



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**“Derivación de Células Endoteliales a partir de Células  
Troncales Embrionarias de Ratón”**

**TESIS PROFESIONAL**

**PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**B I Ó L O G O**

**PRESENTA:**

**Alan Jesús Gómez Calderón**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**Dr. Paul Mondragón Terán**



**Los Reyes Iztacala Edo. Mex.**

**Marzo, 2016**



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.

# Índice de contenido

<b>1</b>	<b>Resumen</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Introducción</b> .....	<b>2</b>
2.1	Células Troncales .....	2
2.2	Células Troncales Embrionarias.....	3
2.3	Oct $\frac{3}{4}$ y Nanog en el mantenimiento del estado pluripotente y la auto renovación de las células troncales embrionarias.....	6
2.4	Embriogénesis del Ratón: Mesodermo Definitivo y Desarrollo y Regulación del Sistema Vasculuar. ....	9
2.4.1	Desarrollo del Mesodermo Definitivo en el Ratón.....	9
2.4.2	Desarrollo del Sistema Vasculuar: Vasculogénesis y Angiogénesis. ....	10
2.4.3	Marcadores Asociados a la Regulación del Desarrollo Vasculuar.....	14
<b>3</b>	<b>Antecedentes</b> .....	<b>18</b>
3.1	Células Troncales Embrionarias como modelo de diferenciación celular. ....	18
3.2	Las CTER como modelo de Diferenciación Endotelial. ....	19
<b>4</b>	<b>Justificación</b> .....	<b>21</b>
<b>5</b>	<b>Hipótesis</b> .....	<b>21</b>
<b>6</b>	<b>Objetivos</b> .....	<b>22</b>
6.1	General.....	22
6.2	Particulares.....	22
<b>7</b>	<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>24</b>
7.1	Cultivo celular.....	24
7.1.1	Mantenimiento de las CTER .....	24
7.1.2	Conteo celular y prueba de viabilidad de las CTER .....	25

7.2	Diferenciación endotelial .....	25
7.3	Derivación de Precursores Vasculares (Etapa Preliminar).....	26
7.3.1	Comparación de la expansión celular en Colágeno Tipo 1 y Colágeno Tipo IV .....	26
7.3.2	Comparación de la expansión y fenotipo celular con dos concentraciones de VEGF	26
7.3.3	Derivación de Precursores Endoteliales (1 <sup>ra</sup> etapa).....	27
7.3.4	Derivación de Células Endoteliales Especializadas (2 <sup>da</sup> etapa).....	27
7.4	Inmunocitoquímica .....	28
7.4.1	Detección de marcadores de pluripotencia .....	28
7.4.2	Detección de marcadores de precursores vasculares .....	28
7.4.3	Detección de marcadores de células endoteliales especializadas .....	29
7.4.4	Cuantificación de la expansión y densidad celular mediante microfotografías .....	29
7.4.5	Citometría de Flujo:.....	30
7.4.6	Análisis estadístico. ....	31
<b>8</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>32</b>
8.1	Cultivo de Células Troncales Embrionarias de Ratón .....	32
8.2	Diferenciación hacia linaje endotelial .....	37
8.2.1	Derivación de Precursores Vasculares (Etapa Preliminar).....	37
8.2.2	Derivación de Precursores Vasculares.....	41
8.2.3	Derivación de Células Endoteliales Especializadas.....	44
<b>9</b>	<b>Discusión .....</b>	<b>57</b>
<b>10</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>62</b>
<b>11</b>	<b>Referencias .....</b>	<b>63</b>

## 1 Resumen

Las Células Troncales Embrionarias de Ratón (CTER) son células pluripotentes derivadas de la masa celular interna del blastocito; éstas tienen el potencial de auto-renovarse *in vitro* conservando su estado indiferenciado, con la capacidad de derivar a todos los linajes celulares. Las CTER presentan reguladores de la pluripotencia, tales como *Oct 3/4*, *Sox2* y *Nanog*. De acuerdo a la capacidad de diferenciación de las CTER éstas se podrían emplear en protocolos de medicina regenerativa, modelos de revascularización y reparación de tejido isquémico, además del tratamiento de patologías. La manera más simple para inducir la diferenciación de las CTER, consiste en cultivarlas en medios, factores de inducción y matrices específicas. El objetivo de este estudio, fue desarrollar un protocolo de diferenciación de CTER hacia precursores vasculares (PV) y células endoteliales especializadas (CEE), empleando una matriz extracelular específica y diferentes concentraciones de VEGF. El mantenimiento de las CTER, se efectuó de acuerdo al protocolo de Mondragón y cols en el 2011, identificándolas por Citometría de Flujo para los marcadores *Nanog* y *Oct 3/4*. El método de diferenciación se realizó con modificaciones de los protocolos descritos por McCloskey y cols (2006) y Hatano y cols (2013); evitando el uso de purificación magnética. Durante la etapa preliminar, se comparó la expansión de PV en dos tipos de colágeno (I y IV), así como dos concentraciones de VEGF ( $10\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  y  $30\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ). Se realizó la detección de células *Oct 3/4+*, *Fik-1+*, *PECAM+* y *VE-Caderina+* por inmunocitoquímica a las 120h, 360h, 600h y 840h del proceso de diferenciación endotelial, cuantificando las células  $\cdot\text{cm}^{-2}$  por cada marcador, en cada tiempo de evaluación. El colágeno IV resultó ser la matriz óptima para la expansión de PV. No se observaron diferencias en el empleo de ambas concentraciones de VEGF al término de la etapa preliminar. Durante el proceso de diferenciación, se encontró un recambio notable en la cantidad de células pluripotentes (*Oct 3/4+*) por precursores vasculares (*Fik-1* y *PECAM*), a 120h y 360h; éstos consecutivamente en células endoteliales especializadas (*VE-Caderina*), a 600h y 840h. Se concluyó que es posible derivar PV y CEE mediante el protocolo de diferenciación empleado, sin purificación magnética.

## 2 Introducción

### 2.1 Células Troncales

Una Célula Troncal (CT) es una célula que tiene la capacidad de auto replicarse, manteniendo un estado indiferenciado, por lo que pueden derivar en uno o más tipos de células, que en el desarrollo embrionario constituirán órganos o tejido específico (Hui y cols., 2011).

Las CT se pueden clasificar de acuerdo a su plasticidad, es decir en su capacidad de diferenciación, como se muestra en la siguiente tabla.

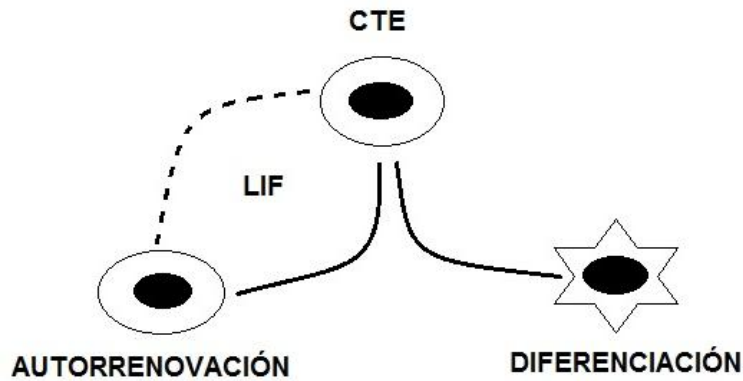
**Tabla 1.** Tipos de Células Troncales, de acuerdo a su origen, plasticidad o potencial de diferenciación y progenie (CTE: Células Troncales Embrionarias; CTTE: Células Troncales de Tejido Específico; CPI: Células Pluripotentes Inducidas) (Adaptado de Can., 2008).

Nomenclatura	Tipo celular (origen)	Plasticidad	Progenie
<b>CTE</b>	Células en estadio de mórula	Totipotentes	Tejidos embrionarios y extraembrionarios
	Células de la masa interna del blastocito	Pluripotentes	Tejidos embrionarios ( células somáticas y germinales)
<b>CTE</b>	Células del Epiblasto en estadio de gástrula	Pluripotentes	Endodermo, mesodermo y ectodermo
<b>CTE</b>	Células del ectodermo, endodermo o mesodermo	Pluripotentes	Todas las células somáticas
<b>CTTE</b>	Células de tejidos específicos	Multipotentes	Uno o varios tejidos, dependiendo el tejido del que resida (ej. Células Troncales Hematopoyéticas)
<b>CTTE</b>	Células residentes en un determinado tejido	Unipotentes	Un solo tipo celular (ej. Precursores endoteliales)
<b>CPI</b>	Células Somáticas reprogramadas des diferenciadas	Pluripotente	Endodermo, mesodermo y ectodermo

## 2.2 Células Troncales Embrionarias

Las Células Troncales Embrionarias (CTE), son células pluripotentes derivadas de la masa celular interna del blastocito o blástula temprana (usualmente a los 3.5 días del desarrollo embrionario), el cual es el primer y único evento de diferenciación del cigoto en este estadio embrionario que prosigue a la mórula, (Evans y Kaufma., 1981). Estas células tienen el potencial de auto-renovarse y auto replicar su material genético por largos periodos de tiempo, manteniendo un estado de pluripotencia; mientras que al realizar ensayos de diferenciación *in vitro* o *in vivo*, estas células generan derivados de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y del ectodermo), prescindiendo de la formación de capas extraembrionarias (Smith., 2001; Wobus & Boheler., 2005).

La línea celular E14Tg2a es un linaje de Células Troncales Embrionarias de Ratón (CTER), que inicialmente se cultivaban sobre una monocapa de células fibroblásticas embrionarias de ratón (células alimentadoras). Para el cultivo de las CTER E14Tg2a, además del co-cultivo (fibroblastos embrionarios), se ha utilizado un medio de cultivo definido para inducir su proliferación manteniendo su estado indiferenciado. Posteriormente, se identificó que estas células alimentadoras secretaban una citosina, involucrada en el mantenimiento de la pluripotencia de las CTER; por lo que mediante el empleo de un análogo de éstas moléculas, el Factor Inhibidor de la Leucemia o LIF (del inglés "*Leukemia Inhibitory Factor*"), se logró la adaptación de ésta línea celular a un sistema libre de células alimentadoras, gracias al suplemento del medio de cultivo con este factor (Figura 1) (Williams y cols., 1988; Park y cols., 2012). El LIF es una Interleucina perteneciente a la familia de las IL-6 (Interleucina 6) que actúa como un factor de transcripción clave en el mantenimiento de la pluripotencia, promoviendo la expresión de genes que inducen la auto renovación y simultáneamente la supresión de genes asociados a la diferenciación celular (Smith, y cols, 1988; Williams y cols., 1988; Matsuda y cols., 1999).



**Figura 1.** Destino alternativo de una célula troncal embrionaria en presencia de LIF, para inducir a la autorrenovación celular y sin presencia de LIF para inducir la Diferenciación Espontanea, en un modelo *in vitro*. (Adaptado de Smith, 2001).

Se ha establecido que el Transductor de Señal y Activador de la Transcripción tipo 3, el STAT 3 (Del inglés “*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*”), es regulado por el factor de transcripción LIF (vía JAK/STAT), jugando un papel indispensable en la capacidad de auto-renovación de las CTER (Matsuda y *cols.*, 1999).

El LIF actúa a través de un receptor heterodimérico transmembranal, compuesto por dos subunidades, un receptor de baja afinidad a LIF (LIFR- $\beta$ ), y una glucoproteína (gp130). El LIF y su receptor (LIFR- $\beta$ / gp130), son expresados en etapas tempranas del desarrollo embrionario; sin embargo, se ha indicado que estos no son requeridos, posterior al proceso de gastrulación (Nichols y *cols.*, 1996; Stewart y *cols.*, 1992; Ware y *cols.*, 1995).

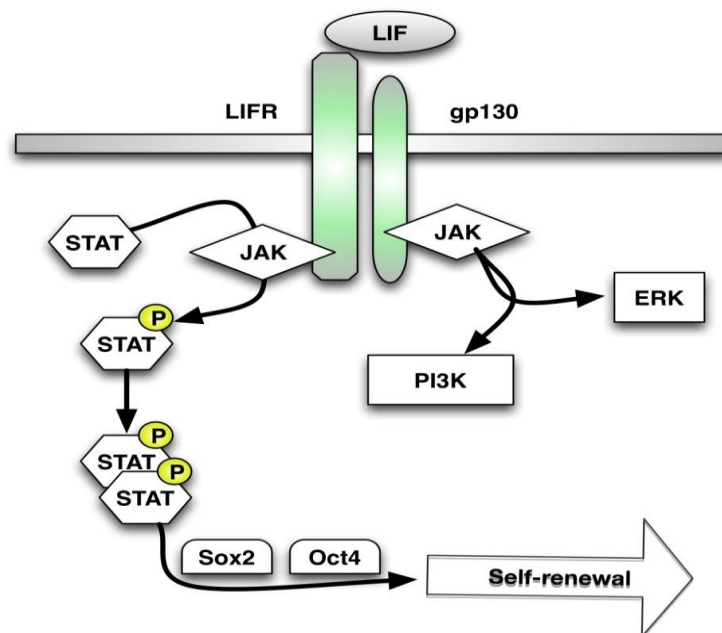
La unión de LIF a LIFR- $\beta$ , induce a la dimerización con gp130, (como ocurre con todas la citosinas de la familia de las IL-6) dando como resultado la formación de un complejo receptor de alta afinidad. El receptor activado es reconocido por una tirosina, la *Janus kinase* (JAK), que al unirse a éste es fosforilada en sus dos unidades (extremo intracelular LIFR- $\beta$  y gp130), activando otros dos sitios de unión, que son capaces de regular otras moléculas implicadas en la transducción de señales (Clahsen y *cols.*, 2005). Estos sitios de unión son reconocidos mediante los dominios



SH2 (*Src homology 2*) o Tyr- 559, facilitando la unión de las STAT 1 y STAT 3, siendo fosforiladas posteriormente (Stahl y cols., 1995; Claesen y cols., 2005).

Las proteínas STAT activadas, forman homodímeros o heterodímeros que consecuentemente se trasladan al núcleo, donde actúan como factores de transcripción. La activación de STAT3/LIF ha demostrado ser crítica en la auto renovación de las CTER; sin embargo este mecanismo, no se ha dilucidado completamente (Figura 2).

La asociación LIF/STAT 3, participa en la formación de redes de transcripción, que involucran al factor de transcripción c-Myc, junto con otros factores (Nanog, Klf4, Oct 3/4 y Sox2) participando de manera fundamental en el mantenimiento de la pluripotencia, induciendo una alta proliferación e inhibiendo la diferenciación o muerte celular, como se ha observado en células somáticas reprogramadas (Cartwright y cols., 2005; Takahashi y cols., 2007).



**Figura 2.** Mecanismo de señalización de LIF y su integración en el proceso de transcripción, para la auto renovación celular (Adaptado de Quinlan, 2011).

### **2.3 Oct $\frac{3}{4}$ y Nanog en el mantenimiento del estado pluripotente y la auto renovación de las células troncales embrionarias.**

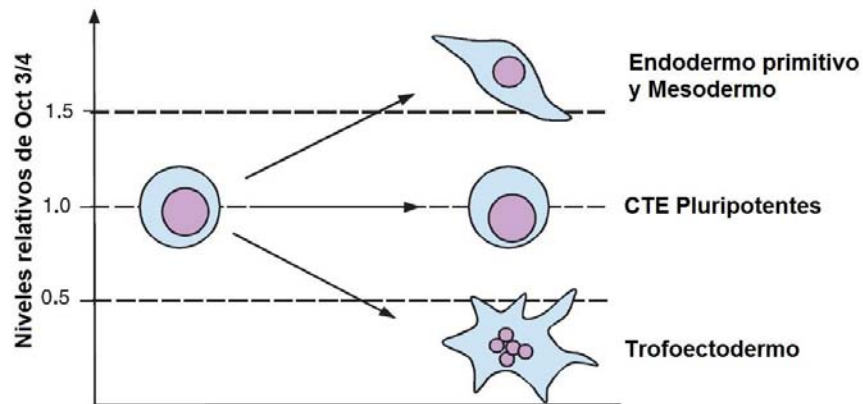
Se encuentra bien establecido que Oct  $\frac{3}{4}$  es un regulador transcripcional (codificado por el gen *Pou5f1*), el cual es expresado constitutivamente en células germinales, células del epiblasto y células troncales embrionarias, considerándolo el regulador maestro de la pluripotencia (Pesce y cols., 1998).

*In vivo*, durante la formación del cigoto, la expresión de Oct  $\frac{3}{4}$  es esencial para el desarrollo inicial de la capacidad pluripotente de las Células de la Masa Interna del Blastocito (CMI), siendo de igual manera un factor esencial requerido en la generación de células pluripotentes inducidas (CPI) (Nichols y cols., 1998; Niwa y cols., 2000).

La expresión de Oct  $\frac{3}{4}$  es común entre el humano y el ratón, por lo que la expresión de ambos disminuye durante la diferenciación tanto *in vivo* como *in vitro* (Smith., 2001).

Se ha demostrado, que en modelos *in vivo* de embriones de ratón *knockout*, al suprimirse la expresión de Oct  $\frac{3}{4}$ , se pierde la capacidad de transdiferenciación, en la etapa de blastocito, careciendo de CMI pluripotentes, derivándose en endodermo primitivo y mesodermo, por lo que también se ha demostrado, que un aumento en la expresión de este mismo factor, se presenta una diferenciación hacia células del trofoblasto o trofoectodermo (Figura 3) (Nichols y cols., 1998; Niwa y cols., 2000).

Estos elementos, sugieren que Oct  $\frac{3}{4}$  regula la transcripción de genes implicados en el control de múltiples funciones celulares y las decisiones del destino celular temprano, siendo el nivel de expresión de Oct  $\frac{3}{4}$  clave para mantener la pluripotencia y la auto renovación celular (Niwa y cols., 2000).



**Figura 3.** Relación del nivel de expresión de Oct  $3/4$  y el destino celular, mostrando una derivación hacia endodermo primitivo y mesodermo a altos niveles y derivación hacia trofoectodermo a bajos niveles de éste factor. (Adaptado de Niwa y cols., 2000).

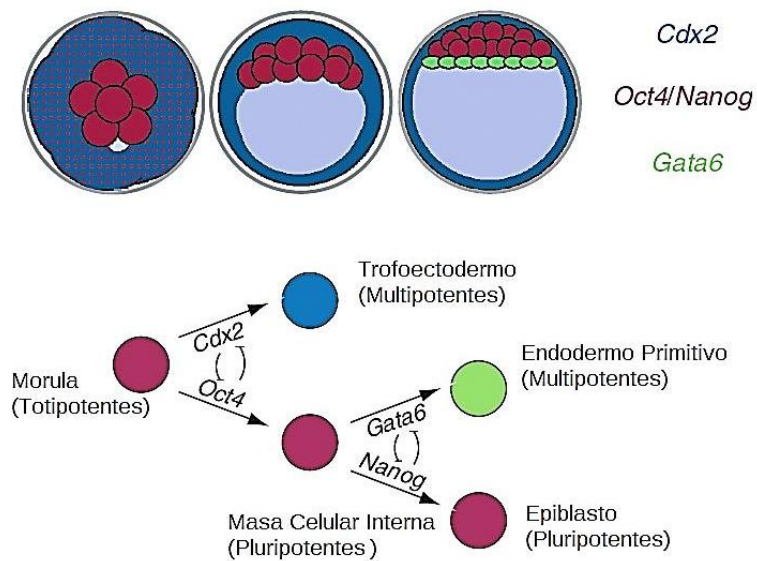
Oct  $3/4$  actúa en “concierto” con otros factores, previniendo la diferenciación celular e inhibiendo la expresión de factores de linajes específicos (Yuan y cols., 1995). Los factores o cofactores mayormente implicados en estos procesos, son Fgf4, Zfp42, Sox2, Cdx2, Hand1, entre otros por lo que es claro que Oct  $3/4$  tiene un papel crítico en el mantenimiento de la pluripotencia; sin embargo su control no está bien esclarecido (Zeng y cols., 2004; Niwa y cols., 2000; Chew y cols., 2005).

El control del nivel de expresión de Oct  $3/4$ , parece estar relacionado con su auto regulación; sin embargo, depende de otros factores, incluyendo el factor de transcripción Nanog (Figura 4) (Pan y cols., 2006).

Recientemente, se ha descubierto que la sobreexpresión de Nanog, contrario a lo que se pensaba, mantiene el estado pluripotente de las CTE, independientemente de la presencia o no de la Proteína Morfogenética de Hueso (BMP del inglés “*Bone Morphogenetic Protein*”) o de LIF, sin embargo la capacidad de auto renovación de estas células se ve reducida (Ying y cols., 2003).

Otros autores han sugerido que Nanog en realidad interactúa con la vía de señalización de Wnt a partir de BMP4, independientemente de la vía STAT3 a partir de LIF, lo cual podría explicar el por qué se presenta una expresión de Nanog en ausencia de LIF, manteniendo la pluripotencia (Chambers y cols., 2003; Mitsui y cols., 2003).

El mecanismo exacto, por el cual Nanog es regulado y cómo afecta el mantenimiento de la pluripotencia, no se encuentra del todo claro, por lo que se cree, que otros factores deben de contribuir en su regulación.



**Figura 4.** Genes expresados durante la formación de blastocito. Oct <sup>3</sup>/<sub>4</sub> y Nanog (Rojo) expresados en Mórula, Masa Celular Interna y Epiblasto. Cdx2 (azul) expresado en trofoectodermo, en la represión de Oct <sup>3</sup>/<sub>4</sub> y Nanog. Gata6 (verde) expresado en endodermo primitivo con la represión de Oct <sup>3</sup>/<sub>4</sub> y Nanog (Adaptado de Ralston & Rossant., 2005).

## **2.4 Embriogénesis del Ratón: Mesodermo Definitivo y Desarrollo y Regulación del Sistema Vascular.**

### **2.4.1 Desarrollo del Mesodermo Definitivo en el Ratón.**

Durante el desarrollo temprano de los vertebrados, el endodermo primitivo y el epiblasto, darán lugar al endodermo definitivo (del que derivarán los pulmones, las glándulas tiroideas, el hígado, la vesícula biliar o el páncreas), ectodermo definitivo (del que derivarán el sistema nervioso o la piel) y mesodermo definitivo (del que derivarán el sistema circulatorio, cartílago, las gónadas, músculos y la médula ósea) (Descamps y Emanuelli., 2012).

En los ratones el mesodermo se forma en el inicio de la gastrulación, alrededor de 6.5 días *post coitum*. Las células del epiblasto migran a través de la línea primitiva y se organizan en la capa germinal mesodérmica, migrando posteriormente, cerca del endodermo y ectodermo, para formar, distintas líneas de desarrollo, el mesodermo axial, paraxial, intermedio y mesodermo lateral (Lawson y cols., 1991; Langman., 2008).

El siguiente mecanismo sería la separación del mesodermo lateral en dos capas, el mesodermo somático o parietal, y el mesodermo esplácnico o visceral, por lo que el último dará lugar a células precursoras de tejidos cardiovasculares (el corazón y los vasos sanguíneos y células sanguíneas) (Johanes & Lütjen-Drecol., 2007).

El tejido cardiovascular, constituyente del sistema circulatorio, consiste en un corazón, células sanguíneas y un complejo sistema de vasos sanguíneos, los cuales son los encargados de transportar y proporcionar los nutrientes, al embrión en desarrollo, siendo este sistema la primera unidad funcional durante la embriogénesis (Gilbert., 2005).

Se ha identificado que distintos factores se encuentran involucrados en la especialización de las células pertenecientes al mesodermo esplácnico en Células Precursoras Vasculares (CPV), como el Factor de Crecimiento Fibroblástico o “FGF” (Del inglés “*Fibroblastic Growth Factor*”) y el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial- 2 (VEGF-2 del inglés “*Vascular Endothelial Growth Factor*”), el cual también está involucrado en procesos posteriores de especialización endotelial (Sakurai y cols., 2006).

Aunque el corazón es el primer órgano funcional, durante el desarrollo embrionario, no cumple su función hasta que el sistema vascular, se ha comenzado a formar; sin embargo, los vasos sanguíneos se forman independientemente, conectándose al corazón poco tiempo después, por lo que éste proceso se lleva a cabo por la Vasculogénesis y la Angiogénesis (Gilbert., 2005).

## **2.4.2 Desarrollo del Sistema Vascular: Vasculogénesis y Angiogénesis.**

Los vasos sanguíneos, son los encargados de transportar y regular la llegada de nutrientes y otras moléculas a diferentes tejidos y órganos, a través de la sangre, además están implicados en procesos de respuesta inmune; es por estos aspectos, que la formación del sistema vascular, es uno de los eventos tempranos más importantes durante la embriogénesis de los mamíferos, resumiéndose en los procesos de Vasculogénesis y Angiogénesis (Figura 5).

### **2.4.2.1 Vasculogénesis**

Risau y colaboradores en 1988, fueron los primeros en usar el término “vasculogénesis”, para describir la formación de nuevos vasos sanguíneos, a partir de un precursor común de células hematopoyéticas (células sanguíneas) y células precursoras endoteliales (vasos sanguíneos), el cual es conocido como hemangioblasto.

Inicialmente, se creía que la vasculogénesis, sólo ocurría durante el desarrollo embrionario, a partir de la diferenciación del mesodermo; recientemente, se ha identificado que este mismo proceso, puede ocurrir a partir de células precursoras procedentes de médula ósea, circulantes en sangre periférica en un organismo adulto, en respuesta a alguna enfermedad o patología (Drake., 2003).

La vasculogénesis consta de varias fases, por lo que en la primera fase, grupos de células del mesodermo esplácnico, son especializadas para diferenciarse en células hemangioblásticas, las cuales expresan marcadores como CD34, CD31 o VEGF-2 (Flk-1), los cuales serán compartidos posteriormente por el tipo de células progenitoras en que deriven (linaje endotelial y hematopoyético) (Ema y cols., 2006).

La segunda fase, consiste en que los hemangioblastos se condensan en un tipo de agregaciones que son denominadas generalmente como islotes sanguíneos o islotes de Wolf, que se unen entre sí formando un tipo de plexos muy primitivos (Palomero y cols., 1998).

En la tercera fase, distintos factores intervienen en la distribución y regionalización celular, de acuerdo a que las células internas de estos islotes, derivarán en precursores hematopoyéticos, mientras que las células externas, derivarán en angioblastos o precursores vasculares (Flamme y cols., 1997).

En la cuarta fase, de la vasculogénesis, los angioblastos se dividen y diferencian en células endoteliales, por la acción del VEGF; el cual es secretado por células mesenquimales, identificándolo como un factor de gran importancia en la formación de los islotes sanguíneos, ya que se ha reportado que éstas estructuras progenitoras vasculares no se forman, en modelos de ratones *knockout* en los que se eliminó el gen que codifica para el receptor principal del VEGF (Flk-1) (Ferrara y cols., 1996).

En la última fase de la vasculogénesis, las células endoteliales forman estructuras tubo vasculares, que se conectan para formar los plexos capilares primarios o redes de vasos sanguíneos primarios, depositándose en la lámina basal de los vasos sanguíneos.

El siguiente proceso de la formación de vasos sanguíneos es la angiogénesis, la cual se encargará de remodelar el plexo vascular y la generación del lecho arterial y venoso (Patel- Het y D'Amore., 2011).

#### **2.4.2.2 Angiogénesis**

La angiogénesis es definida como la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante el brote de nuevas células endoteliales a partir de vasos sanguíneos preexistentes, se ha reportado que este proceso comienza en el ratón, posterior a los 9.5 días *post coitum*, por lo que este proceso posee un papel muy importante en la formación de la mayoría de los vasos sanguíneos en el embrión (Patel- Het y D'Amore., 2011).

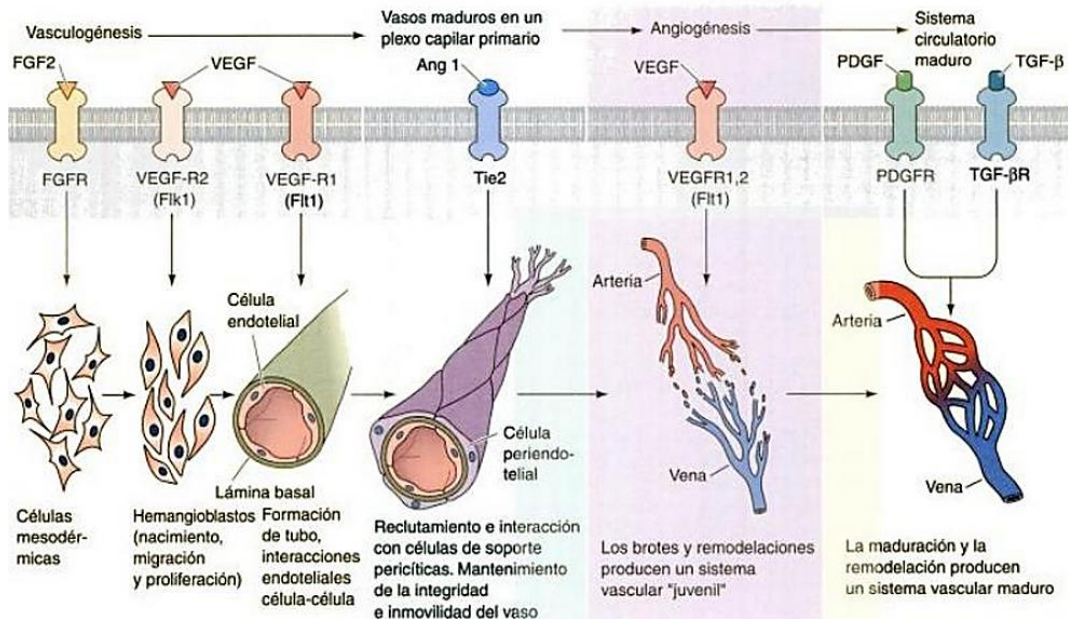
El evento primario en el proceso de angiogénesis, es la degradación de la matriz extracelular a partir de enzimas proteolíticas y precedido de una proliferación y expansión endotelial, por lo que en estas zonas se forman nuevos vasos sanguíneos invadiendo el estroma y nuevos tejidos vecinos (Mignatti y Rifkin., 1996).

Se han descrito un sin número de factores implicados en la regulación de la angiogénesis, sin embargo el VEGF es crucial para este proceso, por lo que actúa en los capilares preformados, induciendo a la pérdida de contactos intercelulares, produciendo una degradación de la matriz extracelular, por lo que seguido de esto ocurre una proliferación y migración de células endoteliales expuestas, conformándose en nuevas estructuras vasculares, formando desde pequeños capilares, hasta estructuras con mayor irrigación como las venas y las arterias (Hanahan, 1997; Liekens y cols., 2001).

Otro proceso de angiogénesis consiste en la formación de dos vasos o más, a partir de la segmentación o separación de un vaso preexistente (Patan, 2000).



Posterior a este proceso, ocurre la conformación de una red vascular madura, mantenida por la acción constante del TGF- $\beta$  (el cual actúa también regulando la expresión de VEGF), además de la acción del factor de crecimiento derivado de plaquetas o PDGF (Del inglés "*Platelet Derived Growth Factor*") implicado en el reclutamiento de las células periciticas, las cuales contribuirán a la integridad, movilidad y flexibilidad capilar, constituyendo ya en este punto un sistema circulatorio maduro (Seghezzi y cols., 1998; Cross & Claesson., 2001).



**Figura 5.** Elementos que participan en la formación de un sistema sanguíneo maduro, comenzando con el proceso de la vasculogénesis, seguido de la formación de un plexo vascular primario, y la remodelación de un plexo vascular maduro, mediante la angiogénesis (Adaptada de Hanahan, 1997).

## 2.4.3 Marcadores Asociados a la Regulación del Desarrollo Vascular

### 2.4.3.1 Factor de Crecimiento Vascular Endotelial (VEGF)

El factor de crecimiento vascular endotelial pertenece a la familia de las moléculas del VEGF, las cuales juegan un rol muy importante durante la vasculogénesis y angiogénesis, influyendo en la formación y el mantenimiento del plexo vascular. Esta familia de VEGF's consiste en cinco miembros: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el factor de crecimiento de placenta o PLGF (Del Inglés "*Placenta Growth Factor*"). Se han identificado, diferentes sitios de unión para éstas moléculas (receptores), en células endoteliales como el VEGFR1 (Flt-1) y el VEGFR2 (Flk-1/ KDR), VEGFR3 (Flt-4) entre otros (Vaisman y cols, 1990).

Cada uno de estos receptores, constan de una parte extracelular, compuesta por siete dominios, muy semejante a una inmunoglobulina y una parte intracelular con un dominio compuesto de aproximadamente 70 a 100 residuos de aminoácidos, con un extremo carboxilo terminal (Fantl y cols., 1993). Existen distintos tipos de VEGF, por lo que se ha clasificado de acuerdo a su afinidad a distintos receptores; el VEGF-A, VEGF-B y el PLGF, se unen a Flt-1 (Del inglés "*Fms-Related Tyrosine Kinase 1*"), mientras que el primero de éstos (VEGF-A) y VEGF-E se unen a Flk-1 (Del inglés "*Fetal Liver Kinase 1*"); VEGF-C y VEGF-D se unen tanto a Flt-4 (Del inglés "*Fms-Related Tyrosine Kinase 1*") y Flk-1, sin embargo, se unen con menor afinidad este último, que a Flt-4 (Takahashi & Shibuya., 2005).

Se ha determinado que los factores arriba mencionados son elementales para la vasculogénesis y angiogénesis, pues posterior a la delección de un alelo de VEGF-A en embriones de ratón, se descubrió que se producían anomalías en los precursores vasculares, células endoteliales y consecuentemente la formación de los vasos sanguíneos, presentándose la muerte del embrión, entre el 11 y 12<sup>vo</sup> día *post coitum*, concluyendo que este factor es realmente importante por su asociación con Flk-1, influyendo directamente en la formación del plexo vascular y la formación de tumores (Carmeliet y cols., 1996; Ferrara y cols., 1996 ).

Un resultado similar se observó en embriones de ratón, en los que al inactivar el gen que codifica para la proteína Flk-1, no presentaron desarrollo de islotes sanguíneos y consecuentemente no se formó el saco vitelino a los 7 días *post coitum*, presentando una organización vascular deficiente y una cantidad reducida de progenitores hematopoyéticos, muriendo a las 8.5 días *post coitum*; de ésta forma se determinó que Flk-1 es esencial para la formación del saco vitelino y el proceso de vasculogénesis en el embrión (Shalaby y cols., 1995); también se ha determinado que este receptor está implicado en la mitogénesis y supervivencia celular, además de estar asociado a la organización del citoesqueleto y migración celular, asociándose con otros factores como PECAM y VE- Caderina (Cébe y cols., 2006).

#### **2.4.3.2 Molécula de Adhesión de Células Endoteliales a Plaquetas (PECAM)**

La molécula de adhesión de células endoteliales a plaquetas o PECAM (del inglés “*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*”) es una inmunoglobulina transmembranal, con un peso molecular de 130 kDa que se encuentra localizada en las uniones intercelulares del endotelio vascular. Sin embargo, ésta proteína también puede expresarse en la superficie de células hematopoyéticas, células de sistema inmune, como los leucocitos, plaquetas, neutrófilos, monocitos, células T y NK, entre otras (Dejana., 2004; Muller., 2003).

Aunque PECAM-1 es considerado el principal ligando de PECAM, éste tiene capacidades de interacciones homofílicas o heterofílicas, por lo que además de unirse a moléculas de PECAM, se puede unir a otras proteínas, como  $\beta$ -catenina y SHP-2 (Muller., 2003). PECAM es una eficiente molécula de señalización que es capaz de exhibir una señalización intracelular y extracelular y aunque el mecanismo por el cual PECAM transfiere señales intracelulares no está del todo clara, se ha encontrado que SHP-2 y  $\beta$ -catenina son moléculas que juegan un papel crucial en la regulación de diferentes vías de señalización, así como la actividad de las caderinas en la interacción con diferentes proteínas intercelulares, en las células endoteliales (Ilan y cols., 2000; Ilan y Madri., 2003).

SPH-2, se encuentra asociada a la cascada de señalización de las MAPK, influyendo en la proliferación celular, mientras que  $\beta$ -catenina en su unión con PECAM regula funciones biológicas similares al mecanismo que regula, su unión a VE- Caderina (Sheibani y cols., 2000; Ilan y Madri., 2003).

Duncan y colaboradores en 1999, realizaron ensayos con ratones *knockout*, en los que se suprimió el gen que codifica para la proteína PECAM-1, observando que el desarrollo vascular ocurrió de manera normal, concluyendo que PECAM no es esencial para el proceso de vasculogénesis durante el desarrollo embrionario.

Se considera que PECAM-1 se encuentra implicado en la regulación de la migración de precursores, células endoteliales, durante la vasculogénesis adulta y principalmente en la angiogénesis, además de modular la migración intercelular de estos mismos precursores y leucocitos a través de las células endoteliales (diapédesis), en eventos de respuesta inmune e inflamación (Vittet y cols., 1996; Dejana, 2004).

#### **2.4.3.3 Caderina Vascular Endotelial/ VE- Caderina (VE- Cadherin)**

Las Células Endoteliales expresan una proteína transmembranal denominada Caderina Vascular Endotelial o VE- Caderina (VE-Cadherin del inglés “*Vascular Endothelial Cadherin*”), que es un componente de las uniones estrechas y adherentes en los vasos sanguíneos. VE- Caderina, no puede ser encontrada en ningún otro tipo de célula, incluyendo células sanguíneas o células troncales hematopoyéticas, por lo que es un marcador endotelial por excelencia, expresado en células comprometidas con linajes endoteliales, presentándose en todos los tipos de vasos sanguíneos (Lampugnani y cols., 1995; Breier & cols., 1996; Bazzoni & Dejana., 2004).

Se ha demostrado que VE- Caderina no es indispensable para iniciar el proceso de vasculogénesis; sin embargo, es requerida en la remodelación y morfogénesis del plexo vascular, durante la angiogénesis (Carmeliet y cols., 1999; Gory y cols., 1999).

Lo anterior se apoya en experimentos en los que se ha demostrado que embriones deficientes de esta proteína, exhibían defectos en su capacidad angiogénica, resultando en la muerte del embrión en la mitad del periodo de gestación, posterior a los 10 días, sugiriendo, que VE- Caderina es indispensable para la adhesión homofílica, además de que es requerida en la morfogénesis vascular (Gory y cols., 1999).

La especificidad celular restringida, indica que VE- Caderina interviene en otros procesos muy importantes para el funcionamiento vascular; como la organización estructural de las células endoteliales; ya que se ha reportado que ésta proteína, a través de su porción C- terminal, forma un dominio con los complejos  $\beta$ -catenina/  $\alpha$ -catenina o plakoglobina/  $\alpha$ -catenina, promoviendo el anclaje a microfilamentos de actina, manteniendo una fuerte unión intercelular, influyendo además en la morfología y polaridad de las células endoteliales (Wheelock y Johnson., 2003; Hartsock y Nelson., 2008).

Otros procesos de vital importancia, para el funcionamiento endotelial son la regulación negativa de la permeabilidad de los vasos sanguíneos, pues se ha reportado que hay una relación negativa en la eliminación de VE- Caderina y la permeabilidad en el endotelio vascular; esta proteína influye en la supervivencia celular mediante una cascada de señalización mediada por el VEGF; y como inhibidor de la proliferación celular, mediante el arresto del ciclo celular (Caveda y cols., 1996; Carmeliet y cols., 1999; Corada y cols., 2002).

### 3 Antecedentes

#### 3.1 Células Troncales Embrionarias como modelo de diferenciación celular.

De acuerdo al potencial que poseen las células troncales embrionarias de ratón, estas células podrían ser utilizadas como modelo para el estudio del proceso de diferenciación celular.

Algunos de los procedimientos básicos, más utilizados, para estudiar la diferenciación *in vitro* de las CTER, son la generación de Cuerpos Embrionarios (EB's del inglés "*Embryoid Bodies*"), a partir de la formación de esferas o conglomerados celulares en suspensión, en ausencia del LIF; así como su co-cultivo con células estromales (Hopfl y cols., 2004). En consecuencia al empleo de estos protocolos de diferenciación, las CTER derivan espontáneamente en distintos grupos de células, por lo que es realmente complicado obtener una población celular pura, al final del proceso de diferenciación, adquiriendo bajos porcentajes de las poblaciones celulares de interés, por lo que inducir la diferenciación a través de EB's se considera un proceso de "diferenciación no controlado" (Smith, 2001; Noghero, A. y cols., 2010).

La manera más simple para inducir la diferenciación de células CTER, consiste en el cultivo de estas, en presencia de medios y matrices específicas, que dirijan la diferenciación hacia una determinada línea celular. En contraste al método de diferenciación antes mencionado (formación de EB's), con este protocolo se evita cualquier variable extraña, por lo que se puede controlar y estudiar con más precisión el proceso de diferenciación de las CTER (Noghero, y cols., 2010).

### 3.2 Las CTER como modelo de Diferenciación Endotelial.

Nishikawa y colaboradores, en 1998, fueron los primeros en describir un eficiente sistema, para inducir la diferenciación vascular, encontrando, que el Colágeno IV, en comparación al Colágeno I y la Fibronectina, funciona como la matriz extracelular más eficiente, suficiente para obtener precursores endoteliales Flk-1<sup>+</sup>; VE- Caderina<sup>-</sup> y que consecutivamente determinaron que es necesario, someter estos precursores endoteliales a una mezcla de distintos factores de transcripción (VEGF, Interleucina 3, Eritropoyetina, entre otros), para inducir a una especialización endotelial; al final del proceso obtuvieron una población Flk-1<sup>+</sup>; VE- Caderina<sup>+</sup>.

Recientemente McCloskey y cols, en el 2006 reportaron un método de diferenciación hacia linaje endotelial, utilizando una línea de CTER (ES-D3), cultivándolas inicialmente en medio sin LIF para inducir una diferenciación “espontanea” o no controlada; posteriormente realizaron una separación por FACS y re-cultivaron en colágeno tipo IV, en medio de cultivo suplementado con 50 ng·mL<sup>-1</sup> de VEGF. Posterior a esta etapa realizaron una separación manual, re cultivando en Colágeno IV en medio EGM-2, (Del inglés “*Endothelial Growth Medium-2*”) para continuar con cultivo en Fibronectina y gelatina porcina. Durante todo el proceso de diferenciación, estos autores, analizaron diferentes parámetros, como la proliferación, fenotipo y expresión de marcadores endoteliales de las “Células Endoteliales derivadas de CTER” (CE-CTER) en comparación Células Endoteliales de Aorta de Ratón (CEAR). Encontraron que en la etapa de Precursores Vasculares (PV) los dos grupos celulares eran positivos para Flk-1 y PECAM; consecutivamente detectaron células VE-Caderina<sup>+</sup>, con un menor rango de expresión en CE-CTER que en CEAR.

Posteriormente, Blancas y colaboradores, en el 2011, compararon 3 líneas de CTER (R1, D3 y E14), cultivándolas, para la etapa de PV en Fibronectina Colágeno I, colágeno IV, y laminina, en medio de cultivo esencial, químicamente definido, suplementado con  $30 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de VEGF entre otros factores, en ausencia de LIF, durante 5 días. Posterior a esta etapa realizaron un aislamiento de células Flk-1+, mediante una purificación magnética, re cultivándolas en las matrices extracelulares mencionadas, en nuevo medio definido para la especialización endotelial, suplementado con  $100 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de VEGF, además de otros factores, durante 15 días aproximadamente.

En el método descrito proponen una segunda purificación manual, y un análisis por citometría de flujo. De acuerdo a lo reportado, el proceso de diferenciación endotelial de la línea celular E14Tg2a, se realizó sin presencia de FBS y sin la segunda purificación, obteniendo valores bajos en el número de células Flk-1+ y VE-Caderina+, en comparación a las otras líneas celulares, cultivadas en presencia de FBS y la segunda purificación, obteniendo hasta un 99% de pureza de células Flk-1+ y VE-Caderina+, concluyendo que las matrices óptimas fueron la Fibronectina, el Colágeno IV y el Colágeno I.

Por otro lado Hatano y colaboradores en el 2013, sometieron a la línea celular D3 de CTER, a un proceso de diferenciación hacia linaje endotelial, cultivándolas en Colágeno IV y medio esencial sin LIF, para inducir una diferenciación espontánea, durante 4 días. Posteriormente a este proceso, las células Flk-1+ fueron aisladas mediante una purificación magnética y consecutivamente recultivadas en Colágeno IV durante 7 días; al concluir el proceso se aislaron de manera manual las células con fenotipo endotelial. Para la etapa de especialización, estas células aisladas, fueron recultivadas en Colágeno IV en medio cultivo EGM-2, suplementado además con  $50 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  de VEGF. Al final del proceso de diferenciación se obtuvieron poblaciones de células Flk1+ y VE-Caderina+, con un 60% para marcadores de venas y un 90% para marcadores de arterias.



## **4 Justificación**

Las Células Endoteliales, derivadas de Células Troncales Embrionarias de Ratón, funcionan como un modelo experimental trascendental, puesto que éstas podrían potencialmente conducir a una amplia variedad de aplicaciones experimentales y clínicamente relevantes, pues podrían ser utilizadas en protocolos de terapia celular y medicina regenerativa en la búsqueda de estrategias para la reparación y la revascularización del tejido isquémico, así como su aplicación en diferentes patologías, como la aterosclerosis, trombosis, insuficiencia venosa, entre otras; es por éstas razones que es imprescindible encontrar el método de diferenciación más eficaz en la obtención del mayor número de células endoteliales viables.

## **5 Hipótesis**

Si las Células Troncales Embrionarias de Ratón son expuestas a VEGF y una matriz extracelular específica en las etapas de derivación de precursores vasculares; se podría obtener un alto número de células endoteliales especializadas, prescindiendo del uso de purificación magnética.

## 6 Objetivos

### 6.1 General

- Desarrollar un protocolo para la diferenciación de células troncales embrionarias de ratón hacia precursores vasculares y células endoteliales especializadas mediante el empleo de una matriz extracelular específica y un medio químicamente definido.

### 6.2 Particulares

- Caracterizar la velocidad de crecimiento y tiempo de duplicación de las CTER a través de una cinética de proliferación.
- Evaluar el estado de pluripotencia de las CTER a través del uso de los marcadores Oct  $\frac{3}{4}$  y Nanog mediante Inmunocitoquímica y citometría de flujo.
- Comparar la expansión de precursores vasculares en Colágeno tipo I y Colágeno tipo IV como matriz extracelular a 24 h, 48 h, 72 h y 96 h de derivación de precursores vasculares.

- Comparar el efecto de diferentes concentraciones de VEGF ( $10\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$  y  $30\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), durante la etapa de producción de precursores vasculares.
- Determinar la expresión de Oct  $3/4$ , Flk-1 y PECAM a 120 h del proceso de diferenciación mediante inmunocitoquímica.
- Determinar la expresión de Oct  $3/4$ , Flk-1, PECAM y Ve-Caderina a 360 h, 600 h y 840 h del proceso de diferenciación, mediante inmunocitoquímica.
- Cuantificar el número de células $\cdot\text{cm}^{-2}$  positivas para cada uno de los marcadores (Oct  $3/4$ , Flk-1, PECAM y Ve-Caderina), en cada uno de los tiempos del proceso de diferenciación.

## 7 Materiales y Métodos

### 7.1 Cultivo celular

Las células troncales embrionarias de ratón “E14Tg2a”, fueron donadas por el “Grupo de Medicina Regenerativa y Bioprocesos de Células Troncales” (University College London, UK). Estas células se cultivaron en placas de cultivo celular de 6 pozos recubiertos con gelatina porcina al 0.1%, utilizando medio GMEM (Del Inglés “*Glasgow Minimal Essential Medium*”), suplementado con 10% de suero fetal bovino o FBS (Del inglés “*Fetal Bovine Serum*”), 1% de aminoácidos no esenciales, 2% de glutamato – piruvato, 0.01% de  $\beta$ - mercaptoetanol,  $1 \times 10^6$  U·ml<sup>-1</sup> del factor inhibidor de la leucemia, cultivadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> con control de humedad relativa. Estas células fueron previamente adaptadas a expansión libre de células alimentadoras, a través de selección de subclonas.

#### 7.1.1 Mantenimiento de las CTER

Las CTER se subcultivaron cada 48 h o cuando alcanzaron el 70% de confluencia; para esto, las células fueron lavadas con DPBS 1X sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> y posteriormente se disgregaron con Tripsina 1X, durante tres a cinco minutos a 37°C. La tripsina fue inactivada con medio GMEM acondicionando con 10% de FBS y sin LIF. La suspensión recuperada se centrifugó a 423g durante 4 minutos. El pellet se resuspendió en medio GMEM completo y se subcultivó a una dilución 1:10 para un pozo de 10cm<sup>2</sup> y una dilución 1:5 para un frasco de 25 cm<sup>2</sup>. El cultivo y mantenimiento de las CTER, se llevó a cabo con base en el protocolo de Mondragón y colaboradores en el 2011.

### 7.1.2 Conteo celular y prueba de viabilidad de las CTER

Se realizó una prueba de viabilidad y conteo celular con la cámara de Neubauer. Se realizó una tinción con azul de Tripán a una dilución 1:1, identificando así las células vivas y células muertas. La población inicial de inóculo fue de  $1 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>, el conteo celular y la viabilidad se realizó durante 192 h para el proceso de diferenciación.

De acuerdo a los datos obtenidos, se realizó la cuantificación de la Velocidad Específica de Crecimiento ( $\mu$ ), así como el Tiempo de Duplicación Celular (Td). Estos valores fueron calculados, en la etapa de crecimiento exponencial, que comprende entre las 24 h a las 96h de la cinética de proliferación de las CTER. Los parámetros se calcularon mediante las siguientes formulas:

#### Velocidad de Crecimiento Específico ( $\mu$ ):

$$\mu = \frac{(\ln(\text{Número de Células Finales}) - (\ln(\text{Número de Células Iniciales})))}{(\text{Tiempo Final} - \text{Tiempo Inicial})}$$

En donde  $\ln$  es el logaritmo natural

#### Tiempo de Duplicación Celular (Td):

$$Td = \frac{\ln 2}{\mu}$$

En donde  $\ln$  es el logaritmo natural

## 7.2 Diferenciación endotelial

El método de diferenciación endotelial propuesto, se llevó a cabo con modificaciones de los protocolos descritos por McCloskey y cols (2006) y Hatano y cols (2013), prescindiendo principalmente de las etapas de diferenciación espontánea (carentes de control del proceso de diferenciación) y de la purificación magnética.

El protocolo de diferenciación constó de dos etapas: La generación de precursores endoteliales (Etapa preliminar y 1<sup>ra</sup> Etapa) y la generación de células endoteliales especializadas (2<sup>da</sup> Etapa) (Figura 6).

### **7.3 Derivación de Precursores Vasculares (Etapa Preliminar).**

Durante la etapa de generación de precursores vasculares, se investigó el efecto de diferentes matrices extracelulares, así como la concentración óptima de factor de crecimiento vascular endotelial en la derivación de ese linaje celular.

#### **7.3.1 Comparación de la expansión celular en Colágeno Tipo 1 y Colágeno Tipo IV**

Las CTER, se inocularon a una densidad de  $1 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup> en placas de 6 pozos tratadas para cultivo celular. Se utilizó dos tipos de Colágeno (Tipo 1 y Tipo IV), en medio GMEM suplementado con 15% FBS, 1% de aminoácidos no esenciales, 2% de Glutamato- Piruvato, 0.01% β- Mercaptoetanol. Durante el cultivo, el medio fue renovado cada 24h.

Se investigó la variación en la derivación de precursores endoteliales, durante 96 horas de cultivo, en Colágeno I y Colágeno IV, por lo que se realizó una comparación de la expansión celular, a las 24h, 48h, 72h y 96h, en las dos matrices extracelulares.

#### **7.3.2 Comparación de la expansión y fenotipo celular con dos concentraciones de VEGF**

Una vez identificada la matriz extracelular óptima para la expansión de los precursores endoteliales, se evaluó el fenotipo y expansión de los precursores endoteliales. Se inocularon  $1 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup> en placas de 6 pozos precubiertos con el Colágeno óptimo, utilizando medio GMEM suplementado con 15% FBS, 1% de aminoácidos no esenciales, 2% de Glutamato- Piruvato, 0.01% β- Mercaptoetanol.

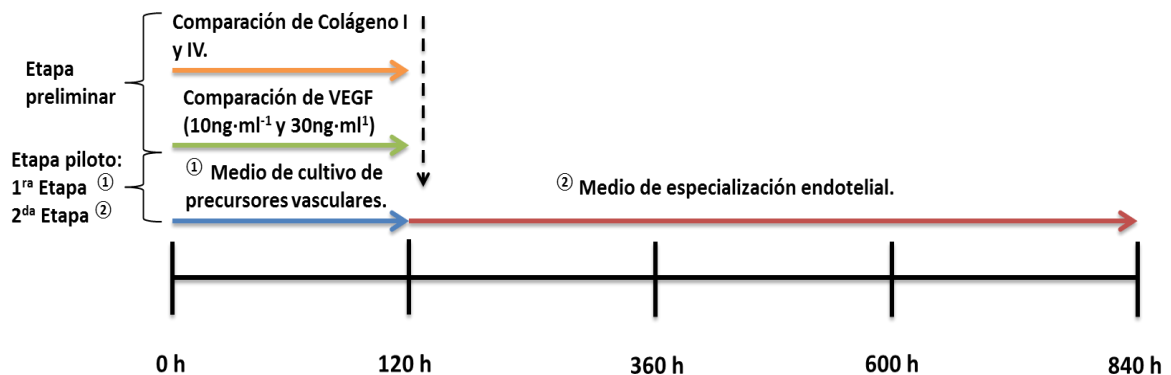
Se analizó el efecto de dos diferentes concentraciones de VEGF ( $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$  y  $30 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), durante 120h de diferenciación celular. El medio de cultivo fue renovado cada 24 h.

### 7.3.3 Derivación de Precusores Endoteliales (1<sup>ra</sup> etapa)

De acuerdo a los resultados obtenidos del ensayo anterior, se decidió qué matriz extracelular utilizar, así como la concentración óptima de VEGF para el proceso de derivación de células endoteliales. Al medio definitivo en ésta 1<sup>ra</sup> etapa, se le denominó medio de cultivo de precursores vasculares.

### 7.3.4 Derivación de Células Endoteliales Especializadas (2<sup>da</sup> etapa).

Durante la etapa de derivación de células endoteliales especializadas (CEE), los precursores vasculares, se mantuvieron utilizando el Colágeno que resultó óptimo; para esto se indujo la especialización a través del uso del medio de crecimiento endotelial 2 o EGM-2 (Del Inglés “*Endothelial Growth Medium- 2*”) (Lonza), suplementado con 10 mL de FBS, 0.2 mL de Hidrocortisona, 2 mL de hFGF- $\beta$ , 0.5 mL VEGF, 0.5 mL R3- IGF-1, 0.5 mL de ácido ascórbico, 0.5 mL hEGF, 0.5 mL Gentamicina/ Anfotericina- 1000 U, y 0.5 mL de Heparina; las células fueron cultivadas en condiciones estándar durante 720h, renovando el medio de cultivo cada 48h. Al medio empleado en ésta etapa se le denominó medio de especialización endotelial.



**Figura 6. Esquema Temporal del Proceso de Diferenciación Endotelial.** Escala de tiempo que esquematiza las distintas etapas del modelo de diferenciación endotelial propuesto, comenzando con la comparación del colágeno tipo I y IV; así como las concentraciones de VEGF (10ng·ml<sup>-1</sup> y 30ng·ml<sup>-1</sup>) y la aplicación del medio de cultivo para precursores vasculares; finalizando con la aplicación del medio de especialización endotelial.

## 7.4 Inmunocitoquímica

### 7.4.1 Detección de marcadores de pluripotencia

Las CTER, fueron lavadas con PBS (Del Inglés "*Phosphate Buffered Saline*") y fijadas por exposición directa con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente, durante 15 minutos. Consecutivamente la muestra se lavó con PBS y se permeabilizó con una solución de 0.1% de Tritón 100X en DPBS (Del Inglés "*Dubelcco's Phosphate Buffered Saline*") sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  (ATCC), seguido de otro lavado con PBS. Posteriormente se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos con una solución compuesta de 0.1% de Tritón X100 y 0.5% de suero de cabra en DPBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  durante 30 min y un último lavado con PBS. Las CTER, se incubaron a temperatura ambiente de forma independiente con los anticuerpos Oct  $\frac{3}{4}$  conjugado con Alexa Flúor 488 y Nanog conjugado con TRITC durante 1h. Los núcleos celulares se tiñeron con DAPI, para la identificación celular. Las muestras se examinaron con el microscopio de Epifluorescencia Olympus 1X71.

### 7.4.2 Detección de marcadores de precursores vasculares

Los PV en colágeno, se lavaron con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4%, a temperatura ambiente, durante 15 minutos. Consecutivamente la muestra se lavó con PBS y se permeabilizó con 0.1% de Tritón 100X en DPBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ , seguido de otro lavado con PBS. Posteriormente se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos con una solución compuesta de 0.1% de Tritón X100 y 0.5% de suero de cabra en DPBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  durante 30 min y un último lavado con PBS.

Las células fueron incubadas a temperatura ambiente, con los marcadores de precursores vasculares Flk-1 conjugado con PE, y PECAM conjugado con FITC durante 1h (la tinción se realizó por separado); los núcleos celulares se tiñeron con DAPI para la identificación celular. Las muestras se examinaron con en el microscopio de Epifluorescencia Olympus 1X71. Este procedimiento se realizó a las 120h del proceso de diferenciación.



### **7.4.3 Detección de marcadores de células endoteliales especializadas**

Las CEE cultivadas en colágeno fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente, durante 15 minutos. Consecutivamente, la muestra se lavó con PBS y se permeabilizó con 0.1% de Tritón 100X en DPBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ , seguido de otro lavado con PBS. Posteriormente se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos con una solución compuesta de 0.1% de Tritón X100 y 0.5% de Suero de Cabra en DPBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  durante 30 min y un último lavado con PBS. Las células, se incubaron a temperatura ambiente, con los anticuerpos Flk-1 conjugado con PE, PECAM conjugado con FITC y VE-Caderina conjugado con PE, durante 1h (la tinción se realizó por separado); los núcleos celulares se tiñeron con DAPI, para la identificación celular. Las muestras se examinaron mediante el microscopio de Epifluorescencia Olympus 1X71. Este procedimiento se realizó a las a 360h, 600h y 840h del proceso de diferenciación.

### **7.4.4 Cuantificación de la expansión y densidad celular mediante microfotografías**

#### **7.4.4.1 Conteo del área de expansión celular ( $\text{cm}^2$ ) en colágeno tipo 1 y colágeno tipo IV**

El proceso de expansión de los precursores vasculares cultivados en colágeno I y colágeno IV, fue documentado a través de al menos cinco micrografías para cada uno de los tiempos de evaluación del cultivo: 24 h, 48 h, 72 h y 92 h. Con ayuda del software "*Image J*" (disponible en el sitio de internet de NIH), se estimó el área (en  $\text{cm}^2$ ) cubierta por células de acuerdo a tinción con DAPI (núcleos celulares), así como el fenotipo celular, en los diferentes tiempos de evaluación del cultivo.

#### **7.4.4.2 Conteo de la expansión de células pluripotentes y precursores vasculares.**

Una vez que se realizó la detección de marcadores de precursores vasculares por inmunocitoquímica, se adquirieron al menos nueve microfotografías para cada uno de los marcadores: Oct  $\frac{3}{4}$  (para células pluripotentes), Flk-1 y PECAM (para precursores

vasculares) a 120 h consecutivo a la etapa de derivación de precursores. Con ayuda del software “*Image J*”, se estimó el área (en  $\text{cm}^2$ ) cubierta por células positivas para los marcadores mencionados; de la misma manera se calculó el número de células· $\text{cm}^{-2}$ , tomando como referencia el área de una célula teñida con DAPI en comparación al área total cubierta por células en cada uno de los marcadores.

#### **7.4.4.3 Conteo de la expansión de células endoteliales especializadas.**

Una vez que se realizó la detección de marcadores de células endoteliales especializadas por inmunocitoquímica, se adquirieron al menos nueve microfotografías para cada uno de los marcadores: Oct  $3/4$  (para células pluripotentes), Flk-1 y PECAM (para precursores vasculares) y VE- Caderina (para células endoteliales especializadas), para cada uno de los tiempos de evaluación: 360h, 600h y 840h, consecutivos al proceso de especialización. Con ayuda del software “*Image J*”, se estimó el área (en  $\text{cm}^2$ ) cubierta por células positivas para los marcadores mencionados; de la misma manera se calculó el número de células· $\text{cm}^{-2}$ , tomando como referencia el área de una célula en comparación al área total cubierta por células en cada uno de los marcadores.

#### **7.4.5 Citometría de Flujo:**

##### **7.4.5.1 Citometría de flujo para determinar marcadores de pluripotencia**

Las CTER, cultivadas en medio adherente fueron disgregadas con Tripsina 1X para recuperarlas como suspensión unicelular; lavadas con PBS a través de una centrifugación a 1174g durante 4 minutos, posteriormente fueron fijadas con paraformaldehído al 4% a temperatura ambiente, durante 15 minutos; consecutivamente la muestra se lavó por centrifugación con PBS y se permeabilizó con una solución compuesta de 0.1% de Tritón 100X en DPBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ , seguido de otro lavado por centrifugación con PBS. Posteriormente se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos con una solución compuesta de 0.1% de Tritón X100 y 0.5% de suero de cabra en DPBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  durante 30 min y un último lavado por centrifugación con PBS.

Las CTER, se incubaron a temperatura ambiente, con los anticuerpos Oct  $\frac{3}{4}$  conjugado con Alexa Flúor 488 y Nanog conjugado con FITC, durante 1h. Las muestras se examinaron mediante el Citómetro de Flujo GUAVA Easy Cyte 5HT; los resultados fueron analizados con el software INCYTE (Merck Millipore).

#### **7.4.6 Análisis estadístico.**

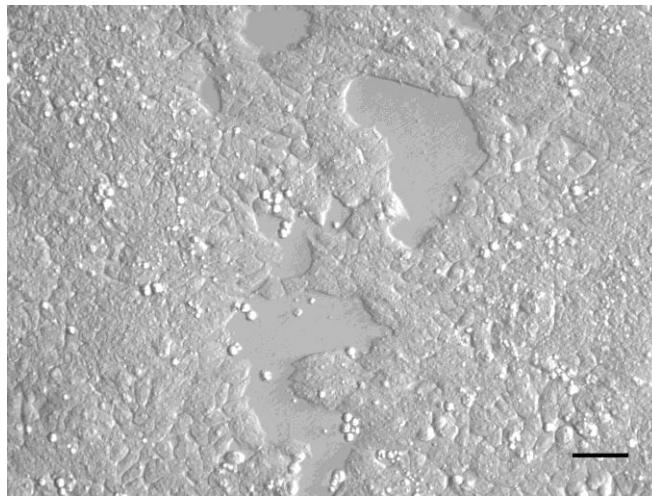
Los resultados obtenidos del conteo del área (en  $\text{cm}^2$ ) de expansión celular en colágeno I y colágeno IV a 24h, 48h, 72h y 92h se presentan como un promedio de al menos tres experimentos con desviaciones estándar. Las diferencias significativas fueron calculadas utilizando una prueba *t* de *student*, considerando un valor de  $p < 0.05$  como significativo.

Los datos obtenidos del conteo del número de células ( $\text{células} \cdot \text{cm}^{-2}$ ), Oct  $\frac{3}{4}$ + (células pluripotentes), Flk-1+, PECAM+ (PV) y VE- Caderina+ (CEE) a 120h, 360h, 600h y 840 se presentaron como un promedio de al menos tres experimentos con desviaciones estándar. Para la comparación entre los marcadores en cada tiempo, las diferencias significativas, fueron calculadas utilizando una prueba *t* de *student*, considerando un valor de  $p < 0.05$  como significativo. Para la comparación de los tiempos, por cada marcador, las diferencias significativas, fueron calculadas mediante ANOVA de un factor con un valor de  $\alpha < 0.05$  como significativo.

## 8 Resultados

### 8.1 Cultivo de Células Troncales Embrionarias de Ratón

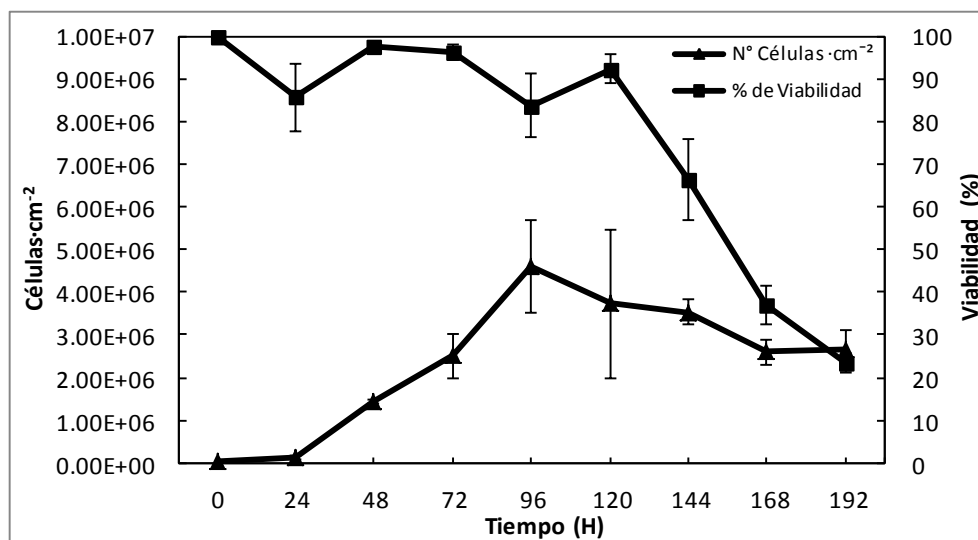
El subcultivo de las Células Troncales Embrionarias de Ratón, se realizó cada 48 horas cuando las células alcanzaron el 70% de confluencia, sin embargo se observó que en pasajes mayores o tardíos las CTER llegaban a una confluencia del 70% en un intervalo menor de tiempo, por lo que fue necesario realizar una dilución mayor durante esos subcultivos (Figura 7).



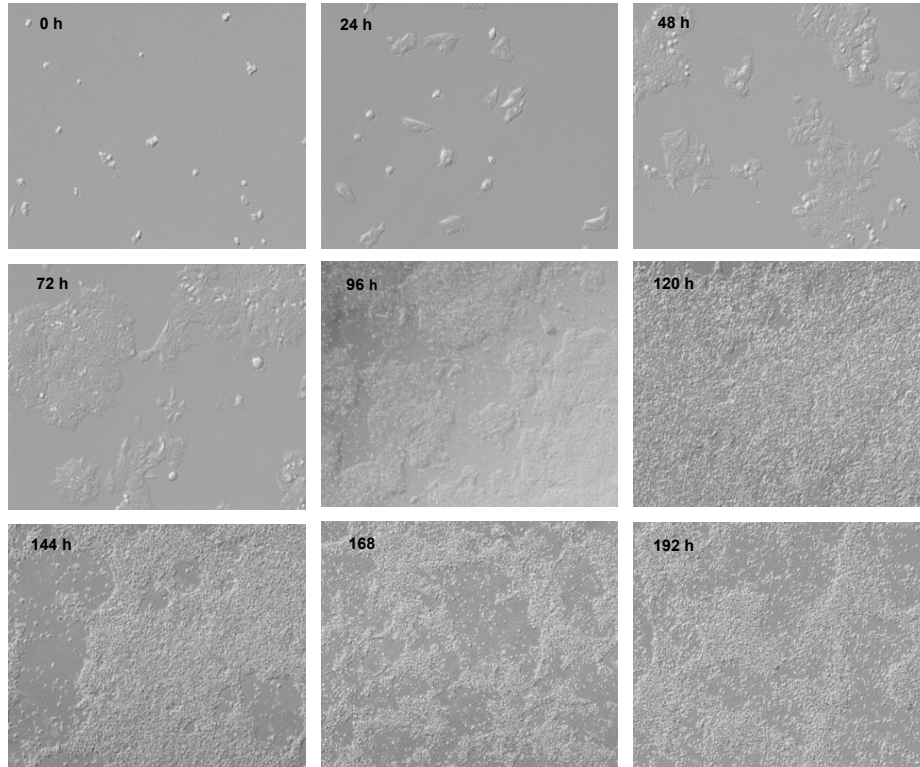
**Figura 7. Micrografía de CTER.** Se observa la formación de la monocapa de CTER al 70% de confluencia, a 48 h de cultivo. Escala 50  $\mu\text{m}$ .

Mediante la cinética de crecimiento (Figura 8), se determinó que el tiempo óptimo para realizar el subcultivo de las CTER, es de las 48 a las 72 h de cultivo, intervalo en donde se observa el 50% de desarrollo exponencial y una mayor viabilidad. Posterior a ese intervalo de tiempo, se observó una rápida muerte celular en la etapa de decaimiento, de las 144h a 192 h como se observa en las figuras 8 y 9.

La viabilidad celular inicial fue el 100 %; de las 24h a las 120h se mantuvo de entre un 90 % y 100%, sin embargo la viabilidad fue disminuyendo notablemente posterior a las 120 h de cultivo, llegando a una viabilidad del 20 % a las 192 h de cultivo (Figura 8 y Figura 9).



**Figura 8. Cinética de proliferación de las CTER.** Se indica el número de células·cm<sup>-2</sup> y la viabilidad celular (%).



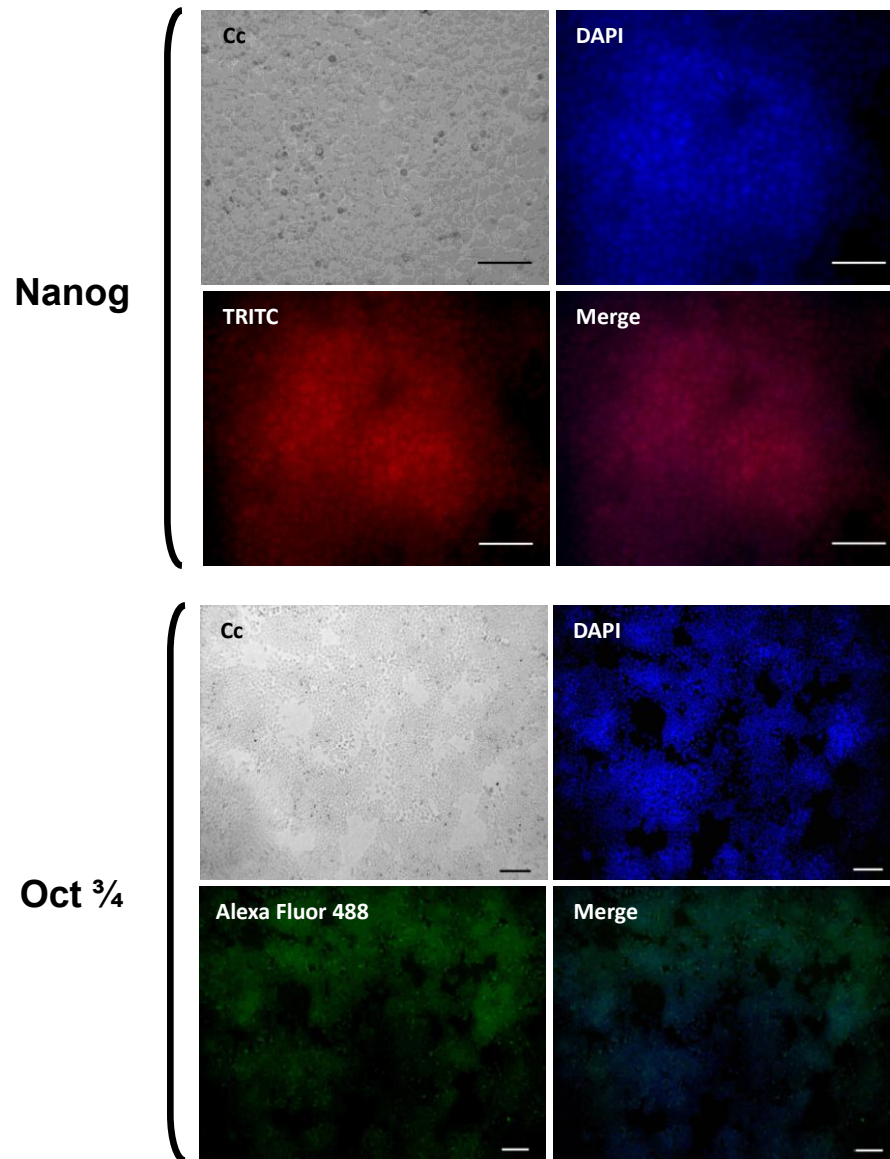
**Figura 9. Micrografías de la cinética de crecimiento de CTER.** Crecimiento de las CTER durante el proceso de expansión celular, de las 0 h a las 192 h, observando una etapa desarrollo exponencial (0-72 h), de mantenimiento (96h-120h) y de decaimiento (144h-192h). Micrografías adquiridas con el objetivo 10X.

Se realizó la cuantificación de la velocidad específica de crecimiento, representada por el símbolo  $\mu$ , así como el tiempo de duplicación celular ( $T_d$ ), a partir de los datos obtenidos en la etapa de crecimiento exponencial (0h- 96h) de la cinética de crecimiento (Tabla 2).

**Tabla 2. Parámetros de comportamiento celular de las CTER.** Valores de Velocidad de Crecimiento y Tiempo de Duplicación celular en base a la etapa exponencial (0h- 96h) de la cinética de proliferación.

Velocidad de Crecimiento Específica	Tiempo de Duplicación
$0.0638 \text{ Células} \cdot \text{h}^{-1}$	10.86 h

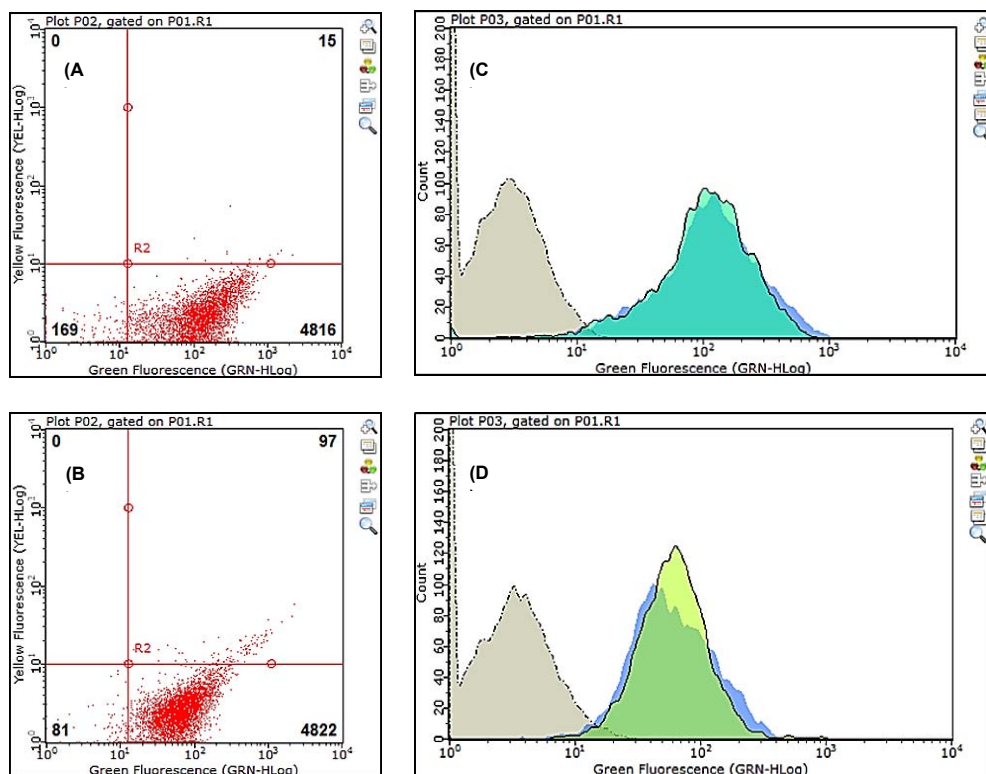
En la inmunocitoquímica de las CTER, se identificaron células positivas para los marcadores de pluripotencia Nanog y Oct  $\frac{3}{4}$ , como se observa en las microfotografías de cultivo en la Figura 10.



**Figura 10. Micrografías de CTER identificadas por inmunofenotipo.** Se observan CTER Nanog- TRITC+ (Rojo), así como CTER Oct  $\frac{3}{4}$ - Alexa Fluor 488+ (Verde). La escala representa 100  $\mu\text{m}$ .

La expresión de los marcadores de pluripotencia fue corroborada por citometría de flujo. Se realizó la adquisición de al menos 5000 eventos o células para cada una de las muestras o repeticiones analizadas. De la primera población, 4816 células fueron positivas para Nanog equivalente a un 93% de células en estado pluripotente. De la segunda población, 4822 células fueron positivas para Oct  $\frac{3}{4}$  equivalente a un 96.5% de células en estado pluripotente (parámetros indicados en la Figura 11: A; B respectivamente).

En los histogramas, se muestra una comparación de las células identificadas con los marcadores Nanog y Oct  $\frac{3}{4}$ , en contraste a las células blanco como control negativo (área bajo la curva indicada en color gris), con lo cual se aseguró las CTER presentaran un estado pluripotente (parámetros indicados en la Figura 11: C; D).



**Figura 11. Citometría de flujo de las CTER.** Identificación de células que expresan los marcadores de pluripotencia Nanog – FITC 488 (A;C) y Oct  $\frac{3}{4}$  -Alexa Flúor 488 (B; D); Para ambos marcadores se observó  $\geq 98\%$  de células pluripotentes.

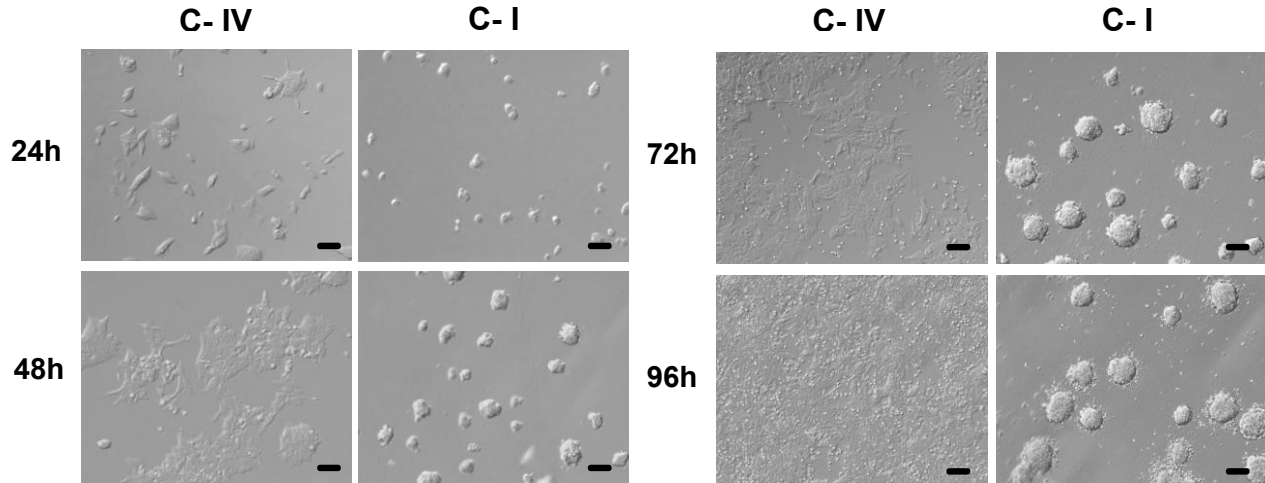


## 8.2 Diferenciación hacia linaje endotelial

### 8.2.1 Derivación de Precursores Vasculares (Etapa Preliminar).

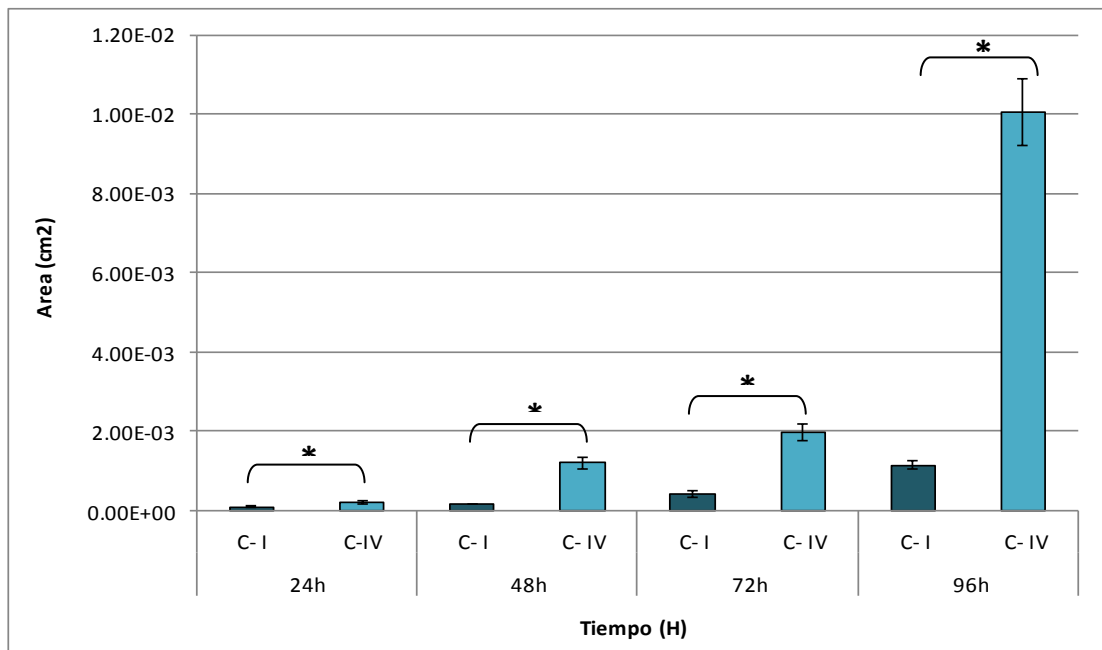
#### 8.2.1.1 Comparación de la diferenciación celular en Colágeno Tipo 1 y Colágeno Tipo IV

Al realizar la comparación de la expansión celular en el colágeno tipo 1 y colágeno tipo IV, se observó una clara diferencia en la morfología celular, en los dos tipos de matriz. En el colágeno tipo I, las colonias celulares, se expandieron en forma de conglomerados, presentando este fenotipo durante todo el proceso de expansión a las 24h, 48h, 72h y 96h, en contraste la expansión celular, en el colágeno tipo IV, en el cual las células se expandieron en una monocapa, observando claramente una mayor expansión conservando el fenotipo durante todo el proceso de expansión a las 24 h, 48 h, 72 h y 96 h (Figura 12).



**Figura 12. Micrografías de precursores vasculares.** Comparación del crecimiento celular en Colágeno IV (C-IV) y Colágeno I (C-I), a 24, 48, 72 y 98 horas. Escala 100µm.

En cuanto al área de expansión, se observó que en el colágeno tipo I, el área cubierta por las colonias celulares fue muy baja, presentando un área de expansión celular de  $8.9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2$  a las 24 h,  $1.6 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$  a las 48 h,  $4.0 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$  a las 72 h y un área de  $1.1 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$  a las 96 h. En cuanto al área de expansión celular observada en el colágeno tipo IV, se observó una cobertura de  $2.1 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$  a las 24 h, un área de  $1.2 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$  a las 48 h, un área de  $1.2 \times 10^{-3} \text{ cm}^2$  a las 72 h y un área de  $1.0 \times 10^{-2} \text{ cm}^2$  a las 92 h, presentando diferencias significativas en la expansión celular ( $p < 0.05$ ), entre los dos tipos de Colágeno en cada uno de los tiempos de medición (Figura 13).



**Figura 13. Área de Precursores.** Comparación del Área de expansión celular ( $\text{cm}^2$ ) en Colágeno I (C- I) y Colágeno IV (C- IV), a 24, 48, 72 y 96h.

### **8.2.1.2 Efecto de la concentración de VEGF en la diferenciación de precursores vasculares.**

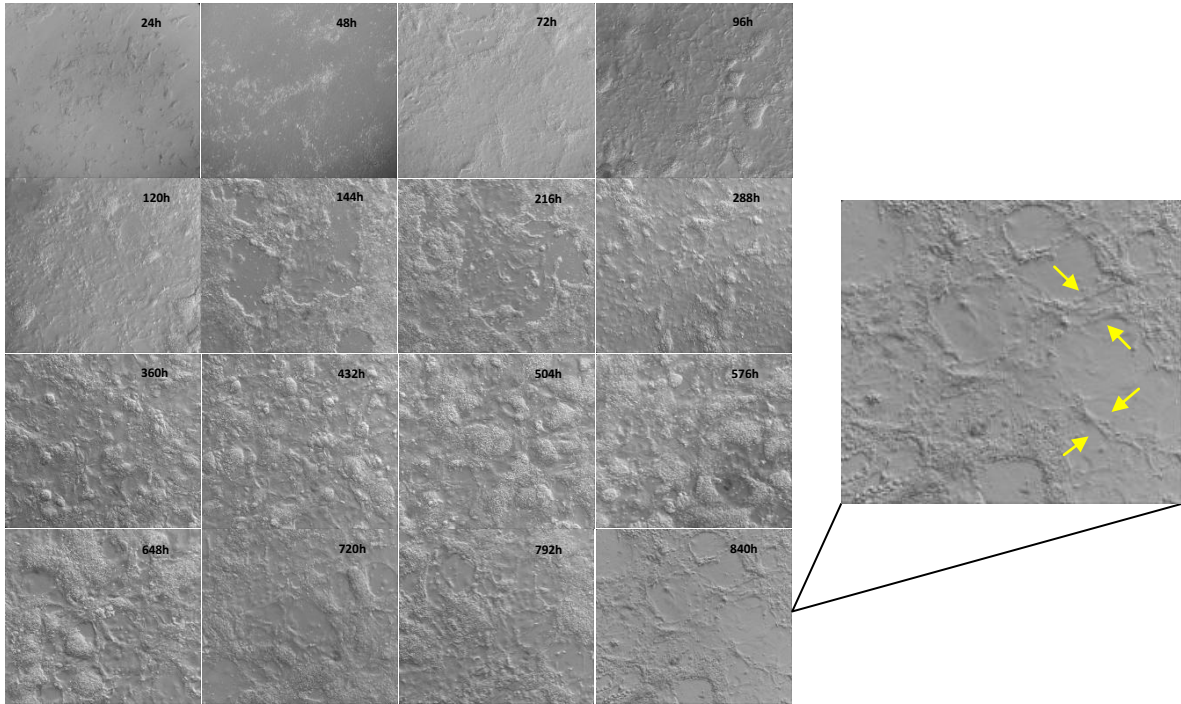
Al realizar la comparación de la expansión celular, en placas de cultivo pretratadas con Colágeno Tipo IV y dos concentraciones de VEGF ( $10\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  y  $30\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ ), se observó que durante las primeras 120h horas en la etapa de generación de precursores, se pudieron presentar algunas diferencias en la expansión celular.

En la inducción de precursores vasculares expuestos a una concentración de  $10\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  de VEGF, la expansión celular fue muy parecida, a la expansión de los precursores endoteliales sometidos a una concentración  $30\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ , a las 24 h, 48 h, 72 h, 92 h y 120 h de cultivo, sin embargo al realizar la sustitución del medio con las dos concentraciones de VEGF, por el medio de especialización endotelial EGM-2, a las 144h la cantidad de células en expansión disminuyó en el cultivo que fue sometido a  $10\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ , en contraste a al cultivo celular sometido a  $30\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  de VEGF.

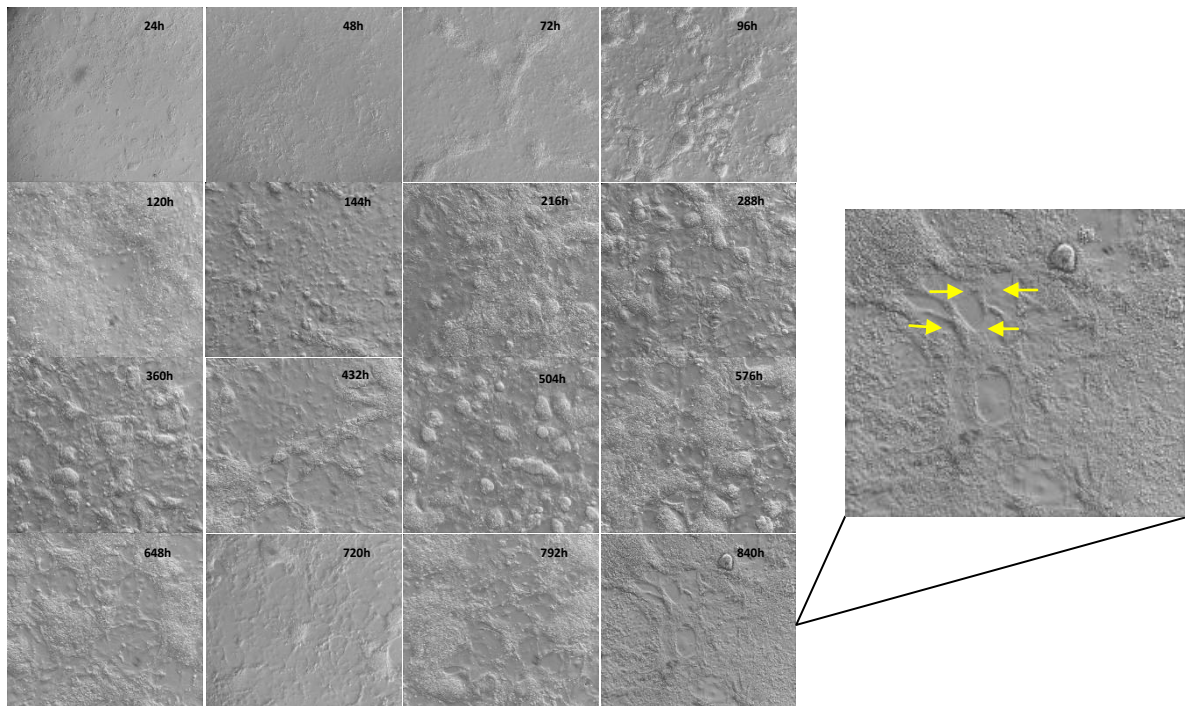
Posteriormente a las 216h aunque la expansión fue aún menor en el cultivo con  $10\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$ , no se observa una diferencia notable en el número de células expuesto a  $30\text{ng}\cdot\text{ml}^{-1}$  de VEGF.

En los tiempos posteriores 288 h, 360 h, 432 h, 504 h, 576 h, 648 h, 720 h, 792 h y 840 h la expansión celular, fue semejante en los cultivos sometidos a las dos concentraciones iniciales de VEGF, por lo que al final del proceso de diferenciación, no afectó el proceso de expansión y diferenciación celular (Figura 13). Al término de ambos procesos de diferenciación se observó las formaciones de un tipo de estructuras vasculares primitivas o rudimentarias, como se observa en los recuadros laterales de la Figura 14.

**VEGF 10ng·ml<sup>-1</sup>**



**VEGF 30ng·ml<sup>-1</sup>**



**Figura 14. Células Progenitoras con VEGF a diferentes concentraciones.** Comparación de la expansión de Precusores Vasculares con VEGF a 10ng·ml<sup>-1</sup> y 30ng·ml<sup>-1</sup>, a las 24h, 48h, 72h, 92h, 120h, 144h, 216h, 288h, 360h, 432h, 504h, 576h, 648h, 720h, 792h y 840h del proceso de diferenciación. 10X. En los recuadros laterales de presenta una ampliación de las microfotografías a 840 h de los procesos de diferenciación, indicando la formación de estructuras vasculares rudimentarias.

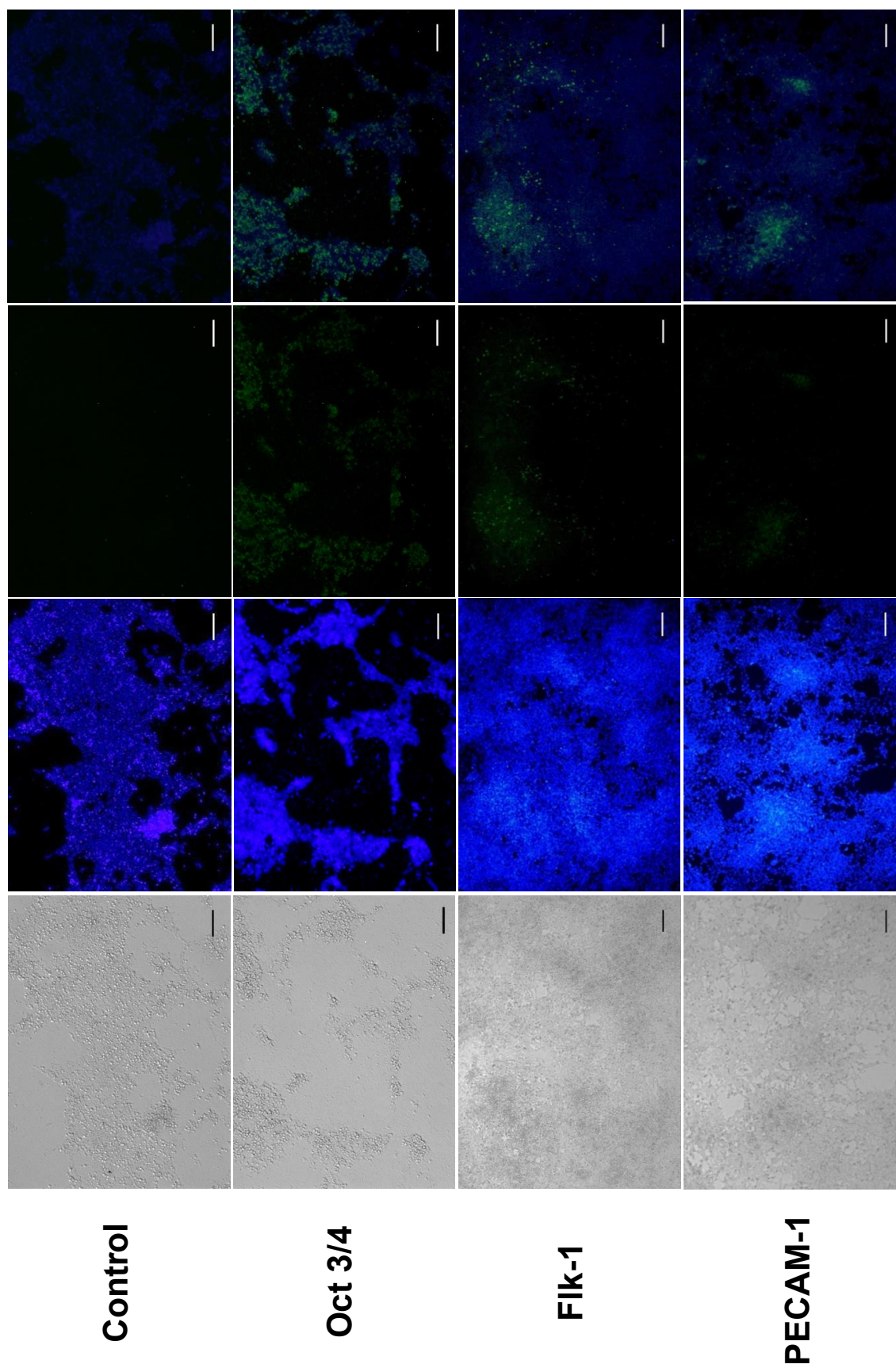
## 8.2.2 Derivación de Precursores Vasculares

Para analizar un seguimiento del proceso de diferenciación hacia precursores vasculares y células endoteliales especializadas, se adquirieron diferentes microfotografías para la detección de los siguientes marcadores por inmunocitoquímica: Oct  $\frac{3}{4}$  (células pluripotentes) Flk-1 y PECAM (precursores vasculares) y VE- Caderina (células endoteliales especializadas), por lo que los resultados de éste procedimiento mencionado, se presentan en los apartados posteriores.

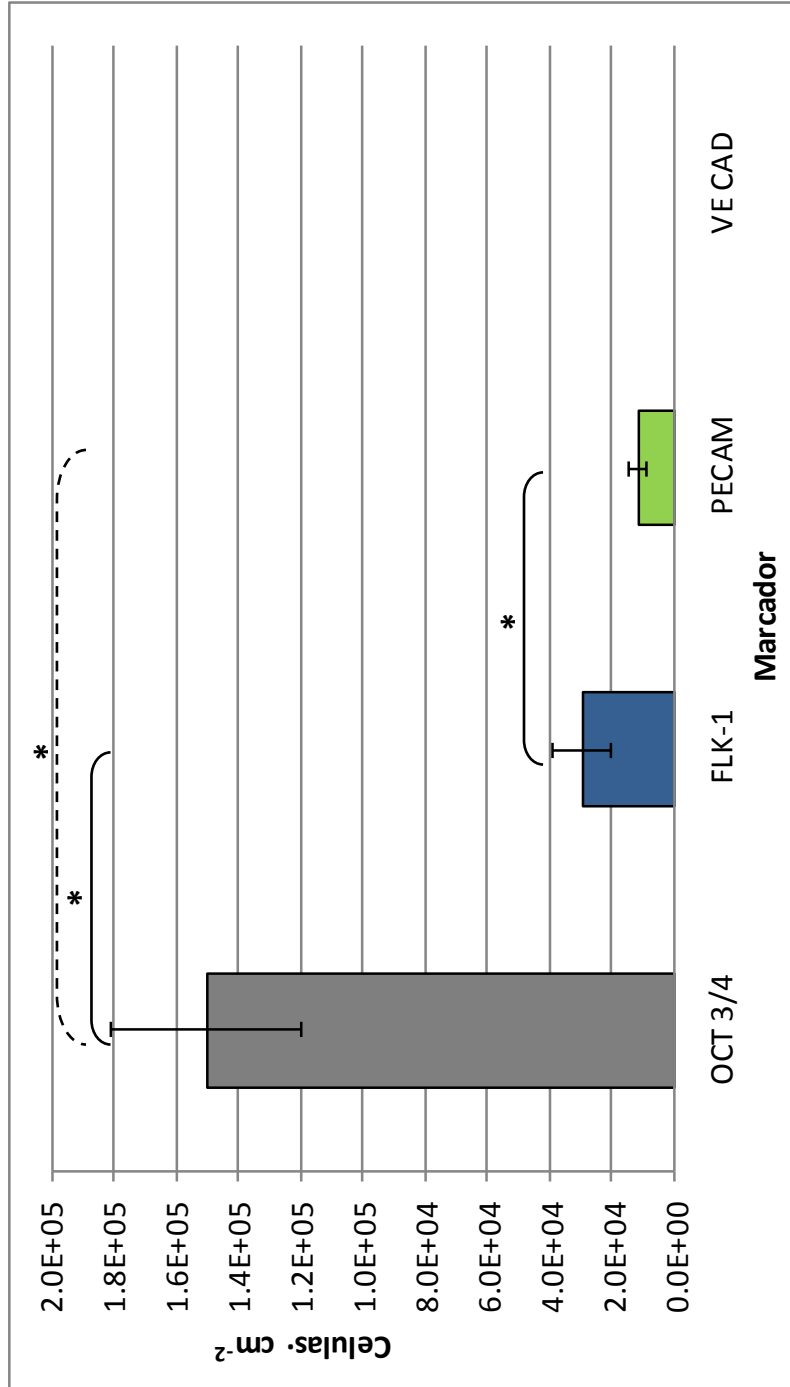
### 8.2.2.1 Derivación Endotelial a 120h del Proceso de Diferenciación

Al término de la etapa de derivación de células precursoras a las 120h del proceso de diferenciación endotelial, se detectaron diferentes inmunofenotipos para células pluripotentes (Oct  $\frac{3}{4}$ +) y precursores vasculares (Flk-1+ y PECAM+). Se detectó una cantidad importante de células pluripotentes al haber expresado el marcador Oct  $\frac{3}{4}$ , siendo la superficie marcada por células Oct  $\frac{3}{4}$ , semejante a la superficie total de células marcadas con DAPI; en este punto se obtuvieron también células Flk-1+ y PECAM+, por lo que se determinó que ya se encontraban precursores vasculares en esta etapa, como se muestran en las microfotografías. Se observó que la superficie cubierta por células Flk-1+, fue mucho menor que la superficie total de células marcadas con DAPI, al igual que la superficie cubierta por células PECAM+ que de la misma manera, fue menor que la superficie total de células marcadas con DAPI; mientras que el control negativo no presentó fluorescencia intrínseca (Figura 15).

Al realizar la cuantificación de Número de Células  $\cdot \text{cm}^{-2}$  (Figura 16), se encontró que al término de la etapa de generación de precursores, a las 120h, del proceso de diferenciación, el Número de Células Oct  $\frac{3}{4}$  (1.5x10<sup>5</sup> células  $\cdot \text{cm}^{-2}$ ), fue mayor como se observó en las micrografías, que el número de precursores vasculares, sin embargo el número de células Flk-1+ (2.91x10<sup>4</sup> células  $\cdot \text{cm}^{-2}$ ) fue también mayor que el número células PECAM+ (1.1x10<sup>4</sup> células  $\cdot \text{cm}^{-2}$ ), por lo que se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre cada uno de los marcadores en este punto del proceso de diferenciación.



**Figura 15. Micrografías de Células identificadas por inmuno-ensayo. Identificación de células, con los marcadores Oct 3/4- Alexa Flúor 488, Flk-1-PE, PECAM-FITC, y el control negativo, a 120 horas, durante el proceso de diferenciación celular. 100µm.**



**Figura 16. Cantidad de Células Identificadas en los inmuno ensayos. Número de Células · cm<sup>2</sup> Oct 3/4 +, Flk-1 + y PECAM+ A 120h del Proceso de Diferenciación. Diferencias significativas (\*).**

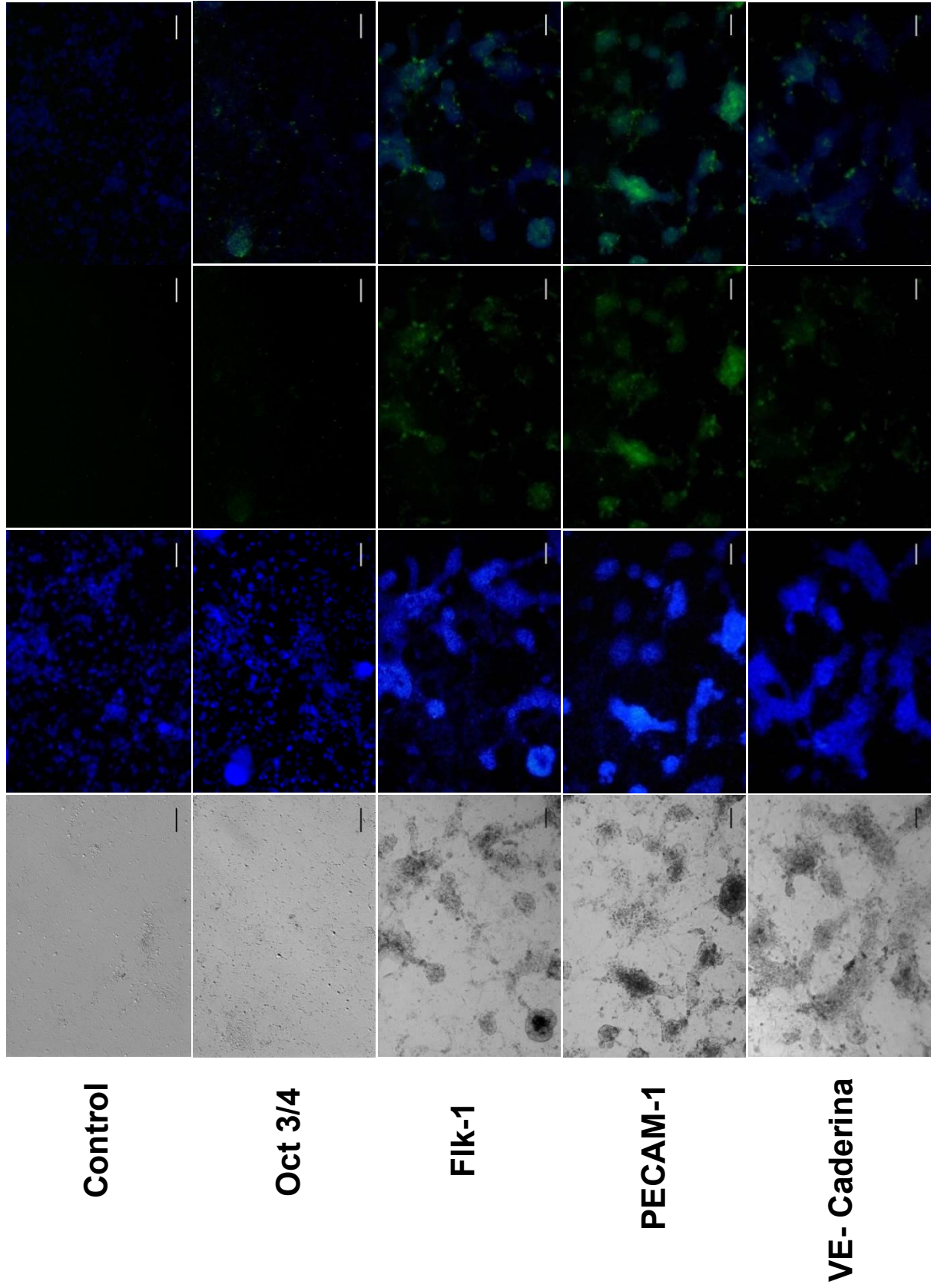
## 8.2.3 Derivación de Células Endoteliales Especializadas

### 8.2.3.1 Derivación Endotelial a 360h del Proceso de Diferenciación Endotelial

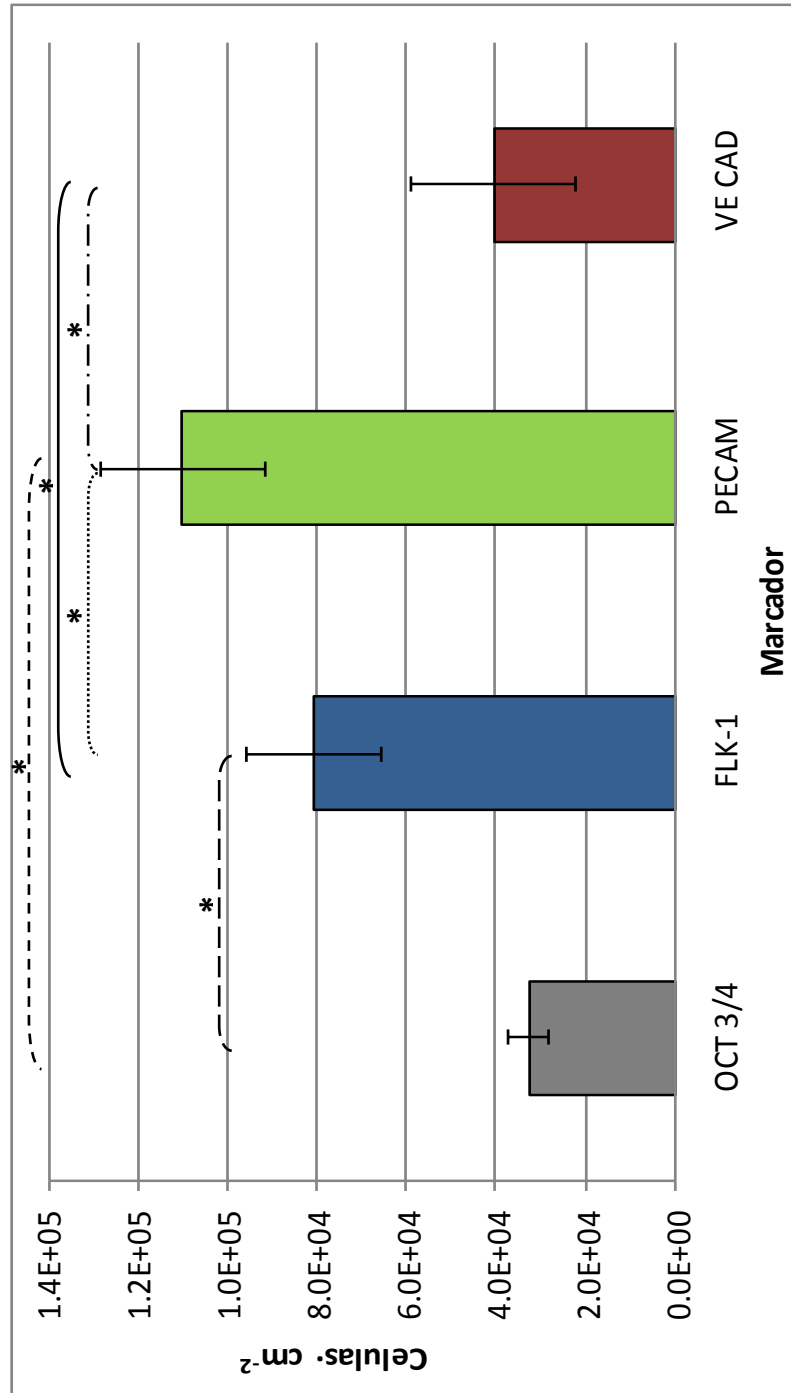
Al término de la primera etapa de derivación de células endoteliales especializadas a 360h del proceso de diferenciación endotelial, se identificaron los inmunofenotipos para células pluripotentes (Oct  $\frac{3}{4}$ +), precursores vasculares (Flk-1+ y PECAM+) y células endoteliales especializadas (VE- Caderina+). Se obtuvo una baja presencia de células Oct  $\frac{3}{4}$  +, encontrando aún en esta etapa células pluripotentes, no obstante también se obtuvieron células Flk-1+, PECAM+ y VE- Caderina+ encontrando precursores endoteliales y células endoteliales especializadas ya en esta etapa, observando que la superficie cubierta por células Oct  $\frac{3}{4}$  + ya en este momento del proceso de diferenciación, fue mucho menor que la superficie total de células marcadas con DAPI, en contraste a la superficie de células Flk-1+ y PECAM+, que aunque fue menor que la superficie total de células marcadas con DAPI, ésta fue muy similar, para ambos marcadores; en cuanto a la superficie cubierta por células VE- Caderina+, ésta fue mucho menor que la superficie total de células marcadas con DAPI; no obstante el control negativo, no presentó fluorescencia intrínseca (Figura 17).

En la cuantificación del número de células·cm<sup>2</sup> al término de la primera etapa de la especialización endotelial a las 360h (Figura 18), se encontró que el número de células Oct  $\frac{3}{4}$ + ( $3.3 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>), disminuyó, en comparación al número de células Flk-1+ ( $8.1 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>) y PECAM+ ( $1.1 \times 10^5$  células·cm<sup>-2</sup>), sin embargo el número de células VE- Caderina+ ( $4.0 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>), fue menor que las anteriores, por lo que en este punto del proceso de diferenciación se presentaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el número de células positivas de cada uno de los marcadores, excepto entre las células Oct  $\frac{3}{4}$ + y VE- Caderina+.





**Figura 17. Micrografías de Células identificadas por inmuno-ensayo.** Identificación de células, con los marcadores Oct <sup>3/4</sup>- Alexa Fluóor 488, Flk-1-PE, PECAM-FITC, y el control negativo, a 360 horas, durante el proceso de diferenciación celular. 100µm.

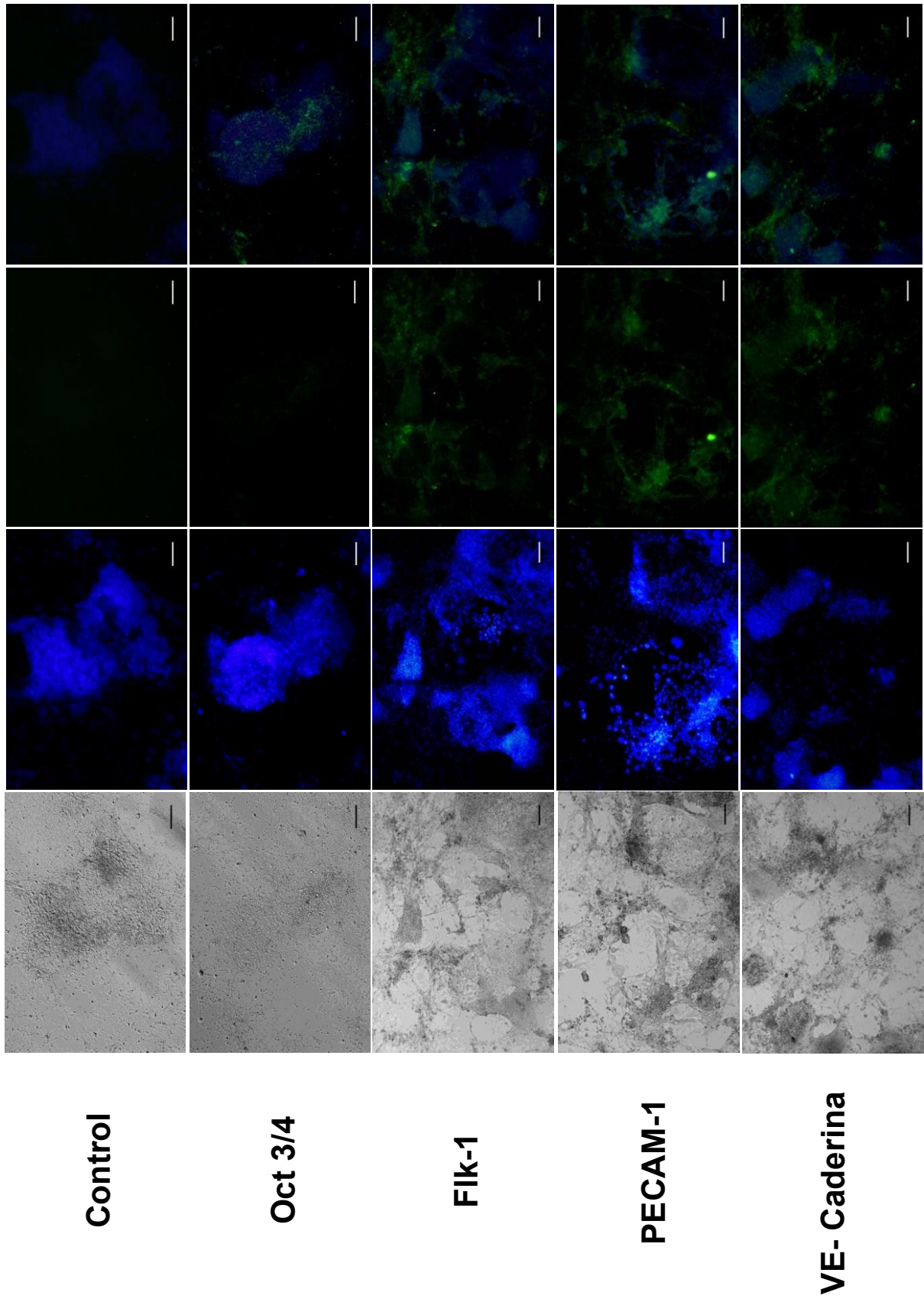


**Figura 18. Cantidad de Células Identificadas en los inmuno ensayos. Número de Células · cm<sup>-2</sup> Oct 3/4 +, Flk-1 + y PECAM+ a 360h del Proceso de Diferenciación. Diferencias significativas (\*).**

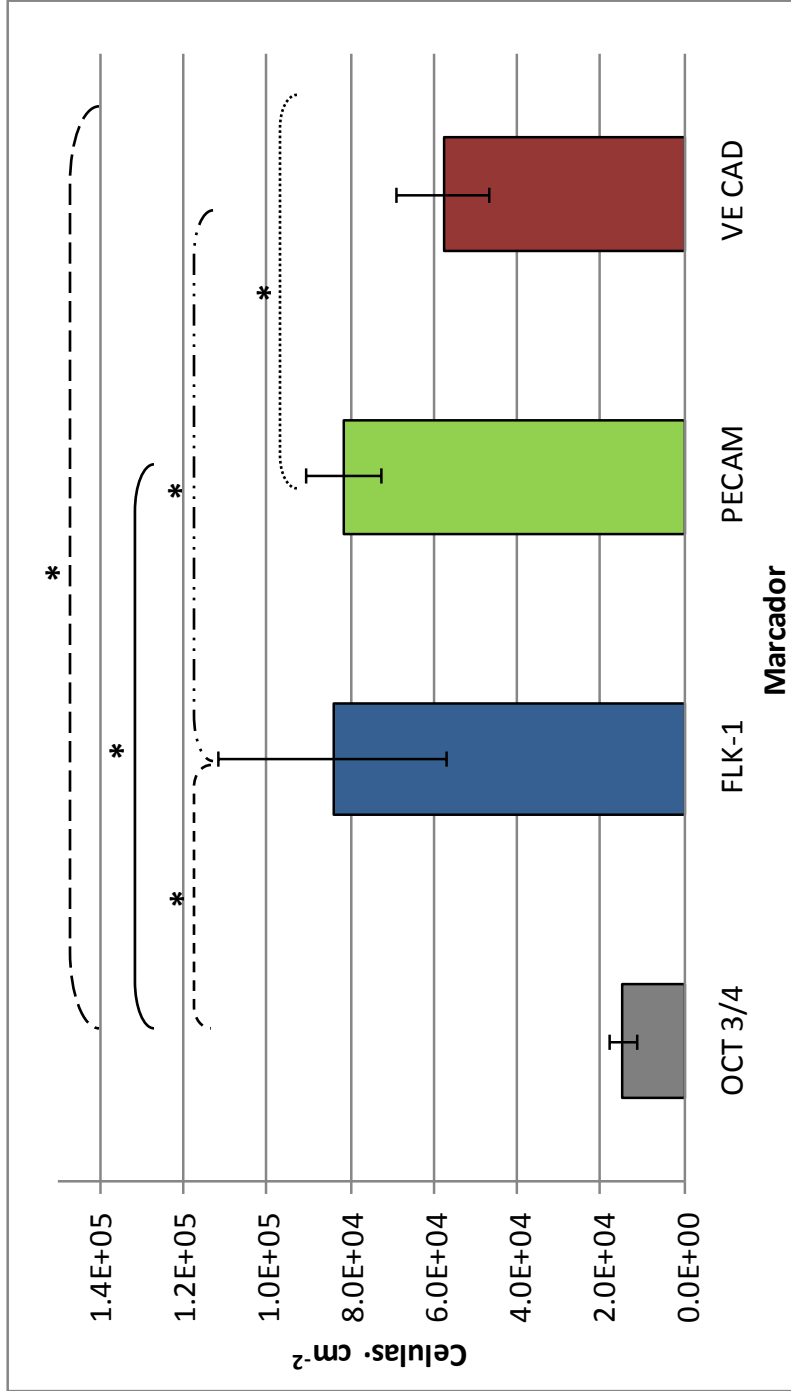
### 8.2.3.2 Derivación Endotelial a 600h del Proceso de Diferenciación Endotelial

Al término de la etapa media del proceso de derivación de células endoteliales a 600h del proceso de diferenciación, se detectaron los inmunofenotipos para células pluripotentes (Oct  $3/4+$ ), precursores vasculares (Flk-1+ y PECAM+) y células endoteliales especializadas (VE- Caderina+). Se encontró que en éste punto de la diferenciación, la superficie cubierta por células Oct  $3/4+$ , ya era muy baja, respecto al área total de células teñidas con DAPI, de manera contrastante, la superficie de células Flk-1+ y PECAM+, fue similar a la superficie total de células marcadas con DAPI, al igual que la superficie cubierta por células VE- Caderina+, que, fue similar a la superficie total de células marcadas con DAPI; mientras que el control negativo no presentó fluorescencia intrínseca (Figura 19).

En la cuantificación del número de células·cm<sup>2</sup>, a 600h del proceso de diferenciación (Figura 20), se encontró que el número de células Oct  $3/4+$  ( $1.5 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>) disminuyó, mientras que Flk-1+ ( $8.4 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>) se mantuvo similar al muestreo previo; no se detectaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), respecto al número de células PECAM+ ( $8.2 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>), , manteniendo una cantidad muy semejante de precursores endoteliales en este punto. Por otro lado, el valor de células VE- Caderina+ ( $5.8 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>), aumentó, presentando diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), respecto a los dos marcadores de precursores endoteliales, en este punto de diferenciación.



**Figura 19. Micrografías de Células identificadas por inmuno-ensayo.** Identificación de células, con los marcadores Oct 3/4- Alexa Fluor 488, Flk-1-PE, PECAM-FITC, y el control negativo, a 600 horas, durante el proceso de diferenciación celular. 100µm.

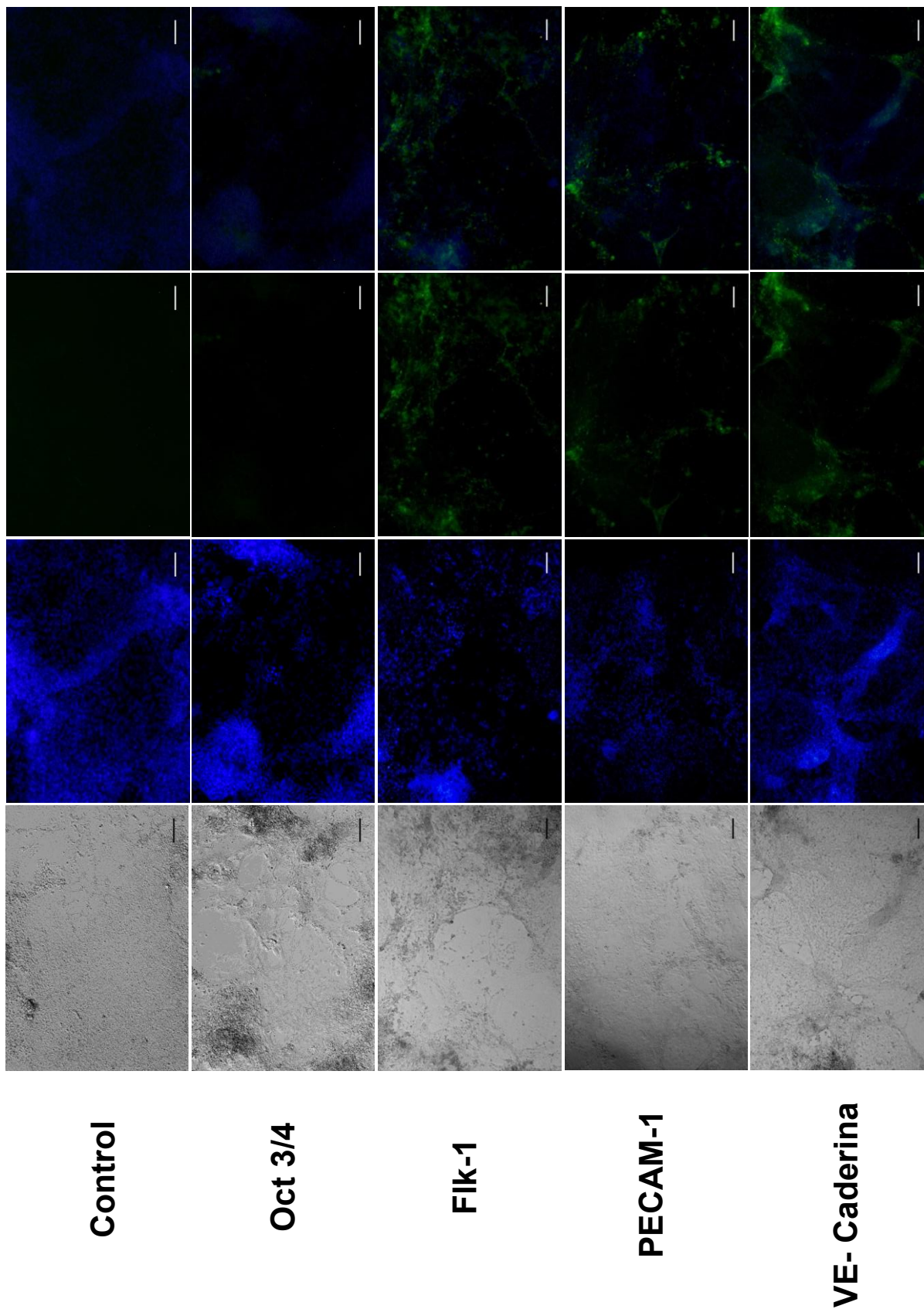


**Figura 20. Cantidad de Células Identificadas en los inmuno ensayos. Número de Células·cm<sup>-2</sup> Oct 3/4 +, Flk-1 + y PECAM+ A 600h del Proceso de Diferenciación. Diferencias significativas (\*).**

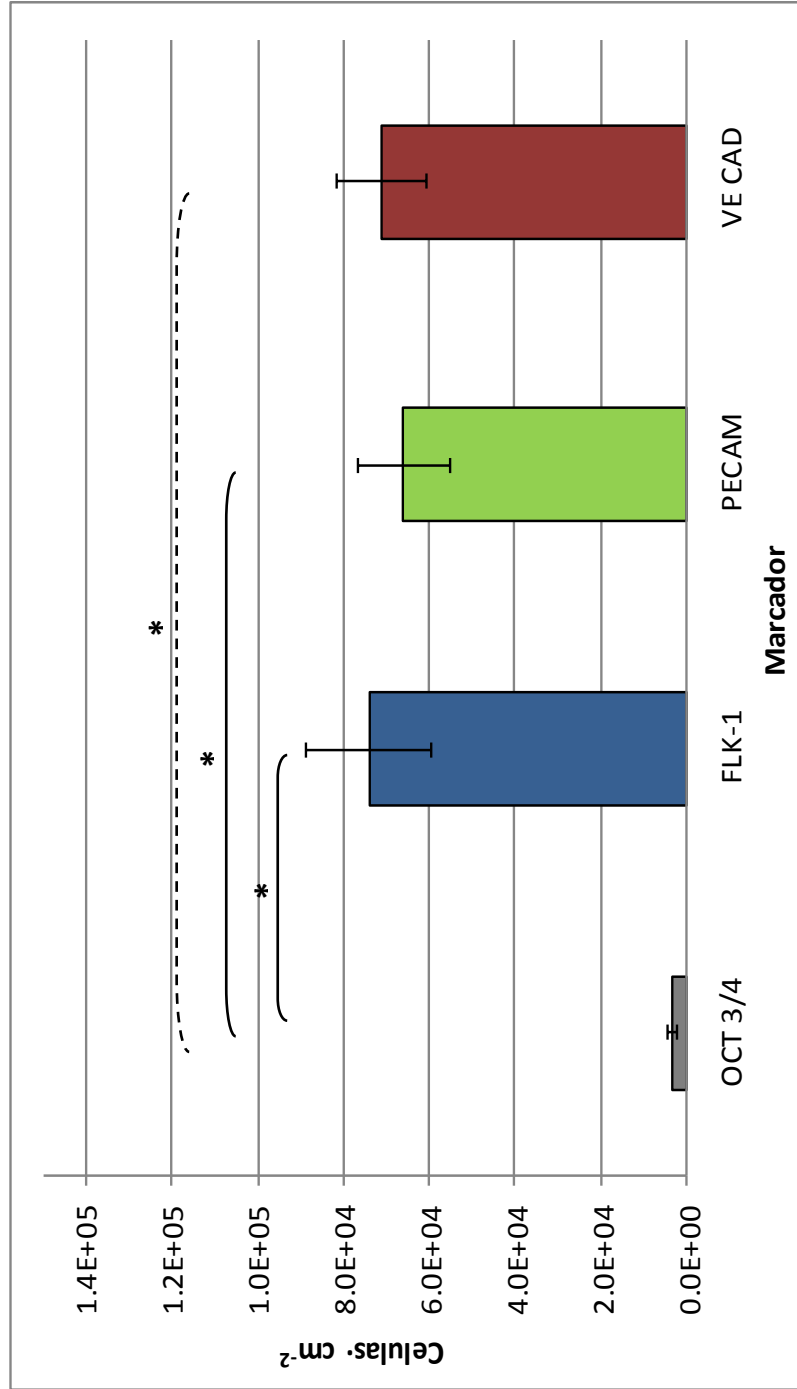
### 8.2.3.3 Derivación Endotelial a 840h del Proceso de Diferenciación Endotelial

Al concluir la última etapa del proceso de derivación de células endoteliales a 840h del proceso de diferenciación; se identificaron los inmunofenotipos para células pluripotentes (Oct  $3/4+$ ), precursores vasculares (Flk-1+ y PECAM+) y células endoteliales especializadas (VE- Caderina+) + (Figura 20). Se observó que la superficie cubierta por células Oct  $3/4+$ , fue prácticamente nula respecto al área total cubierta por células marcadas con DAPI, sin embargo la superficie de células Flk-1+ y PECAM+, también fue menor en comparación a la superficie de total de células teñidas con DAPI, para ambos marcadores. Por otro lado el área de células VE- Caderina+, presentó un área de cobertura muy similar al área de células marcadas con DAPI; mientras que el control negativo no presentó fluorescencia intrínseca (Figura 21).

En la cuantificación del número de células·cm<sup>2</sup> a las 840h del proceso de diferenciación (Figura 22), se determinó un total de  $3.4 \times 10^3$  células·cm<sup>-2</sup> Oct  $3/4+$ , presentando diferencias significativas respecto a los tres marcadores endoteliales, el número de células Flk-1+ ( $7.4 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>) y PECAM+ ( $6.6 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>) mientras que se observó una mayor cantidad de células VE- Caderina+ ( $7.1 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>), por lo que se corroboró lo observado en las micrografías, al encontrar una mayor cantidad de células endoteliales maduras en este punto final del proceso de diferenciación, sin embargo no se presentaron diferencias significativas entre ninguno de éstos tres últimos marcadores.



**Figura 21. Micrografías de Células identificadas por inmuno-ensayo.** Identificación de células, con los marcadores Oct <sup>3/4</sup>- Alexa Flúor 488, Fik-1-PE, PECAM-FITC, y el control negativo, durante el proceso de diferenciación celular. 100µm.



**Figura 22. Cantidad de Células Identificadas en los inmuno ensayos. Número de Células · cm<sup>-2</sup> Oct 3/4 +, Flk-1 + y PECAM+ A 840h del Proceso de Diferenciación. Diferencias significativas (\*).**



#### 8.2.3.4 Dinámica de poblaciones celulares durante el proceso de diferenciación endotelial.

Se realizó una comparación de la expresión de los diferentes marcadores celulares (Figura 23). Se observó que a las 120h (posterior el proceso de generación de precursores endoteliales), el número de células pluripotentes (Oct  $3/4+$ ) fue de  $1.5 \times 10^5$  células·cm<sup>-2</sup>, sin embargo a las 360h su cantidad disminuyó notablemente a  $3.3 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>. A 600 h  $1.5 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup> pluripotentes, también se presentaron cambios respecto al intervalo anterior observando una cantidad de  $3.4 \times 10^3$  células·cm<sup>-2</sup> a 840 h. Se observaron diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha < 0.05$ ) entre los cuatro tiempos, obteniendo un valor crítico para F de 2.9 y una F calculada de 159.9.

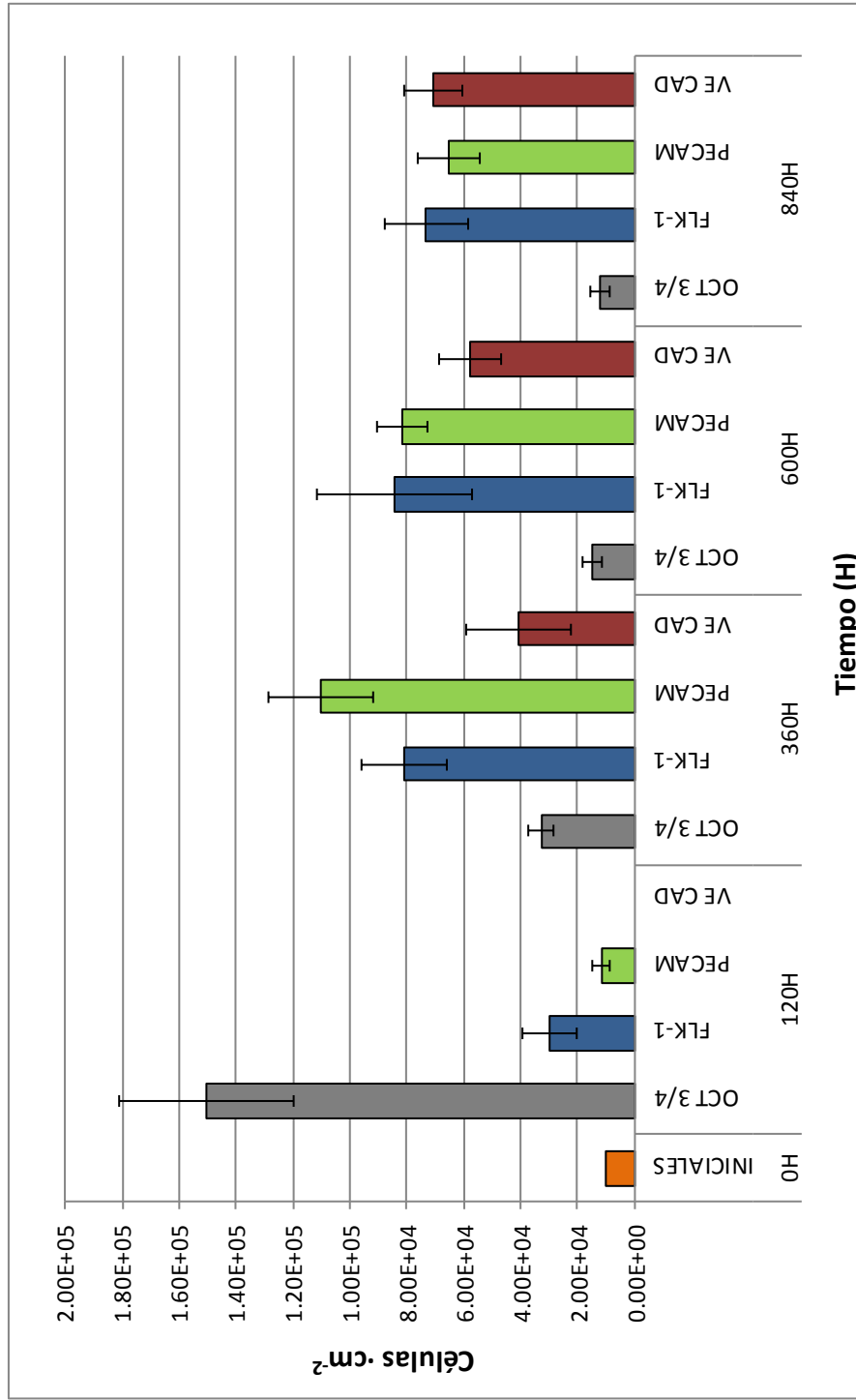
Para los precursores vasculares (células Flk-1+), inicialmente el número fue reducido a las 120 h con  $2.3 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>, ésta cantidad aumentó a las 360h, con  $8.1 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>. Posteriormente a las 600h se obtuvo un total de  $8.4 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup> y a las 840 h se detectó una cantidad de  $7.4 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup> menor respecto al tiempo anterior. Hubo diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha < 0.05$ ) entre los cuatro tiempos, encontrando un valor crítico para F de 2.9 y una F calculada de 14.32.

La cantidad de precursores vasculares (células PECAM+), al principio fue relativamente bajo a las 120h de cultivo con  $1.1 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>, sin embargo ésta cantidad de precursores vasculares aumentó a 360 h con  $1.1 \times 10^5$  células·cm<sup>-2</sup>. Posteriormente a las 600 h se encontró una cantidad de  $8.176 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup> y a las 840 h se encontró una cantidad de  $6.601 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>, con lo que aumentó en relación al tiempo anterior. Hubo diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha < 0.05$ ) entre los cuatro tiempos, observando un valor crítico para F de 2.9 y una F calculada de 72.3.

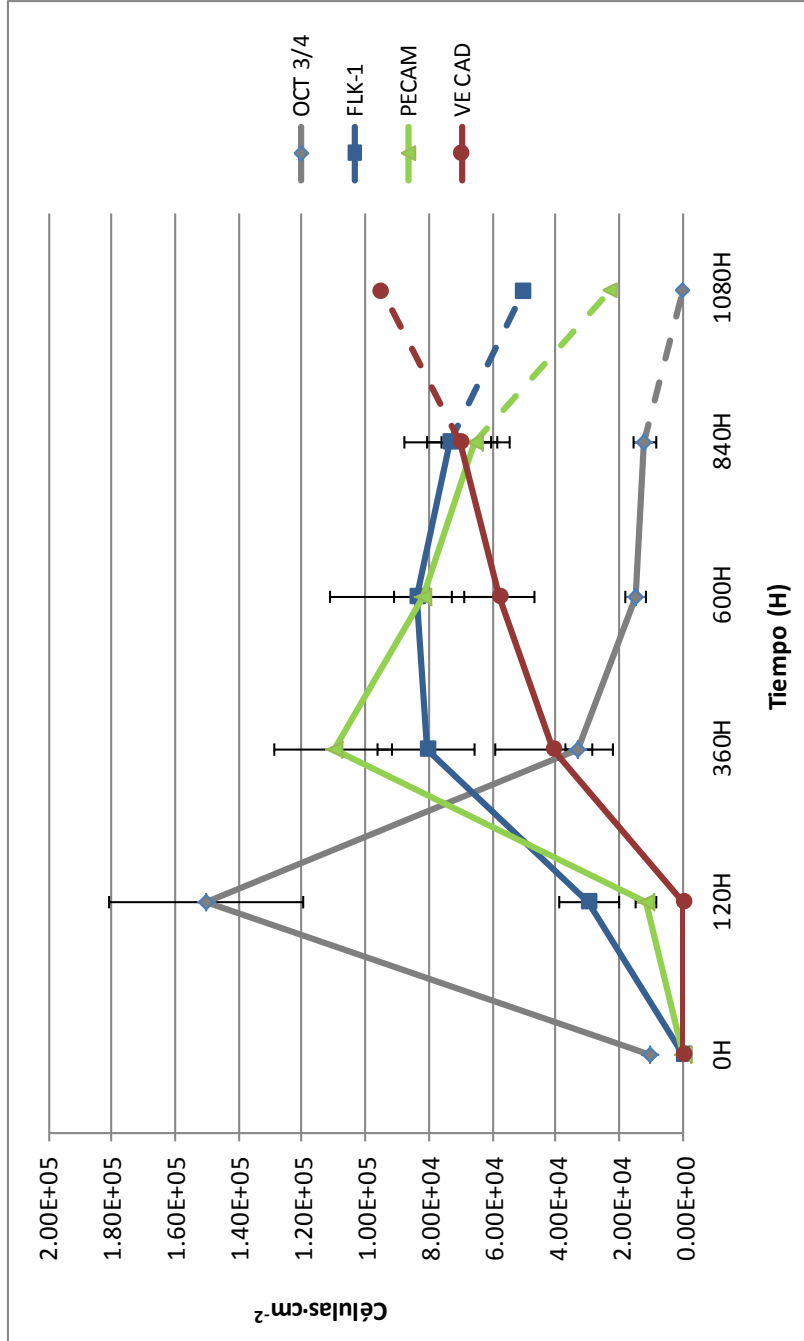
En cuanto al número de células endoteliales especializadas (células VE- Caderina+), no se detectó a 120h, sin embargo para las 360h del proceso de diferenciación se encontró una cantidad de  $4.1 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>.

El número de células aumentó de forma gradual a las 600h con  $5.8 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup> y consecuentemente a las 840h con  $7.1 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>. Se hallaron diferencias estadísticamente significativas ( $\alpha < 0.05$ ) en los tres tiempos, encontrando un valor crítico para F de 3.4 y una F calculada para F de 6.5.

A partir de las 360 h de cultivo, se observó que a lo largo del proceso de diferenciación, la expresión del marcador de pluripotencia (Oct <sup>3</sup>/<sub>4</sub>) y los marcadores de células precursoras vasculares (Flk-1 y PECAM) fue disminuyendo, mientras que la expresión del marcador de células endoteliales maduras o especializadas (VE- Caderina) fue aumentando. Se realizó una comparación entre las 0 h y las 840 h de cultivo con los datos obtenidos. A partir del número de células·cm<sup>-2</sup> de cada marcador, se realizó una extrapolación de las 840 h a 1080 h de un posible proceso de diferenciación extendido (Figura 24). Como se mencionó anteriormente, se observó un recambio en la expresión de cada uno de los marcadores, encontrando que en las primeras 120 h existían principalmente células pluripotentes (Oct <sup>3</sup>/<sub>4</sub> +), detectando un mayor número de células Flk-1+ y PECAM+ de las 360 h a las 600 h con respecto al marcador de pluripotencia, hallando consecutivamente un mayor número de células VE- Caderina+ respecto a la cantidad de Células Flk-1+ y PECAM+.



**Figura 23. Comparación de marcadores en los diferentes tiempos.** Número de Células·cm<sup>2</sup> Oct 3/4 +, Flk-1 + PECAM+ y VE- Caderina+ a 120h, 360h, 600h y 840h del proceso de diferenciación.



**Figura 24. Comparación lineal de marcadores en los diferentes tiempos.** Número de Células·cm<sup>-2</sup> Oct <sup>3</sup>/<sub>4</sub> +, Flk-1 + PECAM+ y VE- Caderina+ a 120h, 360h, 600h, 840h y 1080h, en una representación lineal de un posible proceso de diferenciación extendido.

## 9 Discusión

Durante el cultivo y cinética de proliferación de las CTER se determinó la capacidad de expansión de éstas células. Posterior a las 96h de la cinética de proliferación el número de CTER·cm<sup>-2</sup> fue disminuyendo al igual que su viabilidad, quizá porque al generar una población relativamente grande, éstas fueron agotando los espacios superficiales y consecuentemente los nutrientes del medio de cultivo, generando los suficientes metabolitos tóxicos, como lactatos y amonio, lo cual se apoya en el cambio de pH del medio de cultivo, pues se observó un cambio de color rojo (perteneciente al rojo de fenol) a color amarillo (pH ácido) , lo cual pudo haber provocado la muerte celular al transcurrir los siguientes días de cultivo tal como lo han reportado previamente (Fernandes y *co/s.*, 2010), disminuyendo así el número de células y su viabilidad, sin embargo sería necesario realizar otras pruebas, para determinar el efecto preciso de estos metabolitos, sobre la expansión de las CTER.

La identificación de la expresión de Nanog y Oct 3/4 en las CTER, mediante inmunocitoquímica y citometría de flujo confirmó su estado pluripotente y su capacidad de derivar a cualquier linaje de las 3 capas embrionarias. En el 2006 Loh y *co/s.*, reportaron que la capacidad de auto renovación de las CTER regulada por Oct 3/4 y Nanog está completamente relacionada con la unión de estos factores al gen Myc el cual es un mediador clave en el mantenimiento de la capacidad de auto renovación y la proliferación celular de éstas células, al participar en el arresto del ciclo celular, prescindiendo de la fase G0 o de latencia, por lo que las células entran en un constante estado de división celular; consecuentemente este gen es clave para la activación de la glucólisis, con el fin de proporcionar energía durante todo el ciclo celular, además de inducir la transcripción de otros genes que intervienen en el crecimiento y la proliferación celular, inhibiendo la apoptosis (Dang y *co/s.*, 2006; Zeller y *co/s.*, 2006).

Durante el proceso de diferenciación, se identificó que la morfología de las colonias celulares fue muy diferente al utilizar, colágeno tipo I y tipo IV. Esto se debe principalmente a que este último colágeno es sintetizado fundamentalmente como un tipo de matriz extracelular por células endoteliales tanto de estructuras macrovasculares, así como de estructuras microvasculares, sintetizando en menor proporción colágeno tipo I y colágeno tipo III (Howard y cols., 1976).

Por otro lado se ha demostrado, que el colágeno I y III al ser sintetizados, se depositan principalmente en zonas intersticiales, por lo que no es una proteína constitutiva de membrana basal; lo cual influyó en la morfología y expansión de las células cultivadas en esta matriz, derivando en un crecimiento en un tipo de conglomerados celulares, mientras que el colágeno IV y al depositarse en regiones de lámina basal del endotelio vascular, funcionó como una matriz extracelular óptima para la expansión de los PV en monocapa. Por esta razón el cultivo en este tipo de colágeno (IV) permitió una mayor expansión in vitro infiriendo que este mismo proceso, podría ocurrir en eventos in vivo (Kramer y cols., 1984; Sage y cols., 1981).

La expansión celular en colágeno tipo IV fue mucho mayor desde las primeras 24 h de cultivo. Esto puede ser debido principalmente a que el colágeno IV incrementa la proliferación celular, además participa en la reparación del endotelio dañado, a través de su relación con el óxido nítrico; el cual a su vez produce un efecto pro angiogénico, por lo que esta proteína influye en la formación de estructuras vasculares, contribuyendo al proceso de angiogénesis (Wang y Su., 2011).

En cuanto a la comparación de dos concentraciones del VEGF durante la diferenciación endotelial, se observó que posterior a la etapa de precursores, ocurrió una pérdida de células que formaban la monocapa; posiblemente debido al cambio de componentes o nutrientes además de la de la concentración del VEGF en el medio de especialización endotelial. Sin embargo en las horas subsecuentes de cultivo, se observó que la monocapa fue repoblada y al final del proceso de diferenciación se observaban estructuras microvasculares, o un tipo de microvasos primitivos, en los cultivos sometidos a ambas concentraciones; esto ha sido reportado con resultados similares en otras investigaciones realizadas (Kim y cols., 2008).

Otros autores han reportado que es necesario agregar entre 1 a 10 ng·ml<sup>-1</sup> de VEGF para inducir a un mayor número de células Flk-1+, además de impulsar a una alta proliferación celular y que a mayores concentraciones de VEGF (50 ng·ml<sup>-1</sup>), se observan células agrupadas, con morfología elongada formando un tipo de ramificaciones (Hirashima y cols., 1999).

Aunque al final del proceso, como se mencionó anteriormente se obtuvieron estructuras precursoras vasculares, similares a vasos sanguíneos, para las células expuestas a ambas concentraciones de VEGF, se podría ultimar que una concentración de 10 ng·ml<sup>-1</sup> es suficiente para derivar a precursores endoteliales, sin embargo es necesario realizar otras pruebas, para corroborar cual sería la concentración óptima para generar estos precursores endoteliales, considerando el menor uso de VEGF debido a su alto costo.

En el ensayo de diferenciación a las 120h del proceso se detectó un número elevado de células Oct  $\frac{3}{4}$  +; lo cual nos indica que en este punto teníamos una importante cantidad de CP, como se mencionó anteriormente, sin embargo en los puntos posteriores a las 360h y 830h, el nivel de células Oct  $\frac{3}{4}$ + fue disminuyendo, dando lugar a un mayor número de células Flk-1+ y PECAM-1+ y posteriormente a células VE- Caderina+ por lo que si el proceso de diferenciación se continuara, la expresión de este marcador desaparecería, encontrando sólo células positivas para marcadores endoteliales. A las 120h del proceso de diferenciación ya se presentaba un número importante de células Flk-1+ y PECAM-1+, esto se debió a que al ser marcadores de precursores se expresan en etapas tempranas del proceso de diferenciación.

Se ha reportado que Flk-1 comienza a expresarse en un nivel importante desde de las 96h a las 144h aproximadamente, sin embargo en horas posteriores el nivel de expresión de este marcador de entre las 336 y las 384h disminuye considerablemente (Kabrun y cols., 1997; Magnuson y cols, 2004). Lo anterior, concuerda con nuestro ensayo de diferenciación, en el que posterior a las 360h del proceso de diferenciación el número de células Flk-1+ y PECAM-1+ fue disminuyendo a las 600h y 840h, sin embargo se considera que si se extendiera el proceso de diferenciación la expresión de Flk-1+ no desaparecería pues este marcador está implicado, como ya se mencionó anteriormente en la vasculogénesis adulta y la angiogénesis, además de estar

relacionado en procesos de vasodilatación, vasoconstricción, así como la permeabilidad y la adhesión de las células endoteliales (Olsson y cols., 2006).

Se ha reportado que PECAM-1 se expresa continuamente durante el desarrollo embrionario, desde la etapa de formación del blastocito (Vittet y cols., 1996), mientras que en otros ensayos de diferenciación *in vitro* se ha observado que la expresión de este marcador no es tan clara en las CTER, presentándose posterior a las 144h de diferenciación, con un nivel alto de expresión de entre las 144 y 192h, disminuyendo considerablemente su nivel de expresión posterior a las 432h (Magnuson y cols., 2004). Los datos obtenidos por estos autores coinciden con los resultados obtenidos en nuestra propuesta de protocolo de diferenciación, en el cual el número de células PECAM-1+ aumento de las 120h a 360h, mientras que la cantidad de estas disminuyó, posterior a este tiempo.

Durante el desarrollo embrionario la expresión de PECAM comienza a notarse antes de la formación de los islotes sanguíneos posterior a las 168h y aunque no está estrechamente relacionado con la vasculogénesis, este marcador es expresado tanto en células precursoras vasculares, así como en precursores hematopoyéticos, por lo que se expresa notablemente en una célula predecesora a estas dos mencionadas; el hemangioblasto (Redick y Bautch., 1999; Kim y cols., 2008).

Como se mencionó anteriormente, aunque el número de células PECAM+, disminuyó considerablemente a las 600h y las 840h de cultivo, en una simulación de un proceso de diferenciación más extenso, la expresión de este marcador no desaparecería y se mantendría en un nivel bajo pero constante. Esta molécula, más que estar implicada en eventos de diferenciación y compromiso endotelial, parece estar implicada principalmente en la migración de PV, en eventos de reparación o formación de vasos sanguíneos; así como está implicada en la migración de monocitos y leucocitos en eventos de respuesta inmune (Woodfin y cols., 2007).

La expresión nula de VE- Caderina a las 120h se debió a que en esta etapa se detectaron en su mayoría células pluripotentes (Oct  $3/4$ +) y células precursoras vasculares (Flk-1+ y PECAM-1+). Este marcador es expresado en etapas tardías en la Vasculogénesis, posterior a los 7 días o 168h *post coitum* y su expresión se encuentra



restringida a las células de la capa lateral de los islotes sanguíneos, las cuales darán lugar a las células endoteliales y al endotelio de todos los tipos de vasos sanguíneos, siendo indispensable la presencia de éste marcador, para la morfogénesis del plexo vascular, en ensayos *in vivo* (Gory- Faure y cols., 1999).

Los aspectos mencionados convergen con los resultados obtenidos en éste estudio estos aspectos mencionados concuerdan con nuestros resultados y otros ensayos *in vitro*, en los que se mimetiza en cierto grado lo que sucede *in vivo*.

De acuerdo a otros protocolos de diferenciación *in vitro* de células troncales, que la expresión de VE- Caderina comienza después de las 192 h del proceso de diferenciación, encontrando una alta expresión, posterior a las 288h, 384h y 480h del proceso de diferenciación endotelial (Magnuson y cols., 2004; Hirashima y cols., 1999). Los aspectos mencionados coinciden con los resultados obtenidos en éste estudio, puesto que se detectó que la expresión de VE- Caderina a las 360h, 600h y 840h fue aumentando gradualmente; mientras que la expresión de Oct <sup>3</sup>/<sub>4</sub> (células pluripotentes), Flk-1 y PECAM (precursores vasculares), fue disminuyendo.

## 10 Conclusiones

- i. Se concluye que la fase exponencial del crecimiento de las CTER es de 24h a 72h con un alto porcentaje de viabilidad (95% - 100%), considerando el intervalo óptimo para realizar el subcultivo.
- ii. Se detectaron células Nanog+ y Oct <sup>3</sup>/<sub>4</sub>+ en el cultivo de las CTER, con un porcentaje de expresión mayor al 96% para ambos marcadores, confirmando su capacidad pluripotente
- iii. Se identificó al Colágeno Tipo IV y no al Tipo I, como la matriz óptima para la expansión y el cultivo de precursores vasculares y células endoteliales especializadas de ratón.
- iv. Es posible utilizar una concentración de 10 ng·ml<sup>-1</sup> de VEGF, pues es suficiente para derivar precursores vasculares y células endoteliales especializadas, en un proceso de diferenciación.
- v. Durante todo el proceso de diferenciación se observó un recambio en la expresión inicial de Oct <sup>3</sup>/<sub>4</sub> por los marcadores endoteliales Flk-1 y PECAM, que consecuentemente dio lugar a la expresión de VE Caderina mayor en la etapa final del proceso.
- vi. Es posible derivar progenitores endoteliales y células endoteliales especializadas, a través del procedimiento de diferenciación dirigida, utilizando un medio químicamente definido, sin la necesidad de utilizar purificación magnética.

## 11 Referencias

1. Bazzoni, G. & Dejana, E. (2004). Endothelial Cell-to-Cell Junctions: Molecular Organization and Role in Vascular Homeostasis. *Physiological Reviews*. 84(3): 869-901
2. Blancas, A., Shih, A., Lauer, N. & McCloskey, K. (2011). Endothelial Cells from Embryonic Stem Cells in a Chemically Defined Medium. *Stem Cells and Development*. 20: 2153- 2161.
3. Breier, G., Breviario, F., Caveda, L., Berthier, R., Schnurch, U., Gotsch, D., Vestweber, D., Risau, W., & Dejana E. (1996). Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood*. 87: 630– 642.
4. Can, A. (2008). A concise review on the classification and nomenclature of stem cells. *Turk Journal of Hematology*. 25: 57-59.
5. Carmeliet, P., Lampugnani, M., Moons, L., Breviario, F., Compernelle, V., Bono, F., Balconi, G., Spagnuolo, R., Oosthuysse, B., Dewerchin, M., Zanetti, A., Angellilo, A., Mattot, V., Nuyens, D., Lutgens, E., Clotman, F, Ruitter, M., Gittenberger-de Groot, A., Poelmann, R., Lupu, F., Herbert, J., Collen, D. & Dejana, E. (1999). Targeted deficiency or cytosolic truncation of the VE-cadherin gene in mice impairs VEGF-mediated endothelial survival and angiogenesis. *Cell*. 98: 147-157.
6. Carmeliet, P., Ferreira, V., Breier, G., Pollefeyt, S., Kieckens, L., Gertsenstein, M., Fahrig, M., Vandenhoeck, A., Harpal, K., Eberhardt, C., Declercq, C., Pawling, J., Moons, L., Collen, D., Risau, W. & Nagy, A. (1996). Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*.380: 435- 439.

7. Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K. & Dalton, S. (2005). LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development*. 132: 885- 896.
8. Caveda, L., Martin, I., Navarro, P., Breviario, F., Corada, M., Gulino, D., Lampugnani, M. & Dejana, E. (1996). Inhibition of cultured cell growth by vascular endothelial cadherin (cadherin-5/VE-cadherin). *The Journal of Clinical Investigation*. 98: 886-893.
9. C  be, S., Zehnder, A. & Balmer, K. (2006). The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63: 601- 615.
10. Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., Smit, A. (2003). Cell Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 113: 643–655.
11. Chew, J., Loh, Y., Zhang, W., Chen, X., Tam, W., Yeap, L., Li, P., Ang, Y., Lim, B., Robson, P. & Ng, H. (2005). Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology*. (25): 14: 6031-6046.
12. Clahsen, T., Lehmann, U., Stross, C., Hermann, s H., Volkmer-Engert, R., Schneider-Mergener, J., Heinrich, P. & Schaper, F. (2005). The tyrosine 974 within the LIF-R-chain of the gp130/LIF-R heteromeric receptor complex mediates negative regulation of LIF signalling. *Cell Signal*. 17: 559- 569.
13. Corada M, Zanetta L, Orsenigo F., Breviario, F., Lampugnani, M., Bemasconi, S., Liao, F., Hicklin, D., Bohlen, P. & Dejana, E. (2002). A monoclonal antibody to vascular endothelial-cadherin inhibits tumor angiogenesis without side effects on endothelial permeability. *Blood*.100: 905-911.
14. Cross, M. & Claesson-Welsh, L. (2001). FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends in pharmacological sciences*. 22(4):201-207.

15. Dang, C., O'Donnell, K., Zeller, K., Nguyen, T., Osthus, R. & Li, F. (2006). The c-Myc target gene network. *Seminars in Cancer Biology*.16:253-64.
16. Dejana, E. (2004). Endothelial cell-cell junctions: happy together. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 5:261–270.
17. Descamps, B. & Emanuelli. (2012). Vascular differentiation from embryonic stem cells: Novel technologies and therapeutic promises. *Vascular Pharmacology*. 56: 267- 279.
18. Drake, C. (2003). Embryonic and Adult Vasculogenesis. *Birth Defects Research (Part C)*. 69: 73- 82.
19. Duncan, G., Andrew, D., Takimoto, H., Kaufman, S., Yoshida, H., Spellberg, J., Luis de la Pompa, J., Elia, A., Wakeham, A., Karan-Tamir, B., Muller, W., Senaldi, G., Zukowski, M. & Mak, T. (1999). Genetic evidence for functional redundancy of platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1): CD31-deficient mice reveal PECAM-1-dependent and PECAM-1-independent functions. *Journal Immunology*. 162:3022–3030.
20. Ema, M., Yokomizo, T., Wakamatsu, A., Terunuma, T., Yamamoto, M. & Takahashi, S. (2006). Primitive erythropoiesis from mesodermal precursors expressing VE-cadherin, PECAM-1, Tie2, endoglin, and CD34 in the mouse embryo. *Blood* 108, 4018–4024.
21. Evans, M. & Kaufman, M. (1981). Establishment in culture of pluripotential stem cells from mouse embryos. *Nature*. 291: 154–156p.
22. Fernandes, T., Fernandes, A., Lobato da Silva, C., Diogo, M. & Cabral, J. (2010). Kinetic and metabolic analysis of mouse embryonic stem cell expansion under serum- free conditions. *Biotechnology Letters*. 32: 171- 179.
23. Ferrara, N., Carver, K., Chen, H., Dowd, M., Lu, L., Sue, K., Powell, L., Hillan, K. & Moore, M. (1996). Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 380: 439- 442.

24. Flamme, I., Frolich, T. & Risau, W. (1997). Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J. Cell. Physiol.* 173, 206–210.
25. Gory-Faure, S., Prandini, M., Pointu, H., Roullot, V., Pignot-Paintrand, I., Vernet, M. & Huber, P. (1999). Role of vascular endothelial-cadherin in vascular morphogenesis. *Development.* 126:2093–2102.
26. Hanahan, J. (1997). Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science.* 277: 48- 50.
27. Hartsock, A., & Nelson, W.J. (2008). Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochimica et Biophysica Acta.* 3: 660–669.
28. Hatano, R., Mercurio, K., Luna, J., Glaser, D., Leppert, V. & McCloskey, K. (2013). Endothelial cells derived from embryonic stem cells respond to cues from topographical surface patterns. *Journa of Biological En gineering.* 7: 18. 1-12p.
29. Hirashima, M., Kataoka, H., Nishikawa, S., Matsuyoshi, N. & Nishikawa, S. (1999). Maturation of Embryonic Stem Cells Into Endothelial Cells in an In Vitro Model of Vasculogenesis. *Blood.* 93: 1253- 1263.
30. Höpfl, G., Gassmann, M. & Desbaillets, I. (2004). Differentiating embryonic stem cells into embryoid bodies. *Methods in Molecular Biology.* 254: 79–98.
31. Howard, B., Macarak, E., Gunson, D. & Kefalides, N. (1976). Characterization of the collagen synthesized by endothelial cells in culture. *PNAS.* 73: 2361-2364.
32. Hui, H., Tang, Y., Hu, M. & Zhao, X. (2011). Stem Cells: General Features and Characteristics. *Stem Cells In Clinic and Research.* Edited by Gholamrezanezhad, A. 1-20.
33. Ilan, N. & Madri, J. (2003). PECAM- 1: old friend, new partners. *Current Opinion in Cell Biology.* 15: 515- 524.

34. Ilan, N., Cheung, L., Pinter, E., & Madri, J. (2000). Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31), a scaffolding molecule for selected catenin family members whose binding is mediated by different tyrosine and serine/threonine phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 275: 21435–21443.
35. Johanes, R. & Lütjen-Drecol, E. (2007). *Embriología funcional: una perspectiva desde la biología del desarrollo*. 3a Ed. Médica Panamericana. 176p.
36. Kabrun, N., Bühring, H., Choi, K., Ullrich, A., Risau, W. & Keller, G. (1997). Flk-1 expression defines a population of early embryonic hematopoietic precursors. *Development*. 124: 2039- 2048.
37. Kim, G., Kim, G., Seok, J., Chung, H., Chee, K. & Rhee, G. (2008). Differentiation of endothelial cells derived from mouse embryoid bodies: A possible in vitro vasculogenesis model. *Toxicology Letters*. 180: 166- 173.
38. Kramer, R., Bensch, K., Davison, P. & Karasek, A. (1984). Basal Lamina Formation by Cultured Microvascular Endothelial Cells. *The Journal of Cell Biology*. 99: 692- 698.
39. Lampugnani, M., Corada, M., Caveda, L., Breviario, F., Ayalon, O., Geiger, B. & Dejana, E. (1995). The molecular organization of endothelial cell to cell junctions: differential association of plakoglobin, beta-catenin, and alpha-catenin with vascular endothelial cadherin (VE-cadherin). *The Journal of Cell Biology*. 129: 203–217.
40. Langman, S. (2008). *Embriología médica: con orientación clínica*. 10a Ed. 1reimp. Medica Panamericana. 404p.
41. Lawson, K., Meneses, J. & Pedersen, R. (1991). Clonal analysis of epiblast fate during germ layer formation in the mouse embryo. *Development* 113: 891– 911.
42. Liekens, S., Clercq, E. & Neyts, J. (2001). Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochemical Pharmacology*. 61: 253- 270.

43. Loh, Y., Wu, Q., Chew, J., Vega, V., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K., Sung, K., Lee, C., Zhao, X., Chiu, K., Lipovich, L., Kuznetsov, V., Robson, P., Stanton, L., Wei, C., Ruan, Y., Lim, B. & Hui Ng, H. (2006). The Oct 3/4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nature Genetics*. 38: 431.
44. Magnusson, P., Rolny, C., Jakobson, L., Winkler, C., Wu, Y., Hicklin, D. & Welsh, L. (2004). Deregulation of Flk-1/vascular endothelial growth factor receptor-2 in fibroblast growth factor receptor-1-deficient vascular stem cell development. *Journal of Cell Science*. 117: 1513- 1521.
45. Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T & Yokota, T. (1999). STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *European Molecular Biology Organization Journal*. 18(15):4261-9.
46. McCloskey, K., Smith, D., Jo, H. & Nerem, R. (2006). Embryonic Stem Cell Derived Endothelial Cells May Lack Complete Functional Maturation in vitro. *Journal of Vascular Research*. 43: 411- 421.
47. Mignatti, P. & Rifkin, D. (1996). Plasminogen activators and matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Enzyme Protein*.49:117–37.
48. Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M. & Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell*. 113: 631-642.
49. Mondragón, P., Baboo, J., Mason, C., Lye, G. & Veraitch, F. (2011). The Full Spectrum of Physiological Oxygen Tensions and Step-Changes in Oxygen Tension Affects the Neural Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Biotechnology Progress*. 00:1-9.



50. Muller, W. (2003). Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends in Immunology*. 24: 326–333, 2003.
51. Nichols, J., Davidson, D., Taga, T., Yoshida, K., Chambers, I. & Smith, A. (1996). Complementary tissue-specific expression of LIF and LIF-receptor mRNAs in early mouse embryogenesis. *Mechanism of Development*. 57:123–31.
52. Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Schöler, H. & Smith, A. (1998). Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct-4. *Cell* 95:379–91.
53. Nishikawa, S., Nishikawa, S., Hirashima, M., Matsuyoshi, N. & Kodama, H. (1998). Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+ VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hematopoietic lineages. *Development* 125, 1747–1757.
54. Niwa, H., Miyazaki, J. & Smith, A. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nature Genetics*. 24:372–76.
55. Noghero, A., Bussolino, F. & Gualandris, (2010) A. Role of the microenvironment in the specification of endothelial progenitors derived from embryonic stem cells. *Microvascular Research*. 79(3): 178–183.
56. Olsson, A., Dimberg, A., Kreuger, J. & Welsh, L. (2006). VEGF receptor signaling- in control of vascular function. *Nature Reviews: Molecular Cell Biology*. 7: 359- 371.
57. Palomero, G., Vazquez, M., Vega, J., Naves, F. & Rodriguez, C. (1998). *Lecciones de Embriología*. Universidad de Oviedo, Servicio de Publicaciones. 537p.

58. Pan, G., Li, J., Zhou, Y., Zheng, H. & Pei, D. (2006). A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *The FASEB Journal*. 20: 1094-1102.
59. Patan, S. (2000). Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *Journal of Neuro- Oncology*. 50: 1-15.
60. Patel- Hett, S. & D'Amore, P. (2011). Signal Transduction in Vasculogenesis and Developmental Angiogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*. 55: 353- 363.
61. Pesce, M., Gross, M. & Scholer, H. (1998). In line with our ancestors: Oct-4 and the mammalian germ. *Bio Essays*. 20:722–32.
62. Quinlan, L. (2011). Embryonic Stem Cells- Basic Bioengineering. Chapter 15. INTECH. 183- 204.
63. Ralston, A. & Rossant, J. (2005). Genetic regulation of stem cell origins in the mouse embryo. *Clinical Genetics*. 68: 106- 112.
64. Redick, S. & Bautch, V. (1999). Developmental Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule Expression Suggests Multiple Roles for a Vascular Adhesion Molecule. *American Journal of Pathology*. 154: 1137- 1147.
65. Risau, W., Sariola, H., Zerwes, H., Sasse, J., Ekblom, P., Kemler, R. & Doetschman, T. (1988). Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development*. 102: 471–478.
66. Sage, H., Pritzl, P. & Bornstein, P. (1981). Secretory Phenotypes of Endothelial Cells in Culture: Comparison of Aortic, Venous, Capillary, and Corneal Endothelium. *Arteriosclerosis*. 1: 427- 442.
67. Sakurai, H., Era, T., Jakt, L.M., Okada, M., Nakai, S. & Nishikawa, S. (2006). In vitro modeling of paraxial and lateral mesoderm differentiation reveals early reversibility. *Stem Cells*. 24: 575–586.

68. Seghezzi, G., Patel, S., Ren, C., Gualandris, A., Pintucci, G., Robbins, E., Shapiro, R., Galloway, A., Rifkin, D. & Mignatti, P (1998). Fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2) Induces Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in the Endothelial Cells of Forming Capillaries: An Autocrine Mechanism Contributing to Angiogenesis. *The Journal of Cell Biology*. 141: 1659- 1673.
69. Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T., Gertsenstein, M., Wu, X., Breitman, M. & Schuh, A. (1995). Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*. 376: 62–66 .
70. Sheibani, N., Sorenson, C. & Frazier, W. (2000). Differential modulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by platelet endothelial cell adhesion molecule-1 isoforms through activation of extracellular regulated kinases. *Molecular Biology of the Cell* 11: 2793–2802.
71. Smith, A., Heath, J., Donaldson, D., Wong, G., Moreau, J., Stal, M. & Rogers, D. (1988). Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature*. 336. 688-690.
72. Smith, A. (2001). Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annual review of cell and developmental biology*. 17:435-62
73. Stahl, N., Farruggella, T., Boulton, T., Zhong, Z., Darnell, J. & Yancopoulos, G. (1995). Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science*. 267: 1349- 1353.
74. Stewart, C., Kaspar, P., Brunet, L., Bhatt, H., Gadi, I, Köntgen, F. & Abbondazo, S. (1992). Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359:76–79.
75. Takahashi, H. & Shibuya, M. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF)/ VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical. Science. (London)* 109: 227–241.

76. Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K. & Yamanaka, S. (2007). Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 131: 861- 872.
77. Vaisman N., Gospodarowicz, D. & Neufeld, G. (1990). Characterization of the receptors for vascular endothelial growth factor. *Journal of Biological Chemistry*. 265:19461–19466.
78. Vittet, D., Prandini, M., Berthie, R., Schweitzer, A., Martin-Sisteron, H., Uzan, G. & Dejana, E. (1996). Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood*. 88: 3424–3431.
79. Wang, H. & Su, Y. (2011). Collagen IV contributes to nitric oxide-induced angiogenesis of lung endothelial cells. *American Journal of Physiology: Cell Physiology*. 300: C979- C988.
80. Ware, C., Horowitz, M., Renshaw, B., Hunt JS, Liggitt, D., Koblar, S., Gliniak, B., McKenna, H., Papayannopoulou, T., Thoma, B., Cheng, L. Donovan, P., Peschon, J., Bartlett, P., Willis, C., Wright, B. Carpenter, M., Davison, B. & Gearing, D. (1995). Targeted disruption of the low-affinity leukemia inhibitory factor receptor gene causes placental, skeletal, neural and metabolic defects and results in perinatal death. *Development*. 121:1283–99.
81. Wheelock, M. & Johnson, K. (2003). Cadherins as modulators of cellular phenotype. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 19: 207-235
82. Williams, R., Hilton, D., Pease, S., Willson, T., Stewart, C., Gearing, D., Wagner, E., Metcalf, D., Nicola, N. & Gough, N. (1988). Myeloid Leukemia Inhibitory Factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*. 336: 684-687p.
83. Wobus, A. & Boheler, K. (2005). Embryonic Stem Cells: prospects for developmental biology and cell therapy. *Physiology Reviews*. 85: 635–678.

84. Woodfin, A., Voisin, M. & Nourshargh, S. (2007) . PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arteriosclerosis Thrombosis Vascular Biology* vol. 27, (12) 2514-2523.
85. Ying, Q., Nichols, J., Chambers, I. & Smith, A. (2003). BMP induction of Id proteins suppresses differentiation and sustains embryonic stem cell self-renewal in collaboration with STAT3. *Cell*. 115: 281-292
86. Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C. & Dailey L. (1995). Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox-2 and Oct-3. *Genes & Dev*. 9:2635–2645.
87. Zeller, K., Zhao, X., Lee, C., Chiu, K., Yao, F., Yustein, J., Ooi, H., Orlov†, Y., Shahab, A., Yong, H., Fu, Y., Weng, Z., Kuznetsov, V., Sung†, W., Ruan, Y., Dang, C. & Wei, C. (2006). Global mapping of c-Myc binding sites and target gene networks in human B cells. *PNAS*. 103:17834-17839.
88. Zeng, X., Miura, T., Luo, Y., Bhaskar, B., Condie, B., Lyons, I., Puri, R., Rao, M. & Freed, W. (2004). Properties of pluripotent human embryonic stem cells BG01 and BG02. *Stem Cells*, 22 (3): 292–312.