospital de Cardiología, CMN Siglo XXI, IMSS

---

Dra. Gabriela Borrayo Sánchez

Director Médico

U.M.A.E Hospital de Cardiología, CMN Siglo XXI, IMSS

---

Dr. Jesús Salvador Valencia Sánchez

Director de Educación e Investigación en Salud

U.M.A.E Hospital de Cardiología, CMN Siglo XXI, IMSS

---

Dr. Alberto de Jesús Treviño Mejía

Profesor Titular del Curso de Posgrado de la Especialidad de Patología Clínica

U.M.A.E Hospital de Cardiología, CMN Siglo XXI, IMSS

---

Dr. José Antonio Alvarado Moreno

Director de Tesis

Investigador de la Unidad de Investigación Médica de Trombosis, Hemostasia y Aterogénesis, Hospital Regional 1 “Carlos Mac Gregor Sánchez Navarro”

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 Mac Gregor Sánchez Navarro del IMSS bajo la dirección del Dr. Jose Antonio Alvarado Moreno y con número de registro R-2008-3609-17.

## **AGRADECIMIENTOS PERSONALES**

A mis padres, por su apoyo incondicional para seguir realizando mis estudios.

A mi hermana, por estar siempre a mi lado y motivarme a seguir adelante.

A mi esposa Dulce Carolina Serrano por confiar en mí.

A M. C. José Rubicel Hernández por apoyar y contribuir estrechamente con el trabajo realizado.

A mi tutor, por compartir sus conocimientos y por haberme despertado el interés por la investigación.

## CONTENIDO

	Página
Índice general.....	VI
Abreviaturas.....	VII
Índice de figuras.....	VIII
Resumen.....	IX
Abstract.....	X
Introducción.....	1
Marco teórico.....	1
Planteamiento del problema.....	11
Justificación.....	11
Material y Métodos.....	12
Resultados.....	16
Discusión.....	23
Conclusiones.....	26
Bibliografía.....	27

## ÍNDICE GENERAL

1. Introducción.....	1
2. Marco Teórico.....	1
2.1 Medula Ósea.....	1
2.2 Hematopoyesis.....	3
2.3 Regulación de la Hematopoyesis.....	3
2.4 Nicho Hematopoyético.....	4
2.5 Nicho Osteoblástico.....	5
2.6 Nicho Vascular.....	5
2.7 Endotelio.....	6
2.8 Funciones del Endotelio.....	7
2.9 Células Progenitoras Endoteliales.....	8
3. Planteamiento del problema.....	11
4. Justificación.....	11
5. Hipótesis.....	12
6. Objetivos.....	12
6.1 Objetivo general.....	12
6.2 Objetivos específicos.....	12
7. Material y métodos.....	12
7.1 Muestras Congeladas.....	12
7.2 Cultivo de Células Endoteliales.....	13
7.3 Morfología Celular.....	14
7.4 Inmunofenotipo de Células Endoteliales.....	14
7.5 Ensayo de Estructuras Tubulares.....	14
8. Resultados.....	16
9. Discusión.....	23
10. Conclusiones.....	26
11. Bibliografía.....	27

## **ABREVIATURAS**

AGM. Aorta-Gonadal-Mesonefros.

CE. Célula endotelial.

CFCE. Células formadoras de colonias endoteliales.

CPE. Célula progenitora endotelial.

CXCL- 12. Quimiocina número 12, también denominado factor derivado de células estromales 1.

ET-1. Endotelina-1.

GLUT. Transportador de glucosa.

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

MO. Medula ósea.

NO. Oxido nítrico.

PGI<sub>2</sub>. Prostaciclina I<sub>2</sub>.

SLAM. (Del inglés signaling lymphocytes activation molecule). Proteínas de superficie implicadas en las vías de señalización de la respuesta inmune.

TXA<sub>2</sub>. Tromboxano A<sub>2</sub>.

## ÍNDICE DE FIGURAS

## Página

Figura 1..... 17

Figura 2..... 19

Figura 3..... 21

Figura 4..... 22

## RESUMEN

El endotelio actualmente es considerado como un órgano activo que tiene diversas funciones, tales como: regular el tono vascular, permeabilidad capilar, inflamación, reparación de tejidos, angiogenesis, vasculogenesis, coagulación y trombolisis. Existen diversas técnicas para el aislamiento y caracterización de CE, estas pueden provenir de sangre periférica, cordón umbilical, placenta y medula ósea. Sin embargo, su obtención es muy compleja debido a su baja frecuencia. En lo que respecta a la MO, poco se conoce acerca de la identificación endotelial, por lo que en este estudio se abordaron aspectos relacionados a la selección e identificación de células endoteliales a partir de poblaciones de células mononucleares provenientes de MO de individuos sanos.

Con la técnica de aislamiento y caracterización utilizada se puede determinar que existe CE con un perfil de expresión CD146+ / CD 45- / CD 90-, sin contaminación de otro tipo celular, que a su vez se correlaciona con la estructura morfológica típica de empedrado de estas células, así como también la capacidad de formar estructuras tubulares comparadas con un control (células HUVEC).

Palabras clave: Medula ósea, endotelio, célula endotelial, célula progenitora endotelial.

## **ABSTRACT**

Endothelium is currently regarded as an active organ that has several functions, such as; regulating vascular tone, capillary permeability, inflammation, tissue repair, angiogenesis, vasculogenesis, coagulation and thrombolysis. There are many techniques with respect to isolation and characterization of endothelial cells derived of peripheral blood, umbilical cord, placenta and bone marrow. Nevertheless, the harvest is very complex due to its low frequency. As regards to bone marrow, little is known about endothelial identification, therefore in this study, we addressed related aspects with selection and identification of endothelial cells as from mononuclear cells population from bone marrow of healthy individuals.

With isolation and characterization technique used, could be determined, that exist endothelial cells with a expression profile CD146+ / CD 45- / CD 90-, without contamination of another cell type which correlates with the typical cobblestone structure of these cells, as well as the ability to form tubular structures compared to a control (HUVEC cells).

Keywords: bone marrow, endothelium, endothelial cells, endothelial progenitor cell.

## **1. INTRODUCCIÓN**

El endotelio durante mucho tiempo fue considerado como una membrana inerte que enlazaba al sistema circulatorio, pero actualmente es considerado como un órgano activo, heterogéneo y con funciones inmunológicas, metabólicas y secretoras. Las células endoteliales están expuestas a fuerzas físicas (estrés mecánico hemodinámico), bioquímicas (liberación de moléculas específicas en su entorno) o traumáticos, por lo que su renovación y proliferación para mantener la homeostasis del vaso es de suma importancia.

Las células que tienen la capacidad de responder a la perturbación del endotelio son las células progenitoras endoteliales. La mayoría de éstas células se encuentran en médula ósea, pero también se encuentran en circulación y tienen características que responden a daño o lesión endotelial.

La regulación y el reservorio de células progenitoras endoteliales se lleva a cabo en médula ósea, para entender la complejidad de estas células primero hay que identificar su microambiente en este tejido.

## **2. MARCO TEÓRICO**

### **2.1 MEDULA ÓSEA**

La médula ósea es un tejido conjuntivo muy vascularizado y gelatinoso que contiene numerosas células, ocupa las cavidades medulares de los huesos grandes y los espacios intratrabeculares de los huesos esponjosos y conforma un entorno propicio para la hematopoyesis, la formación de células sanguíneas y plaquetas (1).

En lactantes y sujetos jóvenes, la médula ósea es activa en su totalidad y recibe el nombre de médula roja, ya que la mayoría de las células que se desarrollan en ella son eritrocitos. Hacia los 20 años de edad, gran parte de la médula presente

en las diáfisis de los huesos largos acumula lípidos en cantidades tan grandes que disminuye la actividad hematopoyética y se conoce como médula amarilla (1).

La irrigación medular proviene de:

- Arterias que ingresan en la cavidad medular a través de canales de nutrientes.
- Un sistema de sinusoides grandes que desembocan en la vena longitudinal central, la cual drena en un gran número de venas que abandonan la cavidad medular a través de los canales de nutrientes.

A diferencia de la mayoría de las venas, las venas medulares presentan un calibre menor que sus homólogas arteriales y la presión hidrostática medular basta para mantener la permeabilidad de los sinusoides (2).

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 (1,2).

Los sinusoides se rodean de una lámina basal, una delgada capa de fibras reticulares, células reticulares adventicias que están en contacto con dicha lámina y recubren la mayoría de las superficies de los sinusoides. Las extensiones citoplásmicas de estas últimas se alejan de los sinusoides y establecen contactos con las proyecciones citoplásmicas de otras células reticulares adventicias, de tal modo que definen unos espacios en los que se alojan los nichos hematopoyéticos (3).

Estos agregados de células hematopoyéticas están presentes en varias etapas de su desarrollo, aunque suelen estar formados por un linaje celular determinado. Junto a las distintas células en maduración, existen macrófagos que destruyen los núcleos expulsados, fagocitan restos citoplásmicos y proporcionan hierro a las células de la serie eritrocítica. Las células reticulares adventicias controlan el volumen de médula ósea disponible para la hematopoyesis; conforme se acumula líquido en la médula ósea, su tamaño aumenta y reduce el volumen del compartimento hematopoyético (1,4).

## **2.2 HEMATOPOYESIS**

La hematopoyesis es el mecanismo fisiológico donde se generan todos los linajes celulares de la sangre periférica, 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 (5).

Las HSC residen en la medula ósea que es el principal órgano donde se lleva a cabo la hematopoyesis en el adulto, sin embargo durante el desarrollo embrionario y fetal, las HSC se localizan en múltiples órganos. En estadios tempranos del desarrollo embrionario, los precursores hematopoyéticos se encuentran en el saco vitelino y en la región aorta-gonadal-mesonefros (AGM). En estadios posteriores del desarrollo embrionario la hematopoyesis tiene lugar en el hígado fetal, donde las HSC se expanden y diferencian para colonizar el timo y el bazo. Cerca del final de la gestación las HSC migran a la medula ósea y es en este tejido donde se lleva a cabo la hematopoyesis durante toda la vida (5,6).

## **2.3 REGULACIÓN DE LA HEMATOPOYESIS**

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” (7).

La interacción entre el microambiente y la celularidad hematopoyética es compleja y no ha sido entendida completamente. El microambiente 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. Los nichos hematopoyéticos son muy importantes en la regulación de la hematopoyesis, se describen a continuación (7,8).

## **2.4 NICHO HEMATOPOYÉTICO**

El mantenimiento de células troncales hematopoyéticas y la regulación de su autorenovación y diferenciación *in vivo* dependen de su microambiente específico, el cual es llamado nicho hematopoyético (9).

Nicho hematopoyético puede ser definido como un espacio físico en el cual las células troncales hematopoyéticas son alojadas y preservadas para mantener su autorenovación y diferenciación. El término nicho fue acuñado por Schofield, quien propuso que el contacto célula - célula en dicho espacio era el responsable de la capacidad proliferativa ilimitada y la inhibición de la maduración de células troncales hematopoyéticas (3, 9,10).

Considerando que las células troncales hematopoyéticas quiescentes logran servir como una fuente de reserva de células que pueden reactivarse en respuesta al estrés, estas podrían ser almacenadas en un nicho de almacén quiescente. Por otro parte, si las células son expuestas a un agente mieloablativo, se liberan a la circulación (movilización) y entran a ciclo celular para restablecer la hematopoyesis y migrar a los nichos vasculares como el bazo y el hígado. Posteriormente de realizar su función proliferativa, regresan a los nichos de la medula ósea y nuevamente entran a quiescencia (11).

El microambiente de la medula ósea es un nicho complejo compuesto de múltiples tipos de células incluyendo al endostio (nicho de osteoblastos), células reticulares (nicho perivascular), y el nicho vascular de medula ósea (7, 8).

## **2.5 NICHO OSTEABLÁSTICO**

Las células que forman el nicho osteoblástico son células que participan en la formación del hueso como los osteoblastos y osteoclastos.

Los primeros estudios indican que las células hematopoyéticas indiferenciadas se localizan en el endostio cerca de la superficie ósea, y que estas células son movilizadas hacia la zona central de la medula ósea (12, 13).

Los osteoblastos producen factores que tienen la capacidad de regular la quiescencia y el mantenimiento de las células troncales hematopoyéticas tales como: angiopoietina- 1 (14), la osteopontina (15) o la CXCL- 12 (16).

Estos estudios sugieren que la localización de células troncales hematopoyéticas cerca del endostio es de gran importancia para el mantenimiento, regulación y proliferación de estas células.

## **2.6 NICHO VASCULAR**

Los datos recientes han sugerido que las células endoteliales no solo funcionan para el suministro de oxígeno, nutrientes, o eliminación de residuos, tras la activación correcta puede ser considerado un nicho vascular especializado que apoya el mantenimiento de células troncales hematopoyéticas por la secreción de factores paracrinós (17).

Se ha observado que las células troncales hematopoyéticas también residen a una cierta distancia del endostio por lo que el nicho vascular de la medula ósea es otra alternativa de nicho para estas células. Análisis histoquímico de secciones de medula ósea utilizando marcadores de la familia SLAM muestra que un 60% de las células troncales hematopoyéticas de la familia SLAM estaban localizadas alrededor de células endoteliales sinusoidales (18, 19). Esto sugiere la existencia de un nicho vascular.

El nicho vascular está formado por una compleja combinación de tipos celulares diferentes. Uno de los tipos celulares que lo constituyen son las células reticulares

localizadas cerca de los sinusoides, que derivan de células mesenquimales, y funcionan como bloques activos en la formación del nicho vascular (20, 21). Estas células expresan elevados niveles de CXCL- 12 y que interaccionan con casi el 90% de las células troncales hematopoyéticas (22).

Otro tipo celular son las células endoteliales con capacidad de mantenimiento de las células troncales hematopoyéticas y funciones de regeneración hematopoyética (23). Las células endoteliales sinusoidales de la medula 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 (24).

Como se describió anteriormente, las células endoteliales del nicho vascular de la medula ósea juegan un papel importante para la regulación de la hemotopoyesis, sin embargo, estudios recientes indican que estas células también son importantes en la vasculogénesis y angiogénesis, esto es debido a la presencia de células progenitoras hematopoyéticas. El reservorio y mantenimiento de estas células es importante para mantener el funcionamiento adecuado del endotelio. A continuación se describe el funcionamiento del endotelio y la importancia de las CPE para mantener la homeostasis del sistema circulatorio.

## **2.7 ENDOTELIO**

El endotelio es una monocapa de células que recubren la pared luminal de los vasos sanguíneos, anteriormente fue considerado como una membrana inerte que solo formaba parte de la estructura vascular, pero actualmente es considerado como un órgano activo que regula la interacción de las células y las proteínas circulantes con las células residentes en la pared vascular, ejerciendo un papel central como sensor y transmisor de señales, además tiene funciones inmunológicas, metabólicas, secretoras y sintéticas (25).

Es un órgano que representa el 5% de la masa total del individuo, participa activamente en las funciones vitales del sistema cardiovascular, incluyendo la

regulación de la perfusión, el intercambio de líquidos y solutos, hemostasia y coagulación, respuesta inflamatoria, vasculogénesis y angiogénesis (26).

Los vasos sanguíneos proporcionan el principal vínculo entre el corazón y los tejidos. La pared vascular se compone de tres capas; la íntima (capa interna), la túnica media (capa media) y la túnica externa (capa externa). La capa interna está compuesta de endotelio que tapiza la luz del vaso, sostenido por una membrana basal y por debajo de esta se encuentra tejido conectivo subendotelial (26, 27).

Las células endoteliales crean una superficie lisa, exenta de fricciones y secretan numerosas moléculas que le ayudan a llevar a cabo sus funciones, como: laminina, endotelina, colágeno tipo II, IV, V, óxido nítrico y factor de von Willebrand. En su cara luminal, las membranas de las células endoteliales presentan la enzima convertidora de angiotensina que convierte la angiotensina I a angiotensina II. También secreta enzimas que inactivan a una amplia gama de sustancias tales como: bradicininas, trombina, prostaglandinas y serotonina (28, 29).

La estructura de la célula endotelial y la integridad funcional son importantes en el mantenimiento de la pared del vaso y la función circulatoria. Como una barrera, el endotelio es semi permeable y regula la transferencia de moléculas pequeñas y grandes. Ejercen acciones significativas autocrinas, paracrinas y endocrinas e influyen en las células del músculo liso, plaquetas y leucocitos periféricos. (27, 28, 30).

## **2.8 FUNCIONES DEL ENDOTELIO**

Funciones de transporte.

El endotelio es una barrera importante para el paso de moléculas entre la sangre, el intersticio y células subyacentes. La célula endotelial posee mecanismos de transporte específicos que permite que las macromoléculas pase a través de ella para satisfacer las necesidades metabólicas de las células de los tejidos subyacentes. Además, las uniones entre las células endoteliales (uniones

estrechas) actúan como una barrera selectiva a la salida de las moléculas a la circulación (28, 30).

La glucosa es la principal macromolécula que se transporta y se utiliza en el endotelio, para esto, se utilizan los transportadores de glucosa (GLUT), de los cuales el GLUT-1 y GLUT-4 se expresan en células endoteliales. GLUT-1 es la isoforma más abundante en las células endoteliales y no depende de la acción de insulina (30).

Transporte de aminoácidos. Hay múltiples sistemas de transporte de aminoácidos en las células endoteliales, pero el transportador de aminoácidos catiónicos es quizás el más relevante, ya que esta es la forma en que la L-arginina, el sustrato para la formación de óxido nítrico, se transporta (30).

Regulación del tono vascular.

El endotelio produce una serie de vasodilatadores y vasoconstrictores que regulan el tono vasomotor y el reclutamiento y la actividad de las células inflamatorias (31).

El endotelio libera diversos factores vasoactivos que regulan el tono vasomotor y el reclutamiento y actividad de células inflamatorias. Estos pueden ser factores vasodilatadores como el óxido nítrico (NO) y prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) o factores vasoconstrictores tales como tromboxano (TXA<sub>2</sub>) y endotelina-1 (ET-1) (31).

## **2.9 CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES**

Hasta la década de los 90's se consideraba que la diferenciación de las células mesodermales a angioblastos y la subsecuente diferenciación endotelial ocurrían sólo en el embrión. Sin embargo, desde el primer reporte publicado por el grupo de Asahara en 1997, que describe una población de células provenientes de la médula ósea, detectadas en sangre periférica, las cuales fueron consideradas como células progenitoras endoteliales (CPE) (32) y reconocidas por tener CD34+, CD133+, KDR y VEGFR2+. Diversos grupos de trabajo se han enfocado en estudiarlas, y así se han descrito a las CPEC derivadas de la MO, lo que ha

sugerido la presencia de hemangioblastos circulantes en el adulto (33, 34); aunque tampoco se descarta la existencia de CPE inmaduras cuya presencia deriva del desprendimiento de las células endoteliales de la pared vascular (35).

Se ha descrito que las CPE juegan un papel fundamental en la formación y regeneración del endotelio (32). Cuando existe un estado de isquemia en los tejidos, el factor inducible por hipoxia 1-alfa (HIF 1-alfa) se estabiliza induciendo la transcripción de citocinas pro-angiogénicas como factor derivado del estroma 1 (SDF-1) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), las cuales se unen a su receptor CXCR4 y VEGFR-2 respectivamente en las CPE para su movilización y reclutamiento al tejido isquémico. Allí, junto a las células endoteliales maduras contribuyen a la neo vascularización (32, 36).

Posteriormente se describió la presencia de una subpoblación pequeña en cuanto a su frecuencia en sangre periférica, por lo que ha sido considerada como una población discreta pero rara, de células progenitoras endoteliales, definida como células formadoras de colonias endoteliales (CFCE), cuyos potenciales de proliferación son elevados en sangre de cordón umbilical y limitado en la sangre periférica de sujetos adultos clínicamente sanos (37, 38).

En la siguiente tabla se muestran los marcadores de superficie que define a una CPE (39).

Marcador de superficie	Función	Expresión en otras células
CD 34	Glucoproteína importante para la adhesión celular de HSC en la medula ósea	Hemangioblasto, CPE y célula endotelial vascular.
VEGFR-1 (Flt1)	Tirosin quinasa del receptor para VEGF A y B, importante para el ensamblaje de células endoteliales en los vasos	Célula endotelial vascular y progenitores mielo-monocíticos.
VEGFR-2 (Flk1, KDR)	Tirosin quinasa del receptor para VEGF A, C, D, y E, importante para el desarrollo hematopoyético y de células endoteliales, mediador principal de	Hemangioblastos, CPE, células mielo-monocíticas, célula endotelial vascular y célula endotelial linfática.

	VEGF-A, capacidad de migración mitogénica.	
CD133 (Prominin 1)	Glicoproteína de membrana, función desconocida, sirve como un marcador para células hematopoyéticas y progenitoras endoteliales	Células hematopoyéticas y CPE.
CD45	La proteína tirosin fosfatasa, importante para la activación de linfocitos a través de LCK y Fyn	Células del sistema hematopoyético.
VE-cadherina	Glicoproteína dependiente de calcio, proteínas de unión intercelular necesaria para el desarrollo vascular adecuado	Células endoteliales maduras.
vWF	Glicoproteína secretada importante para la agregación plaquetaria	Célula endotelial, megacariocito y plaquetas.

Tomado y modificado de George L.A, et al.2011.

Para la descripción morfológica de CPE se han utilizado diversas técnicas de cultivo describiéndose dos tipos: CPE “tempranas” que aparecen 4-7 días después del cultivo y que tienen forma de huso y expresan marcador endotelial como factor von Willebrand, 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 (cobblestone) y la expresión de Oxido nítrico sintetasa endotelial (40).

Se han descrito dos poblaciones obtenidas de MO con diferente expresión de antígenos de superficie: tempranas que expresan un patrón VEGFR2+/VE-cadherina+/CD14+/CD45+ y tardías que expresan CD14-/CD34+/VEGFR2+/AC133+, pero ambas tienen la capacidad de inducir revascularización (10).

Las células endoteliales son el elemento necesario para la angiogénesis, para que esto ocurra deben existir estímulos, la mayoría de ellos perjudiciales para el organismo, para que las CPE lleven a cabo su función y mantengan la

homeostasis. Como se describió anteriormente las CPE expresan diferentes antígenos de superficie y morfología, por lo que existen diferentes tipos de estas células. Su origen tampoco no está del todo determinado, aunque existen evidencias que provienen de MO, pero no todos los tipos de CPE provienen de este tejido. La caracterización y aislamiento de CE en MO se torna de gran interés para entender de mejor forma la función y origen de CPE.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Existen diversas técnicas para el aislamiento y caracterización de CPE provenientes de sangre periférica, las cuales son difíciles de obtener por su baja frecuencia. Las técnicas descritas para la obtención de CE son muy complejas y costosas, por lo que facilitar y mejorar esta técnica es de suma importancia. La obtención de CE en MO, considerando que en este tejido hay un mayor número de éstas células, podría facilitar el aislamiento y caracterización de CPE.

### **4. JUSTIFICACIÓN**

La obtención de células endoteliales 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 identificación endotelial, por lo que en este estudio se abordaron aspectos relacionados a la selección e identificación de células endoteliales a partir de poblaciones de células mononucleares provenientes de MO. Este estudio permitirá en un futuro determinar la identificación de CE obtenidas de MO de pacientes con trombosis y detectar posibles alteraciones funcionales descritas como disfunción endotelial, considerada como otro factor de riesgo para predisposición a trombosis.

## **5. HIPÓTESIS**

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 progenitores endoteliales con características fenotípicas y funcionales semejantes a los ya descritos en sangre periférica.

## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 OBJETIVO GENERAL**

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

### **6.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Obtener y sembrar CMN provenientes de médula ósea de sujetos de clínicamente sanos.
- Identificar por citometría de flujo en el día 28 de cultivo, células adherentes con fenotipo específico para células endoteliales: CD146, CD45 y CD90.

## **7. MATERIALES Y METODOS**

### **7.1 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  $-170^{\circ}\text{C}$ , 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 de 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.

## **7.2 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  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera de 5% de  $\text{CO}_2$  y condiciones de humedad (Incubadora Nuaire, 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 (Hycel, México). Cada 3 días el medio de cultivo fue sustituido por medio fresco, hasta que las células llegaron a 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 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.

### **7.3 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.

### **7.4 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 inactiva a la enzima con SFB y se resuspendieron en medio 199 y se contaron. Se colocaron  $1 \times 10^5$  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) y 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).

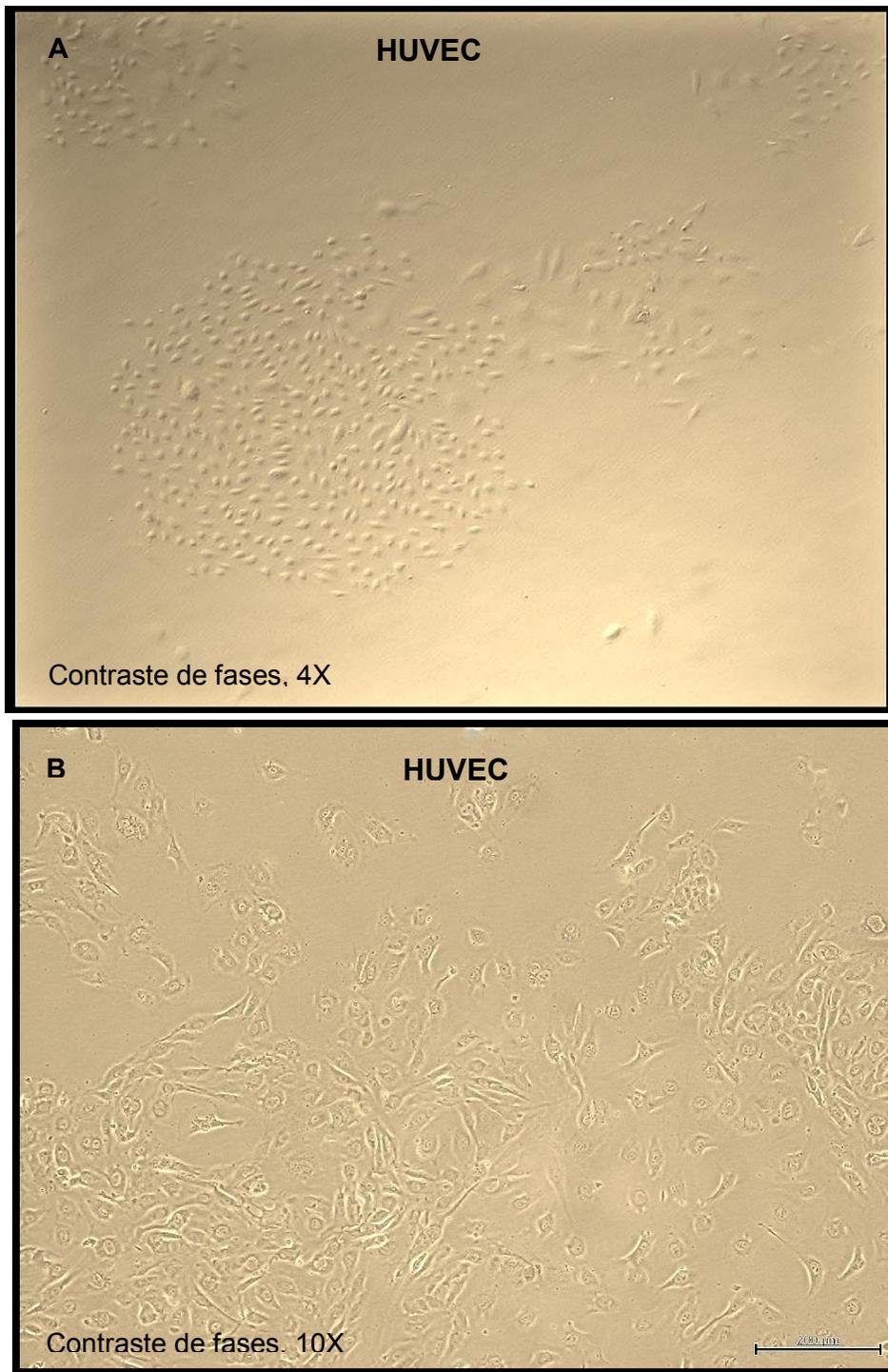
### **7.5 ENSAYO DE ESTRUCTURAS TUBULARES**

Las CE del día 28 ( $2 \times 10^5$  por  $75 \text{ cm}^2$ ) 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  $\mu$ L de Geltrex™ (GIBCO, USA), se cosecharon las células del pozo con Tripsina al 0.05% (Invitrogen, USA). Se sembraron  $3.5-4.5 \times 10^4$  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.

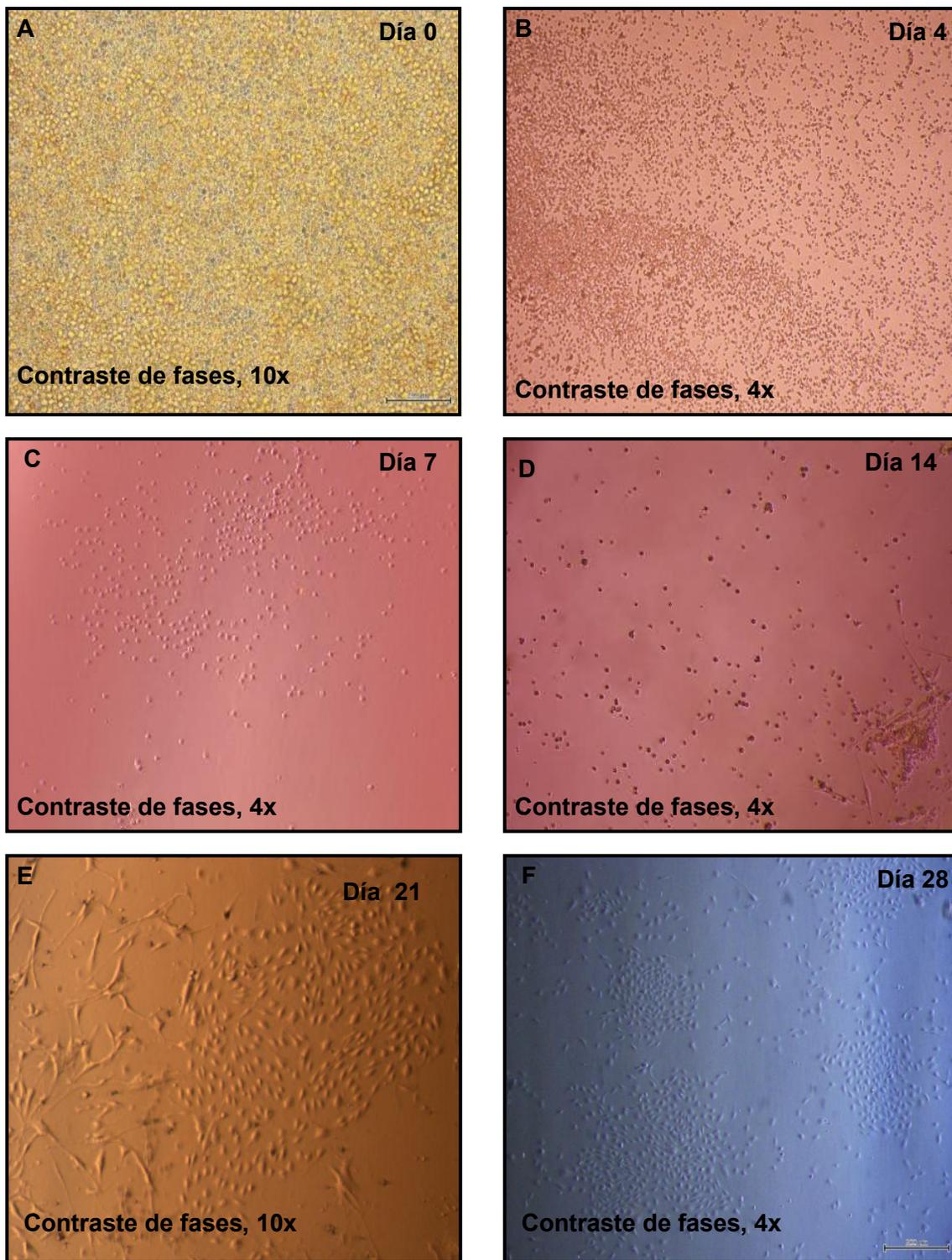
## **8. RESULTADOS**

En la figura 1 se observa un cultivo de células HUVEC obtenidas de la vena de cordón umbilical usadas como control (pasaje 3). En la imagen A (contraste de fases 4x) se observan células pequeñas que forman colonias de CE, son esféricas y se agrupan en conglomerados, con aspecto de empedrado (cobblestone). En la imagen B (contraste de fases 10x) se observan células grandes que se tomaron de una colonia, con morfología alargada.



**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.

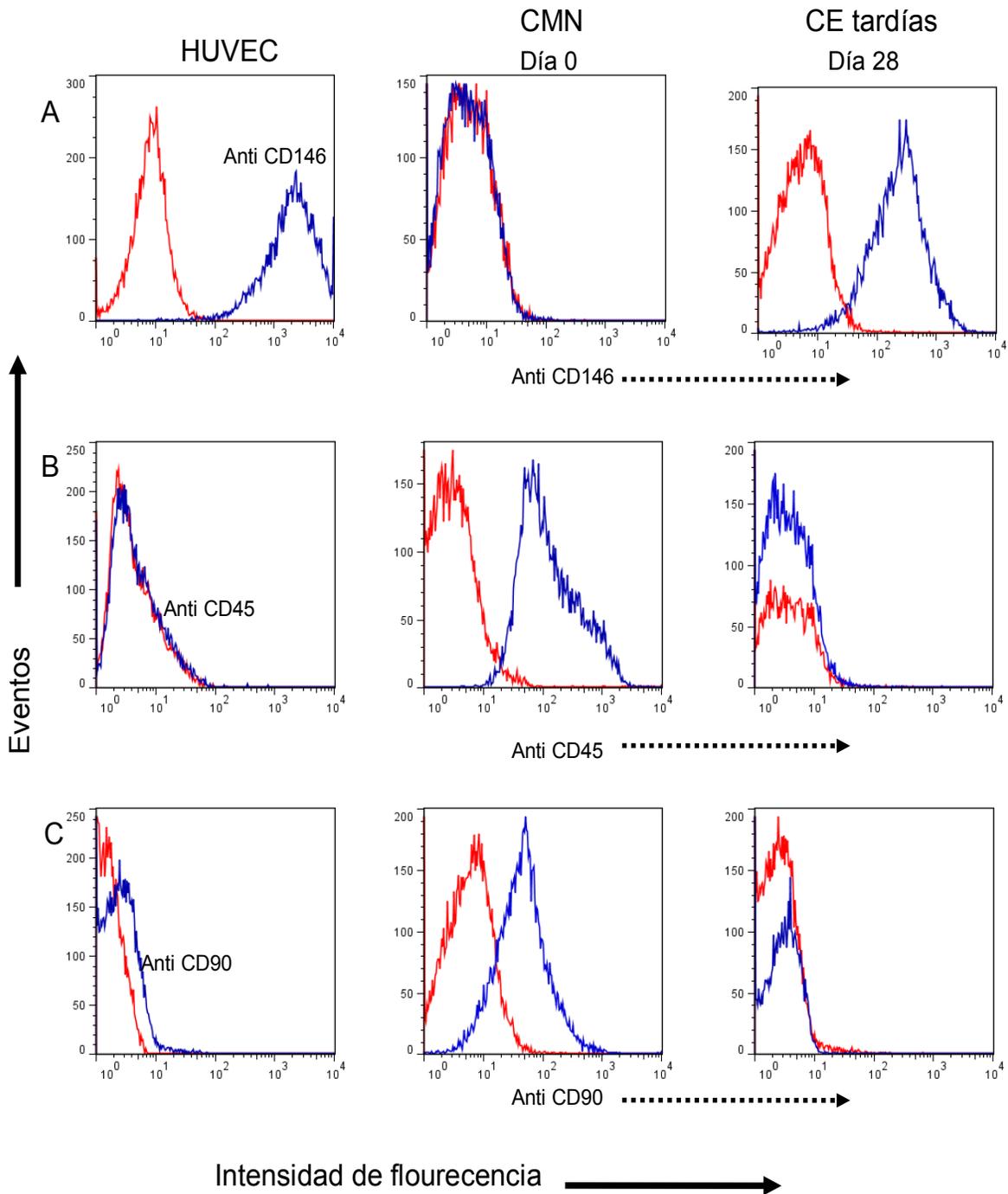
En la figura 2 se muestran cultivos de CMN de MO no adherentes. En el día 0 y 4 (fig. 2 A-B) es la primera fase de adaptación donde las células van anclándose paulatinamente al medio, en estos días se observan CMN, las que no son adherentes se eliminan en los cambios de cultivo con forme pasan los días (fig 2 C-D), en el día 7 y 14 de cultivo ya solo se observan las células adherentes, las cuales forman clusters. En el día 21 y 28 de cultivo (fig 2 E-F) se muestra la formación de colonias de células endoteliales, que se definen así basandose en los criterios morfológicos como una monocapa confluyente con patrón de empedrado o cobblestone, similar al control (HUVEC).



**Fig.2. Cultivos de CMN de MO no adherentes.** A) Las CMN sembradas desde el inicio del cultivo conocido como día cero, que permanecieron en el sobrenadante fueron sembradas en otra placa de cultivo cubierto con fibronectina; B) 4 días de cultivo; C) 7 días de cultivo; D) 14 días de cultivo; E) 21 días de cultivo, en donde se detectan células endoteliales que fueron clonadas y F) cultivo de células endoteliales clonadas a 28 días de cultivo. Las imágenes fueron captadas en microscopio de contraste de fases.

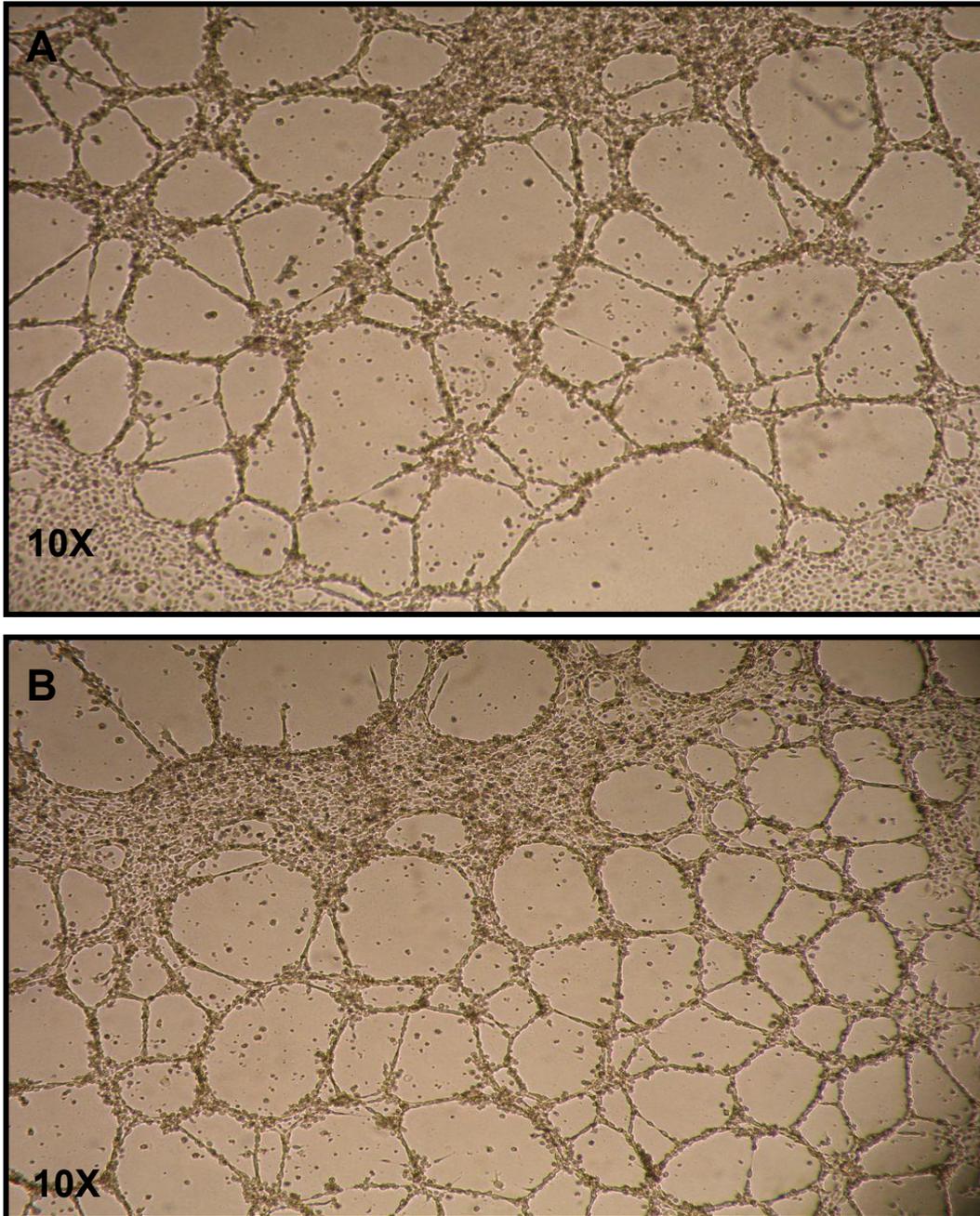
Con el fin de determinar las características fenotípicas de las células en cultivo en el día 0 (CMN) y día 28 (CE tardías) se realizó citometría de flujo y se comparó con las obtenidas con HUVEC. Se usaron los marcadores de superficie CD 146, CD 45 y CD 90.

La presencia de CD146 (marcador de célula endotelial) con una intensidad de fluorescencia positiva en color azul para células adherentes de cultivo en el día 28 y en HUVEC, pero negativa en CMN (día cero). La expresión de CD 45 es positiva en CMN y negativa en CE tardías y HUVEC, lo que indica que en el día 28 de cultivo ya no existen CMN de origen hematopoyético. El marcador de superficie CD 90 se expresa en CMN y está ausente en CE tardías y en el control (HUVEC), lo que indica que en el día 28 de cultivo no existen células mesenquimales.



**Fig.3. Expresión de antígenos de superficie de CE (tardías), 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.

Para comprobar la función de las CE tardías del día 28 de cultivo se realizó un ensayo de estructuras tubulares. Dentro de las 24 horas de incubación de estas células se formó una red de capilares en una superficie recubierta con una matriz de gelatina. Tanto HUVEC fig. 4-A como CE tardías fig. 4-B forman estructuras típicas de CE.



**Fig.4. Formación de estructuras tubulares de células adherentes y no adherentes.**  $4 \times 10^4$  de CE purificadas, tratadas por una semana con medio 200PRF suplementado por LSGS, fueron sembradas sobre una base de gelatina (Geltrex) y a las 24hrs se observaron las uniones célula-célula dando la apariencia de una red. **A)** HUVEC **B)** CE a los 28 días de cultivo.

## 9. DISCUSIÓN

Desde 1997, cuando Asahara describió CPE en sangre periférica diversos grupos de trabajo se han enfocado en aislar y caracterizar estas células, sin embargo su baja frecuencia hace difícil su obtención. Las técnicas utilizadas siempre parten de un cultivo de CMN, sean estas de sangre periférica (32), placenta (41), o cordón umbilical. Para aislar y caracterizar el fenotipo de CE en medula ósea normal partimos igualmente de CMN que se obtuvieron de aspirado de medula ósea.

Las CMN obtenidas fueron abundantes, de aspecto esférico y birrefringente, las cuales se cultivaron en pozos recubiertos con fibronectina en un medio de cultivo que contiene factores de crecimiento endotelial, antibióticos y suero fetal bovino, después de 4 a 7 días en cultivo, y conforme a los cambios de medios, las células no adherentes se eliminaron y las células adherentes en el día 14 se observan con aspecto poligonal y formando clusters. En el día 21 y 28 se empiezan a ver con mayores uniones intercelulares hasta llegar a un estado de semiconfluencia con aspecto de “empedrado” (cobblestone) que es característica de células endoteliales, determinado así por la comparación que se hace con HUVEC, las cuales muestran el mismo patrón (40). Esta técnica para aislar CE fue usada de igual manera por diferentes grupos de trabajo (42, 43). Por lo tanto, las CE solo se pueden definir en este ensayo, por su aspecto morfológico (empedrado) y la adhesión a la fibronectina en el medio de cultivo. Aunque este es un método simple para aislar una población de células endoteliales por su capacidad de adherencia, puede ser inadecuado debido a la falta de especificidad de las células obtenidas (44). Sin embargo, el complementar la caracterización de estas células con citometría de flujo y ensayos de funcionalidad aumentan la especificidad.

Las CMN obtenidas de la medula ósea muestran en el día 0 y 4 de cultivo gran heterogeneidad celular, incluyendo numerosas células sanguíneas o células progenitoras las cuales expresan los receptores de la integrina para fibronectina y se adhieren a las placas recubiertas con esta molécula. De hecho, los monocitos son la población celular más abundante de las CMN y cuando se siembran en placas recubiertas de fibronectina, se adhieren, al cultivarse en medios que contienen factores de crecimiento endoteliales expresan una variedad de

proteínas que normalmente solo están en las células endoteliales (factor de von Willebrand, óxido nítrico sintasa endotelial, CD31, CD144, y el receptor de factor de crecimiento endotelial vascular 2 [KDR]) (46, 47). Por lo anterior, este método muy sencillo de aislamiento de CE adherentes a partir de CMN *in vitro* no garantiza la aparición única de CE. Por lo que es necesario complementar con otras técnicas, como de funcionalidad, para garantizar la presencia de CE. En este estudio se complementó usando citometría de flujo para los marcadores de superficie CD146, CD45 y CD90, y posteriormente un ensayo de estructuras tubulares.

Un segundo método de identificación de CE se ha basado en la identificación de un patrón particular de la expresión de antígenos de superficie de la célula. Por lo que se determinó por citometría de flujo CD146, CD45 y CD90 en CMN, CE (28 días de cultivo) y en células HUVEC, las cuales se usaron como control. En cuanto a la expresión de antígenos de superficie en los histogramas correspondientes para células HUVEC que se describen como endoteliales, presentan un patrón CD146+, CD45-, CD90-, esto corresponde al patrón de expresión de antígenos de superficie para esta célula, al tener CD 45- y CD90- que indica que no son de origen hematopoyético ni mesenquimal respectivamente.

El marcador de superficie CD146 en el día cero de cultivo de CMN es negativo, pero en el día 28 se detecta como positivo. Esto sugiere que existe gran heterogeneidad de CMN en MO y que podría existir un número restringido de CE en estas células por lo que este marcador es negativo inicialmente, sin embargo al día 28 de cultivo, donde solo existen células adherentes y donde ya se eliminaron las células no adherentes, el CD146 es positivo, esto indica que las células adherentes son endoteliales y que correlaciona con la característica morfológica. Estos resultados para CD146 corresponden a lo reportado por otros trabajos (32, 33, 41) que para la identificación de CE parten de CMN.

Con respecto a lo anterior, el CD45 que es un marcador de células hematopoyéticas es positivo en el día 0, confirmando que las CMN de MO son en su mayoría de origen hematopoyético, pero en el día 28, este marcador es

negativo para CE, lo que indica que las células hematopoyéticas que carecen de capacidad adherente son eliminadas y que solo quedan en el cultivo CE.

De igual forma, el CD90 marcador de células mesenquimales es positivo en el día 0 y negativo en el día 28, característica similar con el CD45, lo que indica que en las CMN de MO del día 0 existe gran cantidad de células mesenquimales, que al no poder adherirse se eliminan y ya no son detectadas en el día 28.

Las CMN de MO en el día 0 presentan un patrón: CD146-, CD45+, CD90+, que indica mayor número de células hematopoyéticas y mesenquimales y menor frecuencia de CE. Sin embargo para el día 28 se presenta un patrón CD146+, CD45-, CD90-, que indica que son CE sin presencia de células hematopoyéticas ni mesenquimales. Esto corresponde con el patrón de las células control HUVEC.

Para corroborar que las células de cultivo del día 28 son CE se realizó además un ensayo de estructuras tubulares, en el cual se observa la unión célula - célula dando la apariencia de una red, similar a la que se forma en el control HUVEC.

Con esta técnica de aislamiento y caracterización se puede determinar que existe CE con un perfil de expresión CD146+ / CD 45- / CD 90-, sin contaminación de otro tipo celular, que a su vez se correlaciona con la estructura morfológica típica de empedrado de estas células, así como también la capacidad de formar estructuras tubulares. Sin embargo no se puede determinar si estas células son CPE o CFCE, esto debido a que se necesita determinar más antígenos de superficie de estas células según lo reportado en varios estudios (48).

## **10. CONCLUSIONES**

Las células mononucleares obtenidas de Médula ósea son de linaje mesenquimal, hematopoyético y en baja frecuencia endotelial, esto se determina así por la presencia de CD146-, CD45+ y CD90+. En el día 28 de cultivo se observa morfología típica de semiconfluencia con aspecto de empedrado, característica de CE, para complementar la identificación se obtuvo un patrón CD146+, CD45- y CD90- que demuestra que no hay células de origen hematopoyético ni mesenquimal. Posteriormente estas células formaron estructuras tubulares cuando se sembraron en una matriz.

Se concluye que las células obtenidas en el día 28 son endoteliales, esto es porque cumplen con la morfología, patrón CD146+, CD45- y CD90-, además de su capacidad de formar estructuras tubulares.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Gartner LP, Hiatt JL. Histología básica. Editorial Elsevier. 1era Edición 2011, España. pag. 352.
- 2.- Porwit A, McCullough J, Erber W.N. Blood and Bone Marrow PATHOLOGY. Editorial Churchill Livingstone. Second edition 2011, China. pag 722.
- 3.- Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. Nat Rev Immunol. 2006; 6 (2): 93-106.
- 4.- Kunisaki Y, Frenette PS. The secrets of the bone marrow niche: Enigmatic niche brings challenge for HSC expansion. Nat Med. 2012 Jun 6; 18 (6): 864-5.
- 5.- Sans Sabrafen J, Besses Raebel C, Vives Corrons J.L. Hematología clínica. Editorial Elsevier. 5ª Edición 2006, España. pag. 889.
- 6.- Mayani et al. Hematopoyesis. Cancerología 2 (2007): 95-107.
- 7.- Morrison SJ, Scadden DT. The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. Nature. 2014 16; 505 (7483): 327-34.
- 8.- Yin T, Li L. The stem cell niches in bone. J Clin Invest. 2006; 116 (5): 1195-201.
- 9.- Boulais P. E, Frenette P. S. Making sense of hematopoietic stem cell niches. Blood 2015, 125 (17): 2621-2629.
- 10.- Goligorsky MS, Salven P. Concise review: endothelial stem and progenitor cells and their habitats. Stem Cells Transl Med. 2013; 2 (7): 499-504.
- 11.- Wang QR, Yan Q. 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.
- 12.- Nilsson S.K, Johnston H.M, et al. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. Blood, 2001, 97 (8): 2293-2299.
- 13.- Zhang J, Niu C, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature 2003, 425 (7239): 776-779.
- 14.- Arai H, Hirao A, et al. Tie 2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. Cell 2004, 118 (2): 149-161.

- 15.- Nilsson S.K, Johnston H.M, et al. Osteopontin a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 2005, 106 (4): 1232-1239.
- 16.- Petit I, Szyper-Kravitz M, et al. G-CSF induces stem cell mobilization by decreasing bone marrow SDF-1 and up-regulating CXCR4. *Nat immunol* 2002, 3 (7): 687-694.
- 17.- Wang Qi-Ru, Yan Qi. 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.
- 18.- Kiel M. J, Yilmaz O.H. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cell and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 2005, 121 (7): 1109-1121.
- 19.- Kiel M. J, Radice G. L. et al. Lack of evidence that hematopoietic stem cells depend on N-cadherin-mediated adhesion to osteoblasts for their maintenance. *Cell Stem Cell*, 2007, 1 (2): 204-217.
- 20.- Sacchetti B, Funari A. et al. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 2007, 131 (2): 324-336.
- 21.- Chan C. K, Chen C. C. et al. Endochondral ossification is required for haematopoietic stem-cell niche formation. *Nature* 2009, 457 (7228): 490-494.
- 22.- Sugiyama T, Kohara H. et al. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 2006, 25 (6): 977-988.
- 23.- Salter A. B, Meadows S. K. et al. Endothelial progenitor cell infusion induces hematopoietic stem cell reconstitution *in vivo*. *Blood* 2009, 113 (9): 2104-2107.
- 24.- Butler J. M, Nolan D. J. et al. Endothelial cell are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 2010, 6 (3): 251-264.
- 25.- Fishman AP. Endothelium: A distributed organ of diverse capabilities *Ann NY Acad Sci* 1982; 401:1.
- 26.- Pries A. R, Kuebler W. M. Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol*. 2006; (176 Pt 1): 1-40.

- 27.- Galley HF, Webster NR. Physiology of the endothelium. *Br J Anaesth.* 2004; 93 (1): 105-13.
- 28.- Sandoo A. et al. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *Open Cardiovasc Med J.* 2010; 4: 302–312.
- 29.- Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med.* 2003; 9 (6): 685-93.
- 30.- Mann G. E, Yudilevich D .L, Sobrevia L. Regulation of amino acid and glucose transporters in endothelial and smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 2003 Jan; 83(1):183-252.
- 31.- Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br J Pharmacol.* 2006; 147 Suppl 1:S193-201.
- 32.- Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science.* 1997; 275: 964-967.
- 33.- Urbich C, Dimmeler S. Endothelial progenitor cells characterization and role in vascular biology. *Cir Res.* 2004; 95 343-353.
- 34.- Shi Q, Rafi S, Wu MH, Wijelath ES, Yu Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage LR, Moore MA, Store RF, Hammond WP. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood.* 1998; 92:362-367.
- 35.- Handgretinger R, Gordon PR, Leimig T, Chen X, Buhring HJ, Niethammer D, Kuci S, Biology and plasticity of CD133+ hematopoietic stem cell. *Ann NY Acad Sci.* 2003; 996:141-151.
- 36.- Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med.* 2004; 8 (4): 498-508.
- 37.- Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, Meade V, Fenoglio A, Mortell K, Pollok K, Ferkowicz MJ, Gilley M, Yoder MC. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood* 2004; 104: 2752-2760.
- 38.- Yoder MC, Mead LE, Prater D, Krier TR, Mroueh KN, Li F, Krasich R, Temm CJ, Prchal JT, Ingram DA. Redefining endothelial progenitor cells via clonal analysis and hematopoietic stem/progenitor cell principals. *Blood* 2007; 109:1801-1809.

- 39.- George L. A, et al. Endothelial progenitor cell biology in disease and tissue regeneration. *J Hematol Oncol.* 2011; 4: 24.
- 40.- Möbius-Winkler S, Höllriegel R, Schuler G, Adams V. Endothelial Progenitor Cells: Implications for Cardiovascular Disease. *Cytometry Part A* , 2009, 75A: 25-37.
- 41.- Sölder E, Böckle BC, Nguyen VA, et al. Isolation and characterization of CD133+CD34+VEGFR-2+CD45- fetal endothelial cells from human term placenta. *Microvasc Res.* 2012 Jul; 84 (1): 65-73.
- 42.- Ito H, Rovira II, Bloom ML, Takeda K, Ferrans VJ, Quyyumi AA, Finkel T. Endothelial progenitor cells as putative targets for angiostatin. *Cancer Res* 1999; 59: 5875–5877.
- 43.- Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2003; 348: 593–600.
- 44.- Yoder MC. Human Endothelial Progenitor Cells. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Jul; 2 (7): 1-14.
- 45.- Hassan NF, Campbell DE, Douglas SD. Purification of human monocytes on gelatin-coated surfaces. *J Immunol Methods* 1986; 95: 273–276.
- 46.- Schmeisser A, Garlich CD, Zhang H, et al. Monocytes coexpress endothelial and macrophagocytic lineage markers and form cord-like structures in Matrigel under angiogenic conditions. *Cardiovasc Res* 2001; 49: 671–680.
- 47.- Schmeisser A, Graffy C, Daniel WG, Strasser RH. Phenotypic overlap between monocytes and vascular endothelial cells. *Adv Exp Med Biol* 2003; 522: 59–74.
- 48.- Timmermans F, Plum J, Yöder MC, Ingram DA, Vandekerckhove B, Case J. Endothelial progenitor cells: identity defined? *J Cell Mol Med.* 2009 Jan; 13 (1): 87-102.