



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

**EL CORDÓN UMBILICAL COMO MODELO ENDOTELIAL Y OTRAS
DE SUS APLICACIONES**

TRABAJO MONOGRÁFICO DE ACTUALIZACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

INGRID MERCADO DEL RÍO

DIRECTOR DE TESIS

LEONOR JACOBO ALBAVERA



Ciudad Universitaria, Cd. Mex., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: JOSE PEDRAZA CHAVERRI

VOCAL: SAMUEL CANIZALES QUINTEROS

SECRETARIO: LEONOR JACOBO ALBAVERA

1er. SUPLENTE: TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

2° SUPLENTE: CLAUDIA TERESA TOVAR PALACIO

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA (INMEGEN).

ASESOR DEL TEMA: DRA. LEONOR JACOBO ALBAVERA

SUSTENTANTE (S): INGRID MERCADO DEL RIO

CONTENIDO

A. Lista de Abreviaturas.....	5
B. Índice de tablas	6
C. Índice de figuras.....	6
Resumen	7
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1 Importancia de los modelos <i>in vitro</i>	14
1.2 ¿Por qué un modelo de endotelio?.....	17
2. MODELO ENDOTELIAL	19
2.1 Cordón umbilical: origen y funciones	19
2.1.1 <i>Composición del cordón umbilical humano.....</i>	20
2.1.2 <i>Métodos de aislamiento de las células del cordón umbilical.....</i>	22
2.2 Antecedentes	23
2.3 Origen del modelo	25
2.4 Generalidades del modelo.....	27
2.5 Primeros años del uso de células HUVEC como modelo <i>in vitro</i>.....	30
2.6 Actualidad	33
3. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE LA VENA UMBILICAL HUMANA.....	39
3.1 Primeras técnicas de aislamiento de células endoteliales de la vena umbilical humana.....	40
3.2 Cultivo de células HUVEC	47
3.3 Condiciones en el aislamiento y cultivo de células HUVEC	49
3.3.1 <i>Recolección y conservación del cordón.....</i>	49
3.3.2 <i>Consideraciones sobre los reactivos utilizados en el aislamiento.....</i>	52
3.3.2.1 <i>Medio de cultivo</i>	54
3.3.2.2 <i>Uso de la colagenasa.....</i>	54
3.3.2.3 <i>Uso del suero fetal bovino (SFB) en el cultivo de células HUVEC.....</i>	55
3.3.2.4 <i>Uso de heparina.....</i>	57
3.3.2.5 <i>Uso de reactivos que favorecen la adhesión en el cultivo de células HUVEC.....</i>	57
3.3.3 <i>Crecimiento celular</i>	58
3.3.4 <i>Contaminación.....</i>	60
3.3.5 <i>Criopreservación de células HUVEC.....</i>	61
3.3.6 <i>Viabilidad de células HUVEC.....</i>	62
3.3.7 <i>Ventajas y desventajas del aislamiento y cultivo de células HUVEC.....</i>	64
4. IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS HUVEC.....	66
4.1 Descripción morfológica	67

4.2	Marcadores celulares	71
4.2.1	Marcadores proteicos.....	71
4.2.1.1	Molécula de adhesión endotelial a plaquetas (PECAM-1, endoCAM o CD31)....	71
4.2.1.2	Antígeno CD36.....	71
4.2.1.3	Antígeno CD34.....	71
4.2.1.4	VE-cadherina (CD144).....	72
4.2.1.5	Molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y molécula vascular de adhesión celular-1 (VCAM-1).....	72
4.2.1.6	Endotelina-1 (ET-1).....	73
4.2.1.7	Selectinas (E y P).....	73
4.2.1.8	Antígeno del factor VIII o factor de von Willebrand (vWF).....	73
4.2.1.9	Molécula de adhesión de leucocitos de células endoteliales (ELAM-1).....	74
4.2.1.10	Claudina-5.....	74
4.2.1.11	Integrina $\alpha_v\beta_3$	75
4.2.2	Actividad enzimática	75
4.2.2.1	Enzima convertidora de angiotensina I (ACE).....	75
4.2.2.2	Expresión y actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS).....	75
4.2.3	Otros marcadores	76
4.2.3.1	Antígenos ABH en células endoteliales.	76
4.2.3.2	Incorporación de lipoproteínas acetiladas de baja densidad (Dil-Ac-LDL).....	76
4.2.3.3	Liberación de prostaciclina (PGI ₂).....	77
4.2.3.4	Formación de capilares	77
4.3	Perfil de expresión de células endoteliales	78
5.	APLICACIONES DEL CORDÓN UMBILICAL COMO MODELO ENDOTELIAL.....	79
5.1	Aplicaciones en el estudio de enfermedades cardiovasculares	80
5.2.	Aplicaciones en el estudio de angiogénesis.....	87
5.3.	Aplicaciones en diabetes	95
5.4.	Aplicaciones en genética	104
5.5.	Otras aplicaciones.....	109
5.5.1.	Inmunología.....	109
5.5.2.	Cáncer.....	110
5.5.3.	Estudios durante el embarazo.....	111
5.5.4.	Formación de hueso	114
5.5.5.	Medicina regenerativa	115
5.5.6.	Endocrinología.....	117
5.5.7.	Inflamación	118
5.5.8.	Exosomas.....	120
6.	CONCLUSIONES	122
7.	LITERATURA CITADA	123

A. Lista de Abreviaturas

ACE. Enzima convertidora de angiotensina.	IL. Interleucina.
AHF. Factor antihemofílico/ Factor VIII.	iPSCs. Células madres pluripotentes inducidas.
Ang. Angiopoyetinas.	KDR. Receptor cinasa con inserción de dominio .
ATP. Adenosin trifosfato.	M199. Medio de cultivo 199.
CAD. Enfermedad arterial coronaria.	MCDB. Medio de desarrollo molecular y celular.
CMV. Citomegalovirus.	MIF. Factor de inhibición de la migración.
CNP. Péptido natriurético tipo C.	MMP. Metaloproteasas de matriz.
CSE. γ -cistationina liasa.	MSC. Células madre mesenquimales.
CVD. Enfermedades cardiovasculares.	NO. Óxido nítrico.
Dil-Ac-LDL. Lipoproteínas acetiladas de baja densidad.	PAH. Factor activador de plaquetas.
DNA. Ácido desoxirribonucleico.	PBS. Amortiguador salino de fosfatos.
EC. Células endoteliales.	PDGF. Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
ECM. Matriz extracelular.	PECAM. Molécula de adhesión de plaquetas en células endoteliales.
ECGF. Factor de crecimiento celular endotelial.	PGI. Prostaciclina.
EGF/ GEF. Factor de crecimiento endotelial.	RNA. Ácido ribonucleico.
eNOS. Óxido nítrico sintasa.	ROS. Especies reactivas de oxígeno.
EPS. Exopolisacárido.	SCF. Factor de células madre.
ERK. Cinasa relacionada con la señal extracelular.	SFB. Suero fetal bovino.
FGF. Factor de crecimiento de fibroblastos.	TGF. Factor de crecimiento transformante.
GDM. Diabetes mellitus gestacional.	TNF. Factor de necrosis tumoral.
H₂S. Sulfuro de hidrógeno.	VCAM. Molécula vascular de adhesión celular.
HEC. Células endoteliales humanas.	VEGF. Factor de crecimiento endotelial vascular.
HEPES. Ácido 2-[4-(2-hidroxietyl)-1-piperacini] etanosulfónico.	vWF. Factor de von Willebrand.
HUVEC. Células endoteliales de la vena umbilical humana.	WJ. Gelatina de Wharton.
ICAM. Molécula de adhesión intracelular I.	WPB. Cuerpos de Weibel-Palade.
IGF. Factor de crecimiento similar a la insulina.	
LDL. Lipoproteínas de baja densidad.	

B. Índice de tablas

Tabla 1. Comparación de modelos <i>in vivo</i> vs modelos <i>in vitro</i> en diferentes estudios.	10
Tabla 2. Primeros estudios realizados a las células endoteliales humanas (HEC) tras el establecimiento del método para el aislamiento y mantenimiento de células endoteliales <i>in vitro</i>	27
Tabla 3. Condiciones de aislamiento y cultivo según diferentes autores.	41
Tabla 4. Estudios que realizaron el aislamiento de células endoteliales.....	44
Tabla 5. Condiciones de cultivo de células HUVEC.....	47
Tabla 6. Soluciones empleadas en la conservación del cordón umbilical antes de su procesamiento y tiempo máximo en ser procesados.....	51
Tabla 7. Tabla de solución de problemas (Tabla tomada de Cheung, 2007).	53
Tabla 8. Uso de gelatina para la adherencia celular.	58
Tabla 9. Condiciones y reactivos utilizados para el subcultivo de células HUVEC (Pase de células).....	61
Tabla 10. Medio para criopreservar células HUVEC.....	62

C. Índice de figuras

Figura 1. Sección transversal de un cordón umbilical	19
Figura 2. Sección del cordón umbilical teñido con hematoxilina y eosina.	21
Figura 3. Endotelio de cultivo de tejido.....	23
Figura 4. Fotomicrografía de un cultivo de células endoteliales	25
Figura 5. Cultivo de células HUVEC de 1 a 6 h.	43
Figura 6. Fotomicrografía de la vena umbilical antes y después del tratamiento con colagenasa.	55
Figura 7. Micrografía de contraste de fases de células vivas	67

Resumen

La creciente necesidad de mimetizar las complejas condiciones fisiológicas del organismo para estudiar los desórdenes que lo aquejan, han llevado a la ciencia a recurrir a modelos que permitan facilitar su estudio. Si bien es cierto que los modelos *in vivo* fueron durante mucho tiempo la opción más utilizada, no siempre era la más viable, debido a las múltiples complicaciones y dificultades que presentaban. Con el paso del tiempo, se desarrollaron otros modelos como el uso de organismos alternos o modelos computacionales. No obstante, fue el desarrollo de modelos *in vitro*, y específicamente el cultivo de células, los que permitieron un progreso acelerado del estudio de múltiples enfermedades y posibles terapias y/o diagnóstico. En este contexto, se ha demostrado que las células endoteliales provenientes de la vena umbilical humana (HUVEC), son un excelente e irremplazable modelo para el estudio de las enfermedades cardiovasculares. Lo anterior ha sido posible gracias al éxito de su aislamiento, su correcta identificación y conservación como cultivo celular, así como a las ventajas y facilidades que otorga frente a otros modelos.

Las células HUVEC han sido útiles no sólo en el estudio de enfermedades cardiovasculares, sino que también han ayudado a dilucidar los mecanismos de la angiogénesis y al desarrollo de nuevas terapias y diagnósticos. Así mismo, otras disciplinas como la inmunología o la genética se han beneficiado de este modelo, el cual también ha sido útil para los estudios sobre cáncer, diabetes e inflamación, entre otros.

Si bien es cierto que los modelos *in vitro* no podrán sustituir por completo a los modelos *in vivo*, los modelos *in vitro* permiten enfocar el tema de estudio, minimizar las variables experimentales y a su vez, mimetizan un tejido en específico del organismo humano, lo cual favorece un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares y celulares de las enfermedades que lo aquejan.

El cordón umbilical como modelo endotelial y otras de sus aplicaciones

1. INTRODUCCIÓN

El uso de animales para propósitos científicos es una práctica común en la investigación biológica y médica, y a su vez un tema de debate en la sociedad. Estos son usados como herramientas para entender el efecto de procedimientos médicos y experimentos quirúrgicos, así como la obtención de vacunas, antibióticos, etc.¹.

Las similitudes anatómicas y fisiológicas que presentan los animales –y en particular los mamíferos- con el ser humano han permitido el uso de los primeros para investigar una amplia gama de mecanismos biológicos, así como la evaluación de nuevas terapias, antes de que éstas puedan ser aplicadas en humanos.

Sin embargo, los resultados obtenidos de dichas investigaciones no siempre pueden ser extrapolados. La biología interroga a los organismos a diferentes niveles: moléculas, células, órganos y funciones fisiológicas, tanto en condiciones normales como en presencia de alguna enfermedad, y si bien todos los niveles son requeridos para una descripción completa en el entendimiento de los mecanismos, los primeros dos o tres niveles pueden ser estudiados utilizando modelos *in vitro*. Estos se han vuelto tan sofisticados que son capaces de representar la compleja estructura 3D de los tejidos, pudiendo así dar una aproximación al entorno que los rodea².

Si bien el reemplazo de animales es impensable, es necesario recalcar que las hipótesis y modelos de estudio generalmente emergen de los ensayos realizados *in vitro*, lo que remarca la importancia del uso de esta técnica como modelos potenciales en la investigación. Gracias a estos modelos, es posible realizar dos tipos de estudios: estudios descriptivos del efecto en el ser humano y estudios analíticos para optimizar la asociación con modelos *in vivo*³. Es por ello que

ambos resultan indispensables, y son los modelos *in vitro* los que aportan la primera aproximación al problema que se quiere estudiar.

Desde el punto de vista de la investigación, los modelos *in vitro* e *in vivo* pueden proveer ventajas y desventajas. Es importante identificar qué tipo de estudios se realizan y decidir el modelo más adecuado (Tabla 1). Así, por ejemplo, un modelo *in vitro* para el estudio temprano en el desarrollo de osteoartritis resulta más conveniente que un modelo animal, pues el primero permite entender la progresión de la enfermedad antes del desarrollo de procesos inflamatorios graves. Estudiar dicha enfermedad *in vivo* supone un problema, porque es difícil obtener tejido en el estado temprano de la osteoartritis, así como identificar los cambios moleculares asociados al mismo⁴. Por otro lado, para el estudio de la insuficiencia cardíaca es necesario el uso de modelos animales, ya que éstos son capaces de exhibir los síntomas primarios de dicha condición clínica (disnea, fatiga, intolerancia al ejercicio y retención de líquido en pulmones y tejidos periféricos), lo que podría permitir la identificación de las diversas causas asociadas al desarrollo de la enfermedad⁵.

Tabla 1. Comparación de modelos *in vivo* vs modelos *in vitro* en diferentes estudios.

Modelo para el estudio de:	<i>In vitro</i>		<i>In vivo</i>	
	Ventajas	Desventajas	Ventajas	Desventajas
Actividad androgénica y estrogénica⁶.	Mayor efecto de algunas moléculas y sus derivados; además estos ensayos fueron buenos predictores de la actividad androgénica o estrogénica de una gama de compuestos <i>in vivo</i> .	Efectos negativos de algunos compuestos.	Mayor estabilidad de los compuestos.	No hay efecto alguno de ciertas moléculas sobre este modelo.
Biofilms⁷.	Permite estudiar el efecto de diferentes compuestos en la modulación del	Este sistema no simula necesariamente lo que ocurre en	Las proteínas presentes inducen el desarrollo y	No se mencionan.

	biofilm.	una infección <i>in vivo</i> .	acumulación de biofilm. Confirma resultados <i>in vitro</i> .	
Actividad antimalaria ⁸ .	Algunas moléculas muestran mayor actividad antimalaria.	No se mencionan.	No se mencionan.	Algunas moléculas presentan alta toxicidad (debido a vía de administración). Eficacia limitada de los compuestos probados.
Resistencia a terapias anti cáncer ⁹ .	Cultivos primarios de células se pueden obtener directo de pacientes.	Resistencia a fármacos.	Xenoinjertos de tumores humanos en ratones.	Requiere de técnicas avanzadas (manejo de animales, cirugía, etc).
Lesión por isquemia-reperfusión ¹⁰ .	Capaz de detectar daño endotelial.	Un almacenamiento prolongado induce disfunción endotelial.	La severidad de la disfunción endotelial es más notoria.	Se requieren técnicas de trasplante de tejido.

Algunas alternativas a los modelos *in vivo* surgidas en tiempos recientes son ¹:

Modelos computacionales. Ayudan a entender principios básicos de la biología. El desarrollo de nuevos programas ha permitido diseñar nuevos fármacos, así como generar simulaciones para predecir efectos tóxicos y biológicos de alguna droga candidato; también sirven para predecir la unión a receptores en el organismo o bien, para predecir la relación estructura-actividad de moléculas, lo que ha permitido conocer más sobre la actividad carcinogénica y mutagénica de potenciales fármacos. Entre las principales ventajas que otorgan estos modelos están el fácil acceso a recursos informáticos y su manejabilidad y los procedimientos llevados a cabo, relativamente baratos.

Organismos alternos. Los asuntos éticos han impuesto muchas restricciones sobre el uso experimental de modelos vertebrados complejos (como ratas, monos o perros), por lo que se ha optado por el uso de diferentes organismos, tales como vertebrados menos complejos (por ejemplo el pez cebra), invertebrados (modelo limitado por no poseer un sistema inmune adaptativo), *Cernorhabditis elegans* o nemátodo, utilizado para estudiar enfermedades neurológicas como Huntington, Parkinson o Alzheimer; y microorganismos, cuyas ventajas incluyen un rápido crecimiento, sistema genético bien definido y sistema de transformación del ácido desoxirribonucleico (DNA).

Cultivo celular y de tejidos. El uso de células y tejidos *in vitro* es una importante alternativa al uso de animales para investigación. Cualquier célula puede ser removida del donante, que bien puede ser un animal o un ser humano, y es mantenida fuera de éste, en un medio apto para su crecimiento y reproducción. El cultivo de células incluye su aislamiento y crecimiento en una monocapa, en una superficie adecuada para tal propósito o en suspensión. Se puede utilizar cualquier componente celular (enzimas, membrana, etc.) para dirigir un estudio y existen diferentes tipos de cultivos celulares. Esta técnica es utilizada, entre otras cosas, para realizar el tamizaje (*screening*) de moléculas o drogas con posible actividad terapéutica (toxicidad y eficacia).

Este último modelo facilita la simplificación del sistema o enfermedad bajo estudio, permitiendo al investigador concentrarse en un número pequeño y específico de componentes ¹¹. Si comparamos los modelos computacionales con el cultivo celular, por ejemplo, este último se encuentra más cercano a las condiciones fisiológicas que el recurso informático. Este recurso, aunque de mayor accesibilidad y manejo, pudiera no simular las complicadas y cambiantes condiciones fisiológicas de un tejido.

Cabe mencionar que el uso de modelos *in vitro* también ha permitido un gran avance en el entendimiento de la biología celular porque ha facilitado el estudio de los mecanismos moleculares y celulares. Actualmente, las ciencias “ómicas” se

basan en el uso de modelos celulares *in vitro* ¹², por lo que también representan un progreso en el campo del conocimiento. Así mismo, gracias a la relativa facilidad con que pueden ser cultivadas, se han logrado establecer líneas celulares de diferentes tejidos (pulmón, epiteliales, hepatocitos, cancerígenas) para investigaciones dirigidas y/o específicas.

Otras ventajas que se pueden nombrar con respecto a los modelos *in vitro* son ¹³:

- Usualmente son los métodos de elección para la obtención a gran escala de productos en la industria farmacéutica debido a la facilidad en la producción de cultivos celulares, comparada con el uso de animales, y debido a consideraciones económicas.
- Evitan el uso y envío de protocolos en animales a las dependencias correspondientes.
- Disminuyen la necesidad de personal experimentado en el uso de animales.

1.1 Importancia de los modelos *in vitro*

Una de las principales metas de la mayoría de las investigaciones en biomedicina es lograr un mayor entendimiento de los mecanismos de las enfermedades en humanos, así como el desarrollo de nuevas y mejores terapias y/o diagnósticos. A pesar de que se han hecho grandes avances en términos de desarrollo de modelos de enfermedad en animales, como ratones transgénicos, muchos de estos modelos fracasan en recapitular fielmente la condición humana, de ahí que muchos fármacos nuevos fallen al evaluar su eficacia y seguridad cuando avanzan a las pruebas clínicas en humanos. Además, es difícil identificar la contribución de factores celulares y moleculares en cierta condición, o bien, de cambiarlos de forma independiente en un modelo animal completo ¹⁴.

El uso de modelos *in vitro* como una herramienta de investigación de la fisiopatología de múltiples condiciones se ha vuelto esencial en la actual era de la investigación molecular. Si bien siempre es necesario extrapolar y validar las observaciones hechas *in vitro* en un animal o paciente, la habilidad de investigar el papel de variables individuales, libres de elementos que puedan confundir o entorpecer la investigación, es fundamental para incrementar nuestro entendimiento de cualquier condición ¹⁵. Y dado que no es posible realizar investigación básica utilizando humanos como “conejiillos de Indias”, los investigadores han tenido que desarrollar modelos humanos de enfermedad alternos. Por esta razón, se ha hecho gran énfasis en estudios con cultivos de células humanas, incluyendo células primarias, líneas celulares establecidas y, más recientemente, cultivos derivados de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) ¹⁴.

Una de las disciplinas que muy probablemente debe su existencia y desarrollo, al uso del cultivo celular *in vitro* es la ingeniería de tejidos. Se sabe que Rudolf Virchow estableció en su obra *Cellular pathologie* (1858) que la regeneración de tejidos depende de la proliferación celular, lo que dio lugar al interés por la investigación histológica (citado por Schultheiss¹⁶). Posteriormente, en 1897 Leo

Loeb sugirió y publicó por primera vez el cultivo de células fuera del organismo, y en 1902 publicó su primer trabajo sobre injertos de tejido cutáneo de conejillos de Indias implantados en animales (citado por Schultheiss ¹⁶). Esta disciplina comenzó formalmente con los experimentos realizados por W. T. Green M.D, en la década de los 70 (citado por Vacanti ¹⁷), al generar nuevo cartílago utilizando condrocitos sembrados en espículas de hueso para ser implantados en ratones desnudos (*nude*). Para la década de los 90, el Dr. Una Chen comenzó a direccionar esta disciplina al utilizar células madre en diversos estudios (citado por Vacanti ¹⁷).

Otros ejemplos que destacan el empleo de modelos *in vitro*, y en particular del cultivo celular, es su uso como modelos metabólicos. Los ensayos *in vitro* juegan un papel importante en el tamizaje de nuevas entidades químicas, presentando múltiples ventajas: (1) la simplicidad y rapidez con que algunas moléculas con posible actividad farmacológica pueden ser evaluadas, (2) los ensayos *in vitro* requieren de una cantidad limitada del compuesto a probar, (3) estos ensayos están frecuentemente diseñados para responder preguntas específicas, como la relación estructura-actividad en la estabilidad metabólica de algún compuesto y (4) los estudios *in vitro* que utilizan células humanas, otorgan mayor precisión en relación con los futuros ensayos clínicos realizados en humanos ¹⁸.

Adicionalmente, los modelos *in vitro* también han tenido gran repercusión en el área toxicológica, pues los ensayos en animales de los cientos de compuestos químicos sintetizados cada año, exceden varios millones de dólares, por lo que el desarrollo de modelos *in vitro* para evaluar la toxicidad de químicos y drogas se ha vuelto esencial. En este sentido, los sistemas *in vitro* resultan más convenientes porque permiten mejorar el entendimiento de los mecanismos que inducen toxicidad, a diferencia de los modelos *in vivo*, que resultan más complicados debido a la presencia de heterogeneidad estructural y funcional, que no permiten definir claramente los mecanismos ni examinarlos de forma reproducible.

Por ello, el sistema *in vitro* debe ser desarrollado y caracterizado para que presente las funciones clave y las características del tejido *in vivo*, así como indicar cuando esas características se pierdan en el modelo. Además, los estudios deben llevarse a cabo a concentraciones y tiempos de exposición similares a la situación *in vivo*, así los efectos dependientes del tiempo y la concentración pueden ser demostrados en organismos complejos. Finalmente, una ventaja en este ámbito, es que se pueden estudiar compuestos desconocidos, y posteriormente comparar la toxicidad de los mismos con agentes tóxicos conocidos. Otros ejemplos que destacan en el uso de modelos *in vitro* se presentan en el área médica, para comprender enfermedades y condiciones como la hipertensión, la diabetes, isquemia, Alzheimer o Parkinson, y en el área de biomateriales, entre otras ¹⁹.

La principal ventaja de estos modelos es que ofrecen un ambiente controlado para probar hipótesis celulares y moleculares específicas. El control sobre la influencia del ambiente y de las condiciones fisiológicas resulta en una reducción de la variación y permite la replicación experimental con mayor facilidad. Al usar una combinación controlada de diferentes tipos de células, es posible obtener información valiosa sobre la interacción de las mismas. Otra gran ventaja es la facilidad de los procedimientos experimentales, el diseño de experimentos y los plazos de tiempo de experimentación cortos. En conjunto, las características mencionadas resaltan la conveniencia de experimentar con modelos *in vitro* y recalcan la importancia de los mismos ²⁰.

1.2 ¿Por qué un modelo de endotelio?

El endotelio vascular funciona como un importante órgano autocrino y paracrino que mantiene la homeostasis vascular al modular el tono de los vasos sanguíneos, regula el crecimiento celular local y la deposición de la matriz extracelular (ECM); además controla tanto las respuestas homeostáticas como antiinflamatorias. Las células endoteliales (EC) producen una gran variedad de moléculas vasculoregulatorias y vasculotrópicas que actúan en sitios locales y distantes ²¹. Adicionalmente, la proliferación y función endotelial es importante en diversos procesos como el desarrollo y reparación de heridas ²², y no solo funge como una barrera entre la sangre y los órganos, sino que también juega un papel fundamental en el control de la transferencia de nutrientes, hormonas y células blancas, y está involucrado con el control de la presión arterial, la fluidez de la sangre y las reacciones de coagulación ²³.

Dada su gran importancia en la fisiología humana, se considera a cualquier alteración del endotelio vascular como el evento primario en la patología de enfermedades vasculares y es un blanco crítico para prevenir o ralentizar la progresión de las mismas. La disfunción endotelial es reconocida como el paso inicial en el proceso de aterosclerosis y está bien descrita en pacientes con diversas condiciones como son la diabetes, hipertensión o tabaquismo. También se ha informado que la proliferación del endotelio es un proceso importante en neoplasias como el sarcoma de Kaposi, lo que ha dirigido la atención para considerarlo como un potencial blanco terapéutico para la farmacología y para la terapia génica ²². Por estas razones, el estudio del endotelio humano se ha convertido en tema central en la investigación cardiovascular, y la investigación clínica se ha enfocado en dilucidar el papel de la disfunción endotelial en la progresión de las enfermedades vasculares ²¹. Los métodos capaces de evaluar los cambios en el endotelio vascular y su función en un estado preclínico podrían tener potencial para refinar la estratificación del riesgo cardiovascular y servirían como guía para monitorear los efectos de las intervenciones terapéuticas.

La enfermedad arterial coronaria (CAD) es una afección en la que la placa formada por grasa, colesterol, calcio y otras sustancias presentes en la sangre, se deposita dentro de las arterias coronarias. Estas arterias son las encargadas de suministrar sangre rica en oxígeno al músculo cardíaco. Cuando dicha placa se deposita en las arterias, se desarrolla aterosclerosis ²⁴. Se trata de un desorden inflamatorio que causa el bloqueo (o lesiones) de los vasos sanguíneos. Esto da lugar a que el suministro sanguíneo se vea comprometido en órganos y tejidos, lo que reduce la entrega de oxígeno y nutrientes a las células, induciendo así cambios patogénicos en las funciones de las mismas ²⁵.

Se ha sugerido que las EC tienen la capacidad de reparar el endotelio dañado. Dado que el daño al endotelio es considerado como el paso inicial de las enfermedades cardiovasculares (CVD), estudios funcionales *in vitro* pueden ser usados para examinar el daño al endotelio y su posible reparación, así como evaluar el impacto potencial de la aterosclerosis en estados tempranos y su progresión. Un ejemplo de esto es un modelo de endotelio rasgado, en el cual una monocapa de células endoteliales es dañada utilizando la punta de una pipeta para después observar la migración celular en un microscopio de contraste de fases. Otro ensayo funcional con relevancia en las CVD, es el ensayo de angiogénesis y la evaluación de la unión de plaquetas a un sustrato o a la monocapa endotelial bajo condiciones de flujo. Así mismo, la adherencia de los monocitos al endotelio también ha sido examinada utilizando técnicas *in vitro* ²⁵.

Finalmente, las fuerzas hemodinámicas son el factor determinante de la localización de la placa aterosclerótica. Las fuerzas de rozamiento, generadas por el flujo de sangre sobre las células endoteliales vasculares, juegan un papel fundamental en la regulación del fenotipo del endotelio. Los modelos *in vitro* permiten la exposición de las EC a condiciones de flujo y logran mimetizar las condiciones *in vivo* ²⁶.

2. MODELO ENDOTELIAL

2.1 Cordón umbilical: origen y funciones

El cordón umbilical humano pesa aproximadamente 40 g, alcanza una longitud de 60-65 cm, y tiene un diámetro de 1.5 cm al término del embarazo. Este tejido representa el vínculo entre la madre y el feto durante el embarazo ²⁷. Durante este proceso, el feto y la placenta están conectados por dicho cordón, el cual previene la compresión, torsión y doblamiento de los vasos sanguíneos umbilicales

mientras que provee de buena circulación sanguínea ²⁸.

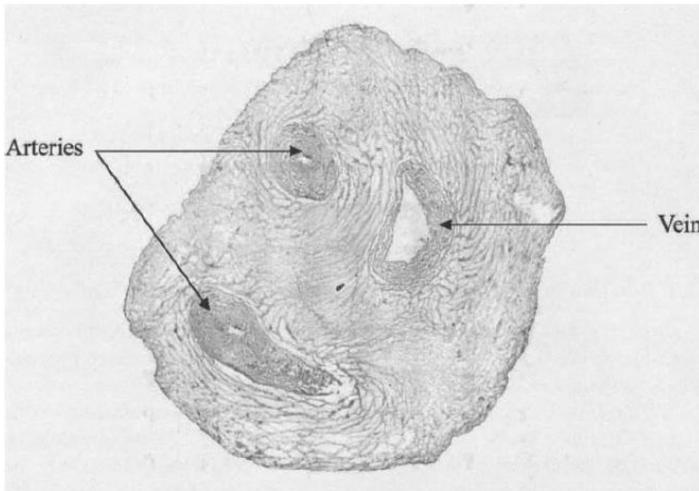


Figura 1. Sección transversal de un cordón umbilical mostrando dos arterias (izquierda) y una vena (derecha), la cual tiene un lumen más grande. Notar que la arteria inferior está seccionada tangencialmente. (Imagen tomada de Larrivé & Karsan 2005).

Dicho tejido se forma a partir de la quinta semana del desarrollo embrionario ²⁹ y consiste de dos arterias umbilicales y una vena (Figura 1), todo embebido en una matriz mucosa de tejido conectivo, rica en proteoglicanos, conocida como gelatina de Wharton (WJ), la cual está cubierta por el epitelio amniótico ²⁸. La WJ, así como los vasos

del cordón, derivan del mesodermo extraembrionario y/o del mesodermo embrionario ³⁰.

La principal función del cordón umbilical es la de llevar oxígeno y nutrientes desde la placenta a la circulación fetal. A diferencia del resto de la circulación en el cuerpo, la vena umbilical humana transporta sangre rica en oxígeno y nutrientes, mientras que las arterias transportan la sangre desoxigenada y los productos de desecho, tales como dióxido de carbono, desde el feto hacia la placenta ^{31, 32}.

2.1.1 Composición del cordón umbilical humano

El cordón umbilical está cubierto con una capa de células epiteliales cúbicas y escamosas llamada epitelio umbilical, el cual se pensaba que derivaba del epitelio amniótico; sin embargo, un reporte sugiere una estructura parcial parecida al epitelio del cordón umbilical y a la epidermis temprana fetal³³. Dichas células epiteliales tienen características funcionales y ultraestructurales similares a las que presentan los queratinocitos; sin embargo, hasta hace poco se demostró que poseen características de células madre (SC)^{27,34}.

La arquitectura del tejido interno está envuelta en una matriz de tejido conectivo mucoso comprendido de células parecidas a fibroblastos especializados y mastocitos ocasionales embebidos en una sustancia amorfa rica en proteoglicanos, principalmente ácido hialurónico. No hay capilares o vasos linfáticos en el cordón^{27,35}.

La WJ parece realizar la función de la adventicia, la cual está ausente en los vasos del cordón, uniendo y encerrando a los mismos. Así mismo, el cordón umbilical humano presenta compartimentalización, por lo que las características celulares de los elementos de la ECM difieren unos de otros. Se reconocen al menos seis zonas, con base en estudios funcionales y estructurales (de afuera hacia adentro)²⁷:

- a) Superficie epitelial (epitelio amniótico, formado de amnioblastos).
- b) Estroma subamniótico.
- c) Hendiduras o fisuras (*clefts*).
- d) Estroma intervascular (WJ).
- e) Estroma perivascular.
- f) Vasos sanguíneos.

Por otra parte, las células estromales del cordón umbilical habían sido reconocidas primero como “fibroblastos inusuales”, dado que poseen características y funciones similares a los fibroblastos. Sin embargo, la presencia de retículo

endoplásmico bien desarrollado con cisternas dilatadas, la presencia de la enzima prolil-4-hidroxilasa (involucrada con la síntesis de colágeno), entre otras evidencias, apoyaron la idea de que las células estromales eran responsables de la síntesis de colágeno y otros componentes de la ECM ^{27,36}.

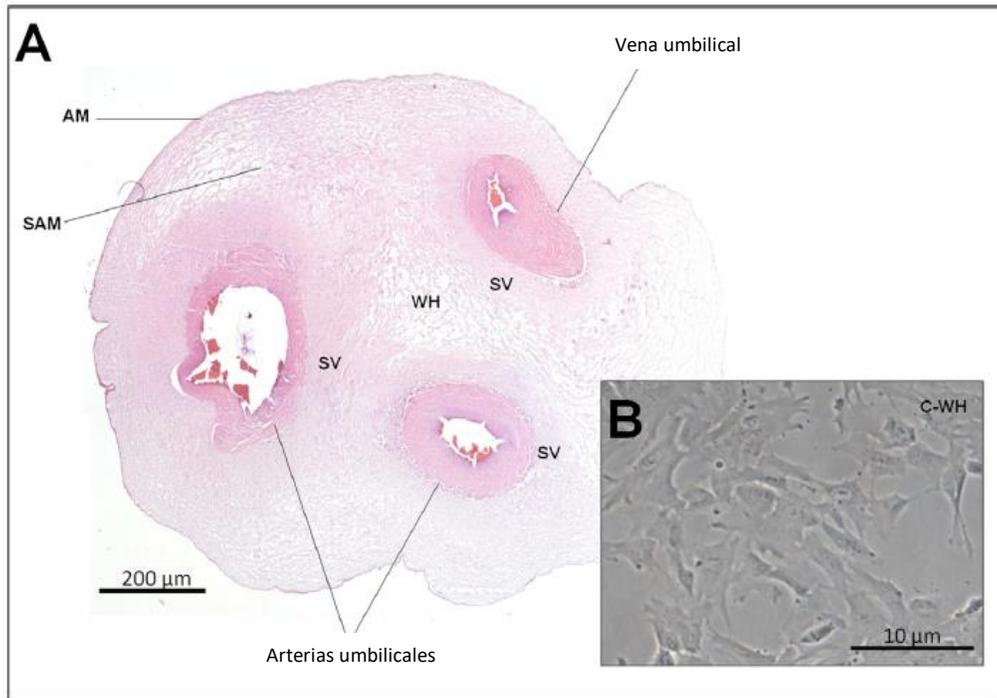


Figura 2. A) Sección del cordón umbilical teñido con hematoxilina y eosina. Identificación de cuatro zonas diferentes en el cordón, alrededor de dos arterias y una vena. SAM: Células localizadas en la zona subamniótica, SV: células localizadas en la zona subvascular, WH: células de la WJ, AM: amnioblastos en la superficie del cordón umbilical. B) Células cultivadas *ex vivo*, obtenidas de la zona WH (Imagen tomada de Garzón et al. 2014) ³⁷.

A su vez, hay tres poblaciones diferentes de células en la WJ: la población de células subamnióticas (SAM), localizada en la capa exterior del tejido mucoso, directamente debajo de los amnioblastos (AM); las células subvasculares (SV), situadas alrededor de los vasos sanguíneos del cordón y las células remanentes, localizadas por debajo de la región de células subamnióticas y entre las regiones de las células subvasculares. Estas últimas son las células madre de la WJ (WH) ³⁷ (Figura 2).

Las células madre mesenquimales (MSC) primitivas se encuentran atrapadas en el tejido conectivo de la matriz, en la WJ, y tienden a migrar a la región aorta-gónadas-mesonefros durante la embriogénesis ³⁸. La función de estas células en el cordón umbilical es la de secretar varias glicoproteínas, mucopolisacáridos, glic amino glicanos y proteínas de la ECM para formar la sustancia gelatinosa que ayuda a prevenir la estrangulación de los vasos durante el embarazo. Las células endoteliales se encuentran distribuidas en la región intravascular del cordón, mientras que las células epiteliales conforman el resto del tejido ²⁸.

2.1.2 Métodos de aislamiento de las células del cordón umbilical

Se pueden aislar MSC de forma no enzimática realizando un corte longitudinal para exponer la WJ. El cordón es entonces transferido a una caja Petri, donde es mantenido con algún medio de cultivo (medio modificado de Eagle, por ejemplo). Posteriormente, éste es incubado por un tiempo y a continuación, el cordón es descartado y el medio renovado ³⁹.

Otra técnica utilizada es cortar el cordón en segmentos pequeños (1 a 2 mm³) sin remover los vasos sanguíneos, y sembrar directamente en una caja Petri. También es posible utilizar enzimas (colagenasa D, principalmente), para lo cual es necesario cortar el cordón en segmentos finos, incubar toda una noche en una solución de colagenasa, y posteriormente en una solución de tripsina-EDTA. Acto seguido, el tejido es retirado y el medio reemplazado ³⁹.

Las células epiteliales del cordón pueden ser aisladas por disociación enzimática, cortando el tejido en pequeños segmentos y posteriormente tripsinizándolo. En seguida, las células se siembran en medio libre de suero (SFM) para queratinocitos humanos ³³. Finalmente, el aislamiento de las células endoteliales de los vasos sanguíneos del cordón umbilical se discute posteriormente (Sección 3. Aislamiento y cultivo de células endoteliales de la vena umbilical humana).

2.2 Antecedentes

En 1922, Warren H. Lewis describió la dificultad de identificar los diferentes tipos

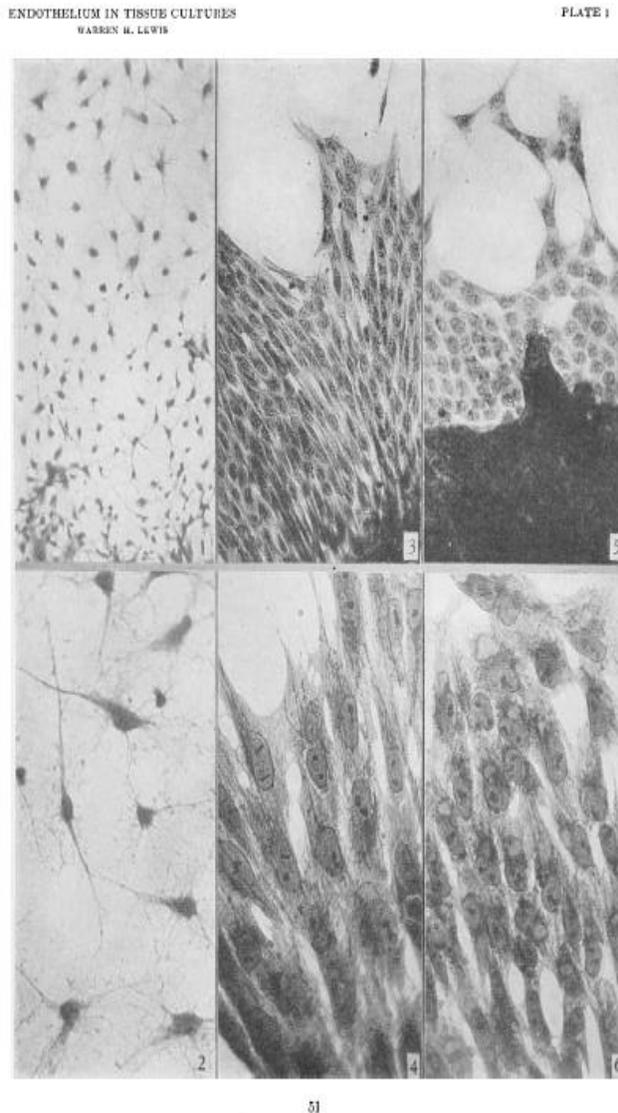


Figura 3. Endotelio de cultivo de tejido (Imagen tomada de W. Lewis, 1922⁴⁰).

Lámina 1.

1. Cultivo 708. Tejido subcutáneo, embrión de 8 días; cultivo de 2 días; pH 7.6; verde de janus, iodo. x 146.
2. Mismo cultivo. x 480
3. Cultivo 667. Endotelio de hígado, embrión de 7 días; cultivo de 3 días; verde de janus, iodo. x 146
4. Mismo cultivo. x 480
5. Cultivo 666. Endotelio de hígado, embrión de 5 días, cultivo de 4 días; pH 6.5, verde de janus, iodo. x 146
6. Mismo cultivo. x 480.

celulares que crecían en explantes de tejidos embrionarios. Si bien había ciertos tejidos que se habían podido identificar con facilidad, como fibras nerviosas del sistema central, el epitelio de la retina o músculo esquelético, la terminología empleada resultaba sumamente confusa. Se utilizaban de manera indistinta términos como *tejido conectivo*, *mesénquima* o *fibroblasto* para designar a los crecimientos reticulares en los cultivos de tejidos, debido a que no había seguridad de la identidad exacta de los mismos. El uso de esta terminología implicaba que muy probablemente se tenían diferentes tipos celulares en un mismo cultivo (mesénquima, tejido conectivo, endotelio, mesotelio, etc). Por ello, en su trabajo titulado *Endothelium in tissue culture* (1922), Lewis aporta consideraciones en torno a la identificación de crecimiento endotelial en explantes de hígado de pollo embrionario (Figura 3).

Probablemente éste fue el primer trabajo en identificar células endoteliales y en describir de forma detallada, el comportamiento de su crecimiento y algunas propiedades físicas; además, Lewis realizó comparaciones con otras células del tejido y detalló diversas estructuras celulares, como la mitocondria, los gránulos y vacuolas, el núcleo y centríolo, entre otras ⁴⁰.

Posterior a éste, comenzaron a surgir otros trabajos que involucraban el estudio del endotelio, no obstante, todos ellos realizados en modelos *in vivo*, o bien, en órganos procedentes de cadáveres (tanto de humanos como de animales). Tal es el caso del estudio de contracción endotelial inducido por mediadores de tipo histamina realizado en escroto de rata ⁴¹, o el estudio de los llamados cuerpos de Weibel-Palade, para el cual se utilizaron pulmones de rata y otros órganos que incluyen la tiroides, el páncreas, el intestino y el corazón ⁴².

Cabe mencionar que además del uso de estos sistemas complejos, existían modelos para el estudio del endotelio; sin embargo, no mimetizaban los efectos en humanos. Un buen ejemplo son los modelos hemostáticos, utilizados para el estudio de la adhesión plaquetaria, los cuales utilizaban fibras de colágeno, ya que el tejido conectivo –de acuerdo con el autor- era el primero en quedar desprotegido tras la descamación del endotelio ⁴³. Adicionalmente, se han descrito ensayos de proliferación de EC en ratones con técnicas de tinción y autorradiografía con timidina ⁴⁴ y sólo un ensayo dedicado al estudio de la ultraestructura del endotelio de los vasos del cordón umbilical humano durante el embarazo ⁴⁵.

Pese a los esfuerzos realizados, el uso de estos modelos resultaba muy complicado y poco eficiente, ya que presentaban un gran número de desventajas, entre las cuales destacan la viabilidad después de la muerte del donador, que era limitada, y la dificultad para obtener una población homogénea de células, pues se carecían de métodos citológicos de identificación confiables ⁴⁶.

2.3 Origen del modelo

El cultivo de células endoteliales fue descrito por primera vez hace más de cuatro décadas ^{21,47,48}, dando lugar así al auge en la investigación de la biología vascular, y que más tarde traería consigo una visión más amplia de procesos como la angiogénesis, vasculogénesis y la biología de tumores. El trabajo que lleva por título *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria*, realizado por Jaffe y colaboradores (1973) ⁴⁹, tuvo un efecto catalítico en el crecimiento y desarrollo del campo de la biología vascular al desarrollar un enfoque factible para la obtención de las células endoteliales, utilizando una fuente de fácil acceso de tejido humano (las venas umbilicales) para crecer una población homogénea de células, empleando como marcador definitivo el factor de von Willebrand (vWF) ⁵⁰. Un año más tarde, apoyados en el trabajo de Yuji Maruyama (1963) (citado por Gimbrone ⁵¹), Michael Gimbrone y colaboradores publican en 1974 un reporte en el que establecen cultivos primarios y subcultivos de células endoteliales de la vena del cordón umbilical humano, así como la caracterización del comportamiento del crecimiento de la población celular ⁵¹.

Entre las décadas de 1960 y 1970, inició una nueva era en el estudio de la biología de la homeostasis. Así mismo, el papel que jugaban las plaquetas en la coagulación y en la regulación de la formación de trombos, enfocaba la atención hacia la pared de los vasos sanguíneos y, específicamente, a las células endoteliales presentes en ésta. El trabajo de Eric A. Jaffe y colaboradores ⁴⁹ fue el primer trabajo exitoso enfocado en el aislamiento y caracterización de las células endoteliales obtenidas de la vena de cordón umbilical (Figura 4). Se tienen registros de

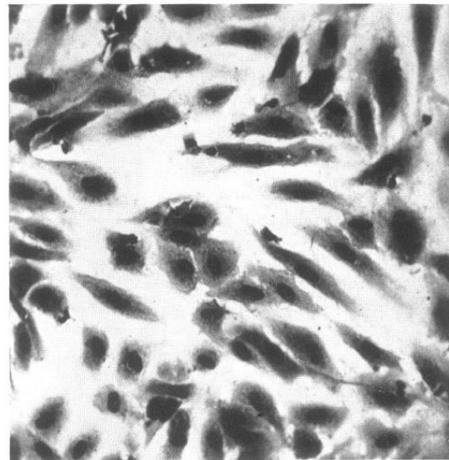


Figura 4. Fotomicrografía de un cultivo de células endoteliales de 5 días (Imagen tomada de Jaffe y cols., 1973) ⁴⁹.

intentos previos a su trabajo como es el caso de Lazzarini Robertson (citado por Vaccaro ⁵²), que en 1959 cultivó algunas células endoteliales de explantes arteriales ⁵². Posterior a este trabajo, aparecieron otros estudios que involucraban el cultivo de órganos; sin embargo, resultaba particularmente difícil la identificación de las células endoteliales de la íntima bajo las condiciones en las cuales se llevaban a cabo dichos ensayos ⁴⁷.

Yuji Maruyama (citado por Jaffe ⁴⁹) fue el primero en reportar un cultivo de células endoteliales de la vena umbilical humana, mejor conocidas como HUVEC (debido a sus siglas en inglés: *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*); sin embargo, éstas no habían sido del todo identificadas, lo que llevó a pensar que podía tratarse de fibroblastos ⁴⁹. Bajo estas premisas, Jaffe y colaboradores (1973) ⁴⁹ fijaron los probables inicios de la biología vascular moderna, pues no sólo fueron capaces de aislar una población de células endoteliales relativamente pura a partir de un tejido de fácil acceso, en este caso de la vena del cordón umbilical, sino que describen de forma explícita y detallada la identificación de las mismas (Figura 4) ⁴⁹.

La trascendencia de su trabajo radica en que, a la fecha, las EC son consideradas la base en la fisiopatología de la trombosis, ya que llevan a cabo interacciones no trombogénicas con las plaquetas a través de CD39, óxido nítrico (NO) y eicosanoides, y además desarrollan funciones en la célula que regulan la expresión de moléculas de adhesión celular y la liberación de factores y proteínas, todas ellas en relación directa con la trombosis y su fisiopatología ⁴⁷.

2.4 Generalidades del modelo

El uso de modelos *in vitro* ofrece información valiosa sobre los mecanismos llevados a cabo en el desarrollo y progresión de enfermedades como la aterosclerosis, antesala de la CAD, además de proveer plataformas eficientes para el tamizaje de diversos fármacos. Con estos modelos, los efectos sistémicos son removidos. Así, por diseño, los modelos *in vitro* permiten estudiar el tejido de interés, dejando de lado al resto del organismo. Estos modelos, siendo sistemas menos complejos que los modelos *in vivo*, pueden proveer ciertas ventajas como la habilidad de manipular y reproducir los mecanismos de diversas enfermedades utilizando técnicas avanzadas de biología molecular ²⁵.

Como se observa en la Tabla 2, tras el establecimiento de un protocolo para el aislamiento y conservación de células endoteliales, surgieron otros trabajos enfocados al estudio de las propiedades de estas células, pues se volvió evidente que las EC son altamente activas metabólicamente y juegan un papel muy importante en la síntesis de varias sustancias de importancia biológica. Anormalidades en su estructura y función podrían contribuir de manera significativa en un número importante de enfermedades, no sólo vasculares como la aterosclerosis, trombosis o coagulación intravascular diseminada, sino también en inflamación, distribución de complejos inmunes, esparcimiento de tumores y metástasis, entre otras ⁴⁶.

Tabla 2. Primeros estudios realizados a las células endoteliales humanas (HEC) tras el establecimiento del método para el aislamiento y mantenimiento de células endoteliales *in vitro*.

Nombre del estudio	Resumen
Síntesis del antígeno del factor anti hemofílico por células endoteliales humanas en cultivo ⁴⁹ .	Se demostró la presencia del antígeno del AHF en células endoteliales <i>in vitro</i> mediante inmunofluorescencia, a diferencia de las células del músculo liso y fibroblastos, donde está ausente.
Cultivo a largo plazo de capilares de células	Se desarrolló un método que permitió la producción de capilares de células endoteliales que pueden ser usados en

endoteliales ⁵³ .	el estudio de la angiogénesis de tumores, mecanismos metastásicos y el papel del endotelio capilar en otros estados patológicos.
Propagación serial de HEC <i>in vitro</i> ⁵⁴ .	Se cultivaron HEC de 15 a 21 resiembras a una tasa de crecimiento de 1:5 en una matriz de fibronectina en medio 199 suplementado con SFB y GEF. Además de retrasar la senescencia prematura, el GEF redujo el requerimiento de SFB para un crecimiento de baja densidad celular.
Inmunolocalización de la proteína de von Willebrand en cuerpos de Weibel-Palade de HEC ⁵⁵ .	El marcaje inmunofluorescente de EC cultivadas reveló la presencia de la proteína de von Willebrand en la región perinuclear, en pequeñas estructuras similares a varillas, en el citoplasma y en filamentos de la ECM. Esto sugirió que los cuerpos de Weibel-Palade de las EC son organelos de proceso y almacén de la proteína de von Willebrand.
Las HEC generan factor tisular en respuesta a endotoxina ⁵⁶ .	La infección bacteriana estaba asociada a la coagulación intravascular diseminada y a la deposición de fibrina en la microcirculación; los mecanismos de estos efectos en humanos no eran claros, por lo que se estudió la generación de actividad procoagulante en cultivos de EC en respuesta a endotoxinas.
HEC: Uso de heparina en clonación y para cultivos seriales de largo plazo ⁵⁷ .	Cepas de HEC clonadas fueron establecidas por primera vez, con una capacidad similar de proliferación a las HEC. El vigoroso crecimiento endotelial obtenido se atribuye a la adición de heparina al medio de cultivo reducido en GEF. Esto facilitó posteriormente el estudio del endotelio.
Las EC cultivadas sintetizan factor activador de plaquetas	Las HEC sintetizan prostaciclina al ser estimuladas con histamina, bradicinina o ATP. Sin embargo, dichos agonistas también inducen una síntesis rápida y sostenida

<p>y prostaciclina en respuesta a histamina, bradicinina y adenosín trifosfato ⁵⁸.</p>	<p>del PAH. Si bien este último no funciona como hormona, su asociación prolongada con las EC pudiera mediar algunas propiedades inflamatorias de los agonistas mencionados, lo que pudiera ser un factor en la formación de una superficie trombogénica, y posterior desarrollo de trombosis y aterosclerosis.</p>
<p>La inducción de trombina del activador/inhibidor de plasminógeno en cultivos de HEC ⁵⁹.</p>	<p>Se encontró que concentraciones fisiológicas de trombina incrementan tanto al activador de plasminógeno como al activador/inhibidor del mismo en medio condicionado por EC de vena umbilical humana, lo que sugería que el efecto neto de la trombina es disminuir la actividad fibrinolítica de las HEC.</p>
<p>La hipoxia induce la producción de factor de crecimiento endotelial vascular en cultivo de HEC ⁶⁰.</p>	<p>Se determinó si el papel de las HUVEC, bajo ciertas condiciones, pudiera extenderse más allá de la síntesis del VEGF.</p>
<p>La eritropoyetina humana induce un fenotipo pro angiogénico en cultivos de EC y estimula la neovascularización <i>in vivo</i> ⁶¹.</p>	<p>Este estudio demostró la habilidad de la eritropoyetina para interactuar de forma directa con las EC, al utilizar una línea inmortalizada de EC proveniente de HUVEC.</p>

Abreviaturas. AHF: factor anti-hemolítico, ATP: adenosín trifosfato EC: células endoteliales, ECM: matriz extracelular, GEF: factor de crecimiento, HEC: células endoteliales humanas, HUVEC: células endoteliales de la vena umbilical humana, PAH: factor activador de plaquetas, SFB: suero fetal bovino, endotelial, VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

2.5 Primeros años del uso de células HUVEC como modelo *in vitro*

Un estudio realizado por Peter J. Quesenberry y Michael A. Gimbrone en 1980 ⁶² reveló que las células endoteliales provenientes de la vena del cordón umbilical humano fueron por primera vez utilizadas como modelo *in vitro* para evaluar la capacidad del endotelio vascular de producir actividad estimuladora de colonias. De acuerdo con estos autores, el desarrollo de técnicas que permitían el aislamiento selectivo de poblaciones homogéneas de células endoteliales humanas, favoreció el uso de las células HUVEC como modelo *in vitro* para el estudio de la fisiología del endotelio ⁶².

Seis años después, apareció otra publicación en la que se llevó a cabo un estudio de la vasopermeabilidad incrementada. De acuerdo con este trabajo, los mecanismos de los cambios en la permeabilidad vascular, no se comprendían en aquel entonces, por lo que se decidió utilizar como modelo *in vitro* un cultivo de células HUVEC para dilucidar el papel del endotelio en el control de los cambios en la vasopermeabilidad. Según los autores, este modelo es un análogo de las técnicas *in vivo* para evaluar los cambios en la permeabilidad en respuesta a la administración de mediadores locales, al medir la unión sistemática del azul de Evans en las monocapas endoteliales, desde el compartimento vascular en el tejido circundante ⁶³.

Para 1987, se proponían a las células HUVEC como un modelo para entender la patogénesis de la aterosclerosis. En dicho trabajo ya se reportaba el daño endotelial como un evento temprano en el desarrollo de la lesión aterosclerótica y se presentó una recopilación de métodos necesarios para establecer modelos *in vitro* que permitieran el estudio de las enfermedades cardiovasculares ⁵².

En otro trabajo se propuso un modelo de trombosis que se enfocaba en el estudio del efecto de la activación de células HUVEC y la subsecuente síntesis de factor tisular en la formación de trombos en la ECM en sangre que fluye. Se reportó este nuevo modelo *in vitro* como una herramienta útil para el estudio de la regulación

de la trombogenicidad de la pared capilar en respuesta a varios estímulos ⁶⁴. Cabe mencionar que los autores de este trabajo fueron los primeros en utilizar la abreviatura *HUVEC* para este tipo de células, ya que si bien desde la publicación del trabajo de Jaffe se utilizaban células endoteliales provenientes de la vena del cordón umbilical humano, hasta entonces se nombraban como células endoteliales humanas^{55,56,58,62} o células endoteliales vasculares ⁵³, o células endoteliales de la vena umbilical humana, HUVE ⁶³ o HUV ⁵⁷.

En 1994 se utilizaron a las células HUVEC como un modelo de inflamación, al investigar la regulación de la expresión del factor de células madre (SCF) por estímulos inflamatorios. De acuerdo con el informe, estas células fueron elegidas debido a que se sabía que el endotelio humano expresaba dicho factor de manera constitutiva, además de que la IL-1 β era capaz de incrementar la expresión de mRNA del SCF en dichas células ⁶⁵.

Adicionalmente, en 1998 se proponen a estas células como un modelo *in vitro* para estudiar el impacto inmunológico de la infección por citomegalovirus (CMV) en EC, resaltando el hecho de que el endotelio vascular representa la interfase anatómica y funcional entre los componentes inmunes y los tejidos subyacentes. Por ello, el endotelio surgió como un participante dinámico e interactivo en la inmunomodulación. Para ese entonces ya se sabía que las EC eran capaces de regular la migración leucocitaria, expresaban moléculas de antígenos leucocitarios humanos (HLA) y presentaban antígenos, respondían a la inmunomodulación de citocinas y expresaban moléculas inmunoreactivas de adhesión. También estaba bien documentado que las EC eran el blanco más común para la infección por CMV *in vivo* ⁶⁶.

En el año 2000 se publicó otro trabajo que propuso a las células HUVEC como un modelo *in vitro* de angiogénesis, al estudiar los mecanismos del factor de crecimiento insulínico tipo II (IGF) en la regulación de la angiogénesis. En estudios previos se había descrito que el IGF-II secretado de carcinomas hepatocelulares

funcionaba como un factor angiogénico al incrementar la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Así, en este trabajo demostraron que el IGF-II induce el proceso de angiogénesis al estimular la migración de las EC y la formación de capilares; así mismo, dicho factor estimuló la invasividad de las células HUVEC hacia la membrana basal, a través de la expresión de la enzima proteolítica MMP-2⁶⁷.

Finalmente, también en el año 2000 se publicó por Kahn J. y colaboradores⁶⁸ un trabajo donde se determinaron perfiles diferenciales de expresión génica de las EC que llevan a cabo la diferenciación a estructuras capilares. Para ello utilizaron como modelo a las células HUVEC, con el fin de identificar una huella molecular o un perfil transcripcional de la diferenciación endotelial a estructuras capilares, utilizando la técnica de *GeneCalling*, la cual mide niveles de cDNA, que correlacionan con los niveles de expresión génica de transcritos específicos y se basa en la visualización de la transcripción acoplada a una consulta en bases de datos para la identificación rápida y cuantitativa de los transcritos expresados diferencialmente⁶⁸.

2.6 Actualidad

El endotelio vascular, que recubre el interior de los vasos sanguíneos, es uno de los tejidos secretorios más grandes del cuerpo humano. Por ello, el entendimiento de la biología celular y molecular de las células endoteliales es esencial en el desarrollo de nuevos enfoques tanto para la prevención como para la terapia de CVDs. Hoy en día, las EC son consideradas constituyentes de un tejido metabólico que regula una gran variedad de respuestas biológicas y fisiológicas; tienen una gran capacidad de síntesis y representan alrededor de 750 g de la masa total del cuerpo humano ⁶⁹.

En el campo de la biología vascular, las células endoteliales más ampliamente estudiadas son las HUVEC, debido a que el tejido del que provienen se puede obtener con gran facilidad y son relativamente fáciles de aislar y de cultivar. En consecuencia, existe mucha literatura de la biología de estas células y en numerosos ensayos se ha demostrado que estas células se comportan de manera muy similar a las EC aisladas de otros tejidos vasculares ⁷⁰.

Desde que se hizo público el método para el aislamiento de las células HUVEC, se realizaron un número importante de ensayos para conocer más a fondo sus propiedades. El trabajo pionero de Folkman y colaboradores (citado por Vailhé ⁷¹) estableció en 1995 el concepto de que el desarrollo de tumores es dependiente del proceso de angiogénesis, y marcaron el camino en la identificación de varias moléculas angiogénicas, incluyendo las familias del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y del VEGF. Así mismo, se realizaron experimentos de genes *knock out* que enfatizaron la importancia del VEGF, y sus receptores VEGF1 y VEGF2 durante la vasculogénesis embrionaria. También se llevaron a cabo otras investigaciones que llegaron a la conclusión de que varios factores de transcripción, incluyendo el Ets-1 y Vezf-1 participan en el acoplamiento de angioblastos hacia células endoteliales; que el factor de crecimiento transformante (TGF)- β , el factor de crecimiento derivado de plaquetas con dos cadenas B (PDGF)-BB, la angiopoyetina 1 y sus respectivos receptores, son esenciales para

la estabilización de la fase del brote angiogénico; que algunas integrinas también están involucradas en la morfogénesis vascular; y que las moléculas de adhesión interendoteliales, cadherina endotelial vascular (VE-cadherina) y la molécula de adhesión de plaquetas y células endoteliales (PECAM)-1, también parecen ser esenciales para el proceso de angiogénesis ⁷¹.

En años recientes, gracias a la integración de los conocimientos publicados, se ha hecho un gran avance en el descubrimiento de los diferentes componentes moleculares de las EC y su relación con diversos desórdenes vasculares. A continuación se presentan algunos de los trabajos más destacados de los últimos 5 años (2011-2016):

En 2011, Starke y colaboradores ⁷² definieron una nueva función del vWF al proponer un mecanismo para la regulación de la angiogénesis mediada por el mismo, y confirmando que se trata de una proteína vascular multifuncional. Los autores encontraron que el VEGF y las angiopoyetinas (Ang), a través del regulador VEGF-A, dirigen vías de señalización que promueven la migración y proliferación de las EC, además de la formación de capilares. Por otra parte las Ang-1 y Ang-2 actúan en los estados tardíos de la formación de vasos sanguíneos, al unirse al receptor Tie-2, y resultan esenciales en la maduración de la red vascular y en el mantenimiento de la integridad endotelial. Además, existe una proteína de la superfamilia de las integrinas, la $\alpha\beta_3$, que participa en el proceso de angiogénesis mediante la unión de dos ligandos, uno de los cuales es el vWF, el cual media la adhesión plaquetaria tanto de la matriz subendotelial como de las superficies endoteliales y actúa como un acarreador del factor de coagulación VIII en la circulación. Su deficiencia causa la enfermedad de von Willebrand, mientras que niveles elevados de este factor están asociados a la trombosis coronaria aguda, por lo cual se ha considerado un marcador clínico de riesgo asociado a la aterosclerosis ⁷².

En el mismo año, Tammali y colaboradores ⁷³ propusieron el uso de células HUVEC como modelo para investigar el papel de la aldosa reductasa (AR. EC. 1.1.1.21) como mediadora de los signos de angiogénesis en modelos *in vitro* e *in vivo*, en un contexto que involucra los mecanismos quimiopreventivos en cáncer de colon. Durante este proceso, las interacciones de las células tumorígenas con las células del endotelio vascular conducen a la liberación de varios factores de crecimiento, citocinas, quimiocinas, etc; las células endoteliales asociadas al microambiente del tumor son genéticamente inestables y presentan una respuesta exagerada a factores de crecimiento como VEGF, FGF o EGF. Por otra parte, el endotelio vascular es el principal blanco de oxidantes inflamatorios (como especies reactivas de oxígeno incluyendo peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo). Por lo tanto, la terapia anti-angiogénica mediante el uso de antioxidantes, representa uno de los enfoques más prometedores en el control del crecimiento tumoral, invasión y angiogénesis. En estudios recientes se ha descrito que la AR de la vía de los polioles es un regulador capaz de activar la vía de NF- κ B, así como de moléculas de adhesión inducidas por citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF)- α . Debido a que la vía de NF- κ B juega un papel importante en el proceso de angiogénesis al regular la transcripción de factores de crecimiento angiogénicos (como VEGF y FGF), se creía que la inhibición de la AR podría inhibir el proceso de formación de capilares a partir de capilares existentes; los resultados de estos ensayos confirmaron esto tanto *in vivo* como *in vitro* ⁷³.

En el 2012 se publicó un artículo donde se utilizaron a las células HUVEC como modelo vascular *in vitro* al estudiar cómo la atorvastatina afecta el proceso de sanación de heridas de células endoteliales ⁷⁴. Para este entonces, ya se había demostrado que las estatinas mejoraban el flujo sanguíneo coronario dependiente de células endoteliales y reducían la expresión de moléculas de adhesión y citocinas inflamatorias; además, los efectos benéficos de este fármaco estaban relacionados con el incremento en la biodisponibilidad del NO. A bajas concentraciones, las estatinas estimulan la proliferación y migración celular; con altas concentraciones de las mismas se observa el efecto contrario. Por ello, este

estudio se enfocó en examinar cómo la exposición aguda de atorvastatina, a dosis relevantes clínicamente, afecta el proceso de sanación de heridas del endotelio vascular. Finalmente, los autores concluyen que dicho fármaco no afecta la capacidad de sanación de heridas de las células endoteliales, pero es capaz de disminuir la producción de citocinas inflamatorias ⁷⁴.

Otra aportación importante al campo de la biología vascular es la descrita por Siemerink y colaboradores (2012) ⁷⁵, los cuales se dieron a la tarea de caracterizar a las células endoteliales que expresaban el marcador CD34, el cual es una glicoproteína transmembranal altamente glicosilada de la superficie celular, en monocapas celulares *in vitro*. La promoción de la expansión de la red vascular, así como el proceso de angiogénesis, requieren de un conjunto de células endoteliales especializadas (*tip cells*), mientras la mayoría de las células permanecen quiescentes en los vasos capilares pre-existentes. Dichas células especializadas comprenden una subpoblación distinta de células endoteliales con una firma molecular única, por lo que constituyen un blanco para las terapias pro y anti-angiogénicas. De acuerdo con el estudio, las células HUVEC positivas para CD34 presentan una baja actividad proliferativa e incrementan la expresión de mRNA para todos los marcadores de células especializadas, en comparación con las células CD34 negativas. Estas últimas están enriquecidas con funciones relacionadas a la proliferación, en tanto se ha demostrado un enriquecimiento de las células CD34+ en funciones biológicas relacionadas a la angiogénesis y migración ⁷⁵.

La electrocirugía ha sido una herramienta novedosa y de rutina utilizada en procedimientos quirúrgicos invasivos para provocar la división del tejido. Sin embargo, se habían suscitado diferentes respuestas inflamatorias y no se comprendía del todo si estas intervenciones eran las responsables de la respuesta inmune de los pacientes. Por ello, se propuso el uso de células HUVEC como modelo *in vitro* de daño termomecánico, para simular el daño celular causado por la cauterización, como un modelo alternativo a los modelos *in vivo* usados para el

estudio de sanación de heridas después de la fusión del tejido. Así, este modelo se caracteriza por la formación localizada de zonas dañadas altamente reproducibles, en donde el daño termomecánico infringido da lugar a una respuesta celular que finalmente resulta en la adhesión de células mononucleares sin el uso adicional de citocinas. Por esto mismo, el modelo resulta adecuado para investigar moduladores en los estados iniciales de la reparación de heridas después de daño térmico ⁷⁶.

Otro estudio publicado en 2015 ⁷⁷, cuyo propósito era analizar las propiedades angiogénicas de un exopolisacárido (EPS) producido por una nueva cepa bacteriana aislada de *Sarcodon aspratus*, utilizó células HUVEC como modelo angiogénico. Se sabe que este proceso se refiere al crecimiento de nuevos vasos capilares a partir de vasos preexistentes, aunque también puede ser inducido por algunos componentes de la ECM como colágeno y fibronectina, a través de interacciones entre integrinas y proteínas de la superficie celular. Recientemente se ha demostrado que el EPS exhibe actividad inmunomoduladora vía la estimulación de la producción de citocinas como TNF- α , interleucina (IL)-1 β y NO, y se desconocía su actividad angiogénica. La conclusión del estudio refiere que el EPS aumenta la fosforilación de la cinasa relacionada con la señal extracelular (ERK), de la cinasa N-terminal c-Jun (JNK) y de p38, los cuales son proteincinasas activadas por mitógenos. Adicionalmente, la expresión de p21 y la molécula de adhesión intracelular 1 (ICAM-1), así como la fosforilación del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) estaban incrementados, demostrando así su actividad angiogénica al incrementar procesos como la proliferación celular, migración y formación de capilares ⁷⁷.

Finalmente, en el último año se han publicado estudios donde la función vascular es estudiada para el entendimiento de otros desórdenes, tales como cáncer o diabetes. Así mismo, se han propuesto diversos modelos 3D que permiten la representación del microambiente en el que se desarrollan dichas afecciones. De acuerdo con la información presentada por Roudsari y West (2016) ⁷⁸, una de sus

aplicaciones más relevantes se centra en el estudio de la angiogénesis en modelos *in vitro* de cáncer. En este contexto, está bien documentado que el crecimiento tumoral requiere de la vascularización de tejidos; así mismo, este proceso es la ruta a seguir para el desarrollo de metástasis a órganos distantes. Por ello se han desarrollado modelos 2D y 3D que permitan dilucidar los diferentes mecanismos involucrados. Existen modelos que utilizan células HUVEC, principalmente en ensayos de proliferación, migración, vascularización tumoral y angiogénesis de tumores. Estos últimos modelos pueden fabricarse en 2D, con cocultivos de células cancerosas, fibroblastos o queratinocitos, entre otras; o 3D, utilizando sistemas de hidrogel, Matrigel, o capas de colágeno y ECM ⁷⁸.

3. AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CÉLULAS ENDOTELIALES DE LA VENA UMBILICAL HUMANA

El endotelio fue alguna vez visto como una capa pasiva de células formando una barrera entre la sangre y los tejidos, y ahora es considerado de gran relevancia por actuar como un órgano de distribución, cuyas funciones son críticas para la homeostasis. Las EC se alinean en el lumen de los vasos sanguíneos, y debido a su posición, son las únicas células del cuerpo que forman una interfase entre un tejido que fluye a una relativa alta presión (sangre), y un sustrato sólido (la pared capilar). El endotelio está involucrado en muchos procesos críticos, como el mantenimiento del tono vascular, actuando como una barrera selectiva y permeable, regulando la coagulación y la trombosis y dirigiendo el paso de los leucocitos a las áreas de inflamación. Para entender mejor el papel de las células endoteliales en estados normales y patológicos, los investigadores se han dado a la tarea de aislar endotelio microvascular y macrovascular, tanto de animales como de vasos humanos, incluyendo las células HUVEC. Dichas células han sido ampliamente estudiadas, por lo que mucho de nuestro conocimiento del endotelio se deriva del uso de éstas ⁷⁹.

3.1 Primeras técnicas de aislamiento de células endoteliales de la vena umbilical humana

Como ya se describió en secciones anteriores, el aislamiento de células endoteliales de la vena umbilical humana revolucionó la biología vascular, permitiendo grandes avances en los campos de la medicina y farmacología, por mencionar algunos. El cultivo de EC inició en el siglo XX, con los trabajos de Lewis y, posteriormente, de Maruyama; sin embargo fue Eric A. Jaffe quien logró un aislamiento exitoso y estableció por primera vez métodos para la identificación de los cultivos por medio de criterios morfológicos, inmunohistológicos y serológicos.

Para la época del primer aislamiento de células HUVEC (1973) ⁴⁹, Jaffe y colaboradores planteaban dos problemas respecto al cultivo de EC: la imposibilidad de mantener un cultivo de EC puro durante un tiempo razonable y la inhabilidad de identificar el cultivo como células endoteliales ⁴⁹. Era evidente que el equipo de trabajo carecía de experiencia en este tipo de trabajo experimental; cabe mencionar la participación de Karen Artz, estudiante graduada de la universidad de Cornell, quien les mostró los aspectos más relevantes del tema ⁴⁷. Así fue que se estableció la técnica descrita a continuación:

Un extremo del cordón umbilical es canulado con una aguja de calibre 14, asegurada con hilo Nylon. A continuación, la vena es perfundida con 100 mL de buffer de cordón (ver Tabla 3) para eliminar restos de sangre y drenar el vaso. El otro extremo del cordón es canulado con una aguja calibre 12. Después, la vena es perfundida con 10 mL de colagenasa al 0.2%, diluida en buffer de cordón, y posteriormente el cordón es colocado en un baño de agua con el mismo buffer, e incubado a 37°C por 15 minutos. Pasado este tiempo, se drena la solución de colagenasa (que contiene las células endoteliales) introduciendo 30 mL de buffer de cordón a la vena. El efluente es colectado en tubos estériles de 50 mL que contienen 10 mL de medio 199 enriquecido con suero fetal bovino (SFB) al 20%. Las células son sedimentadas a 250 g por 10 minutos y lavadas con 20 mL de medio 199 enriquecido. Finalmente, el pellet es resuspendido en 5 mL de medio

de cultivo fresco. El rendimiento de este procedimiento está en el rango de $0.5-1.5 \times 10^6$ células por cordón.

Tabla 3. Condiciones de aislamiento y cultivo según diferentes autores.

Adaptación del cordón	Perfusión de la vena	Concentración y volumen de colagenasa	Tiempo y condiciones de incubación	Condiciones de centrifugación	Medio de cultivo	Referencias
Canulado con agujas.	Amortiguador de cordón.	0.2%, 10 mL.	15 min, 37°C	250 g, 10 min.	Medio 199 (TC 199) enriquecido con SFB al 20%.	49
Canulado.	Solución de Ringer Lactato, Amortiguador salino de fosfatos Dulbecco, Solución salina balanceada de Hank.	1mg/mL.	10-20 min, 37°C.	200 g, 5 min.	Medio 199 o Medio Dulbecco-Vogt.	51
Canulado por ambos extremos.	Solución de fosfatos.	0.2%.	10 min, 37°C.	200 g, 10 min.	Medio 199 o RPMI con 25mM de buffer HEPES, enriquecido con SFB al 20%.	80
No se menciona.	Solución salina de Hanks.	1 mg/mL.	20-30 min, 37°C.	1000 rpm, 5 min.	Medio mínimo esencial de Eagle enriquecido con SFB al 10%.	81
Canulado.	Medio M199.	22U/ 100 mL, 10-12 mL.	7 min, 37°C (en baño de agua).	1500 rpm, 5 min.	M199 enriquecido con SFB al 20%.	82
Canulado.	PBS.	10 mg/mL (en 2/3 de	20-25 min, 37°C.	1500 rpm, 15 min.	M199 enriquecido con	83

		dispasa II).			SFB al 20% .	
Uso de adaptadores.	No se menciona.	0.5 mg/mL, 25 mL.	8 min, 37°C.	210 g, 10 min.	M199 con sales de Hank y SFB al 20%.	84
Canulado.	PBS.	13 mg/ 100 mL.	30 min, 37°C.	300 g, 5 min.	MCDB 131 enriquecido con SFB al 20%.	79
Canulado con agujas.	Buffer salino de HEPES.	0.1%, 10 mL.	10 min, 37°C.	250g, 10 min.	Medio 199 enriquecido con SFB al 20%.	85

Abreviaturas. HEPES: ácido 2-[4-(2-hidroxi-etil)-1-piperacil] etanosulfónico, MCDB: Medio de desarrollo molecular y celular, RPMI: medio Roswell Park Memorial Institute, rpm: revoluciones por minuto, SFB: suero fetal bovino.

Como lo menciona el mismo artículo, el método propuesto es una adaptación de la técnica descrita por Maruyama (1963) (citado por Jaffe ⁴⁹). De acuerdo con la publicación, se obtuvieron EC que crecieron en una monocapa homogénea de células poligonales con bordes mal definidos. Además, se realizó una comparación morfológica con células del músculo liso y fibroblastos y el estudio por microscopía de transmisión de electrones reveló que las EC contenían organelos citoplasmáticos en forma de barra como aquellos descritos por Weibel y Palade ⁴², ausentes tanto en fibroblastos como en células del músculo liso ⁴⁹.

En 1974, Michael A Gimbrone y colaboradores ⁵¹ describieron cultivos primarios y subcultivos de células HUVEC caracterizando el comportamiento del crecimiento de la población utilizando información derivada de estudios de incorporación de ³[H] timidina. Se encontró que el cultivo endotelial se comportaba como una población dependiente de densidad con respecto a la síntesis de DNA, y podía ser utilizado para estudios del mecanismo del crecimiento y regeneración endotelial. La técnica utilizada por Gimbrone, también modificación del procedimiento publicado por Maruyama, se describe a continuación:

Aquellos cordones umbilicales sin daño o traumas, de al menos 20 cm, fueron canulados y perfundidos con 200-400 mL de solución de Ringer Lactato para remover rastros de sangre. A continuación, el lumen de la vena fue perfundido con amortiguador salino de fosfatos (PBS) conteniendo 1 mg/mL de colagenasa. Después de 10-20 minutos de incubación a 37°C, el contenido de la vena fue vaciado con un volumen equivalente de solución salina balanceada de Hank y colectado en un tubo Falcon. Se realizó la centrifugación a 200 g durante 5 min, lo que produjo un pellet pequeño y blanco, el cual fue resuspendido en el medio de cultivo.

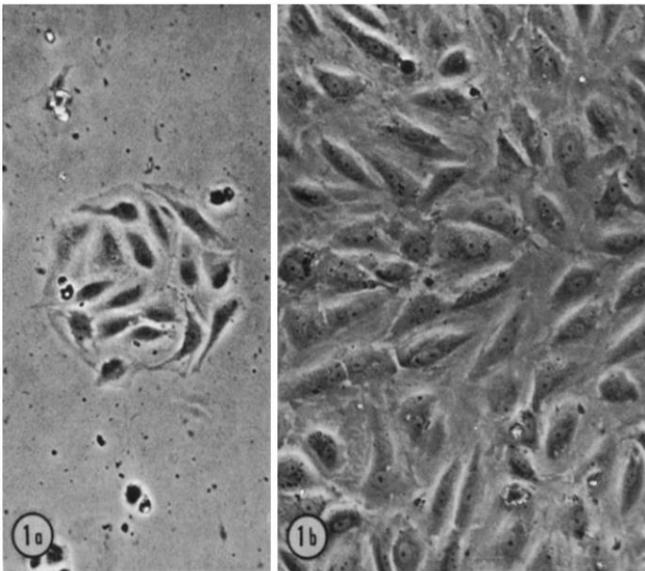


Figura 5. Cultivo de células HUVEC de 1 a 6 h. Un cúmulo pequeño de células endoteliales se adhiere al fondo de la caja y se esparce (Imagen tomada de Gimbrone et al., 1974)⁵¹.

De acuerdo con el autor, el efluente de la vena umbilical contenía pequeños cúmulos de células redondeadas, las cuales se anclaban al sustrato y se esparcían en forma de pequeños cúmulos epiteloides dentro de las primeras 2-6 h (Figura 5). Dichas aglomeraciones incrementaban en tamaño y gradualmente coalescían para formar monocapas incompletas en 3-5 días⁵¹.

Fue a partir de 1974 que surgieron otros trabajos que se dedicaron a aislar células endoteliales con el afán de estudiar más a fondo su fisiología celular y las posibles aplicaciones; sin embargo, la gran mayoría se basan en las descripciones realizadas por estos dos autores (Tabla 4).

Tabla 4. Estudios que realizaron el aislamiento de células endoteliales.

Nombre del estudio	Objetivo del estudio	Técnica de aislamiento utilizada
Estructura fina del endotelio vascular en cultivos.	Demostrar la presencia del único marcador ultraestructural del endotelio, los WPB, y describir la estructura fina del endotelio humano.	Descrita por Gimbrone et al (1974) ⁸⁷ .
Células endoteliales fetales humanas en cultivo.	Aislar células endoteliales humanas y reportar el comportamiento de su crecimiento y morfología.	Descrita por Jaffe et al (1973), con algunas modificaciones ⁸⁰ .
Identificación de la ultraestructura del endotelio de la vena umbilical <i>in situ</i> y en cultivo.	Demostrar que los estudios de la ultraestructura del endotelio pueden ser utilizados para la identificación de células endoteliales en cultivo.	Descrita por Henriksen et al (1975) ⁸⁸ .
Células del endotelio humano en cultivo.	Demostrar si existe alguna relación entre la proliferación de células endoteliales y la presencia de células binucleadas en cultivo, y examinar de forma detallada las estructuras finas de las células endoteliales humanas, a través del ciclo celular.	Descrita por Jaffe (1973) y Gimbrone et al (1974) ⁸¹ .
Métodos para la iniciación en el mantenimiento de cultivos celulares de endotelio humano.	Describir los métodos para establecer modelos <i>in vitro</i> para el estudio de enfermedades vasculares.	Descrita por Jaffe (1973) y Gimbrone et al (1974) ⁵² .

Cultivo de células endoteliales: Protocolo para obtener y cultivar células endoteliales del cordón umbilical humano.	Describir un protocolo estándar para la preparación, mantenimiento y control de calidad de las células endoteliales de la vena umbilical humana.	Descrita por Jaffe et al (1973) ⁸² .
---	--	---

Abreviaturas. WPB: cuerpos de Weibel-Palade,

Las células endoteliales tienden a ser quiescentes *in vivo*, sin embargo, tras una herida, son capaces de cambiar su fenotipo, migrar y proliferar para sanar la lesión en algunos días. Muchos progresos se han logrado gracias al cultivo de dichas células, aun cuando el proceso de cultivo pudiera introducir ciertos artefactos y producir la pérdida de funciones específicas y la introducción de nuevas características metabólicas, las cuales no están presentes *in vivo*. Así, por ejemplo, la tasa de crecimiento *in vitro* excede por mucho la tasa *in vivo*. No obstante, su cultivo ha resultado en la observación de muchos hallazgos interesantes, por ejemplo, la identificación del NO, el factor de relajación derivado del endotelio ⁶⁹.

Si bien los estudios presentados en la Tabla 3 están basados en un mismo procedimiento (descrito por Jaffe y Gimbrone), existen otros métodos para aislar células endoteliales ⁶⁹:

- a) **Homogenizado y digestión enzimática.** Esta técnica se usa para vasos sanguíneos pequeños como capilares de la corteza adrenal bovina. La selección de EC se hace mediante: 1) filtración de los *clusters* de EC ó 2) por clasificación de células (*cell sorting*). Las células endoteliales de la microvasculatura son adecuadas para estudios de procesos inflamatorios, permeabilidad y angiogénesis.
- b) **Por raspado mecánico y desprendimiento físico.** Técnica adecuada tanto para macro como microcapilares. Las EC pueden ser raspadas

cuidadosamente de las paredes de vasos sanguíneos grandes, y colectadas después por perfusión, utilizando perlas microacarreadoras desde las venas post-capilares. Dicha técnica es preferida para las EC microvasculares de corazón y pulmón.

A modo de resumen, en la Tabla 3 se presentan las diferentes condiciones y reactivos utilizados en el aislamiento de las células HUVEC. Información más detallada se incluye en las secciones **3.2** y **3.3** de esta revisión.

3.2 Cultivo de células HUVEC

Una vez que se han aislado las EC, es necesario mantenerlas en un medio adecuado que les permita crecer y/o llegar a confluencia, ya sea para estudiar funciones metabólicas, o para usarse como modelo *in vitro* en diferentes investigaciones. La Tabla 5 resume los reactivos y condiciones necesarias para su cultivo, de acuerdo con los autores más relevantes en el tema.

Tabla 5. Condiciones de cultivo de células HUVEC.

Medio de cultivo	Reactivos adicionales	Condiciones de temperatura y humedad	Cambio de medio	Referencias
TC199.	SFB, penicilina (200 U/ml), estreptomycin (200 µg/mL), L-glutamina (2mM).	37°C, 5% CO ₂ .	Dos veces por semana.	49
M199.	15 mg/L de HEPES, penicilina (60 mg/mL), estreptomycin (129 mg/mL), SFB al 20%.	37°C, 5% CO ₂ .	Cada 48 h.	51
M199 o RPMI 1640.	HEPES 25mM, SFB al 20%, L-glutamina (0.3 mg/mL), penicilina (100 U/mL), estreptomycin (100 µg/ mL) y anti-PPLO (0.03 mg/ML).	37°C, 5% CO ₂ .	Dos veces por semana.	80
Medio mínimo de Eagle.	SFB al 10%, L-glutamina (1%).	37°C, 5% CO ₂ .	Cada tres días.	81
M199.	SFB al 20%, penicilina (100 UI/ mL), estreptomycin (100 µg/mL) y L-glutamina (2 mM), ECGS.	37°C, 5% CO ₂ .	Cada dos días.	82

MCDB 131	SFB al 20%, penicilina y estreptomina (50 U/ mL/ 50 U/mL), 20 µg/mL factor de crecimiento celular endotelial (ECGF), heparina (16 U/mL).	37°C, 5% CO ₂ .	Cada tres días.	79
M199.	SFB al 20%, 1 mL de penicilina-estreptomina (10,000 U por 10,000 U).	37°C, 5% CO ₂ .	Cada dos días.	86
M199.	SFB al 20%, 50 µg/ mL de ECGF, 50 µg/ mL de heparina, L-glutamina (2mM), penicilina (100 U/mL), estreptomina (100 µg/ mL), anfotericina (2 µg/mL).	37°C, 5% CO ₂ .	Dos veces por semana.	85

Abreviaturas. CO₂: dióxido de carbono, ECGF: factor de crecimiento celular endotelial, HEPES: ácido 2-[4-(2-hidroxietil)-1-piperacilil] etanosulfónico, PPLO: microorganismos similares a los de la pleuroneumonía, SFB: suero fetal bovino.

3.3 Condiciones en el aislamiento y cultivo de células HUVEC

A continuación se discuten algunos aspectos a considerar para llevar a cabo el aislamiento y cultivo de células HUVEC.

3.3.1 Recolección y conservación del cordón

De acuerdo con diferentes autores, los cordones umbilicales deben obtenerse de embarazos llevados a término y generalmente de madres sanas y sin complicaciones. Es necesario que éstos no presenten infecciones por hepatitis o por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) ⁸² y en general, que provengan de partos naturales ^{51,80,88}.

Este hecho puede cambiar de acuerdo a los requisitos de cada proyecto. Por ejemplo, hay estudios enfocados a afecciones como la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) donde se requieren de células endoteliales provenientes de mujeres con diabetes gestacional ^{89,90}, para realizar estudios de proteómica, epigenética, pérdida/ganancia de función, entre otros. Por otra parte, algunos autores especifican que los cordones utilizados en sus publicaciones son recolectados de nacimientos por parto natural ⁹¹⁻⁹³ o cesárea ^{51,94-97}.

Existen varios trabajos que si bien no estudian de forma directa la influencia de la forma de nacimiento sobre el cordón, lo hacen sobre la sangre umbilical. Uno de ellos evaluó de forma retrospectiva los efectos de la cesárea y parto natural en el volumen de sangre umbilical colectada. En las muestras provenientes de cesárea se encontraron un mayor número de células CD34+, en comparación con el otro grupo. Así mismo, en otro trabajo se realizó la recolección de sangre umbilical durante una cesárea mientras la placenta se encontraba dentro y fuera de la paciente, concluyendo que se obtiene un mayor volumen de sangre cuando ésta se recolecta *in situ* ⁹⁸.

En un estudio llevado a cabo en 2014 ⁹⁹ se realizó un análisis comparativo de estrés oxidante en sangre de cordones umbilicales de bebés nacidos tanto por

cesárea como por parto. Si bien se creía que los nacimientos por parto tendrían un mayor incremento de estrés oxidativo, dado que la demanda de energía y actividad metabólica incrementa por la contracción del músculo esquelético y músculo liso uterino, resultó que aquellas muestras provenientes de cesáreas presentaban mayores cantidades de especies reactivas de oxígeno (ROS) que las muestras de partos naturales. Se cree que esto se debe al oxígeno aspirado por la madre durante la anestesia, y a la cirugía misma, que probablemente promueve la peroxidación de lípidos ⁹⁹.

Un estudio más reciente estableció valores hematológicos normales de la sangre umbilical, evaluando factores como género, forma de nacimiento y edad gestacional. Uno de los hallazgos reveló niveles disminuidos de eritrocitos en nacimientos por parto. Por otra parte, las muestras derivadas de cesáreas presentaron una diferencia significativa en el conteo de leucocitos; los valores provenientes de muestras de sangre del cordón de parto natural resultaron mayores que en aquellas de cesáreas. Así mismo, los niveles de neutrófilos fueron más altos en los nacimientos por parto comparados con los de cesáreas ¹⁰⁰.

Por lo que respecta a la conservación del cordón, ésta debe llevarse a cabo en condiciones adecuadas (Tabla 6). Muchos autores coinciden en que la temperatura es un factor muy importante, siendo la ideal 4°C. Y con respecto al tiempo, éste puede ser usado entre las primeras 10 y 24 h tras su recolección ^{52,82}, aunque se ha demostrado la obtención de resultados comparables de células obtenidas hasta 48 h después del nacimiento ⁴⁸.

Uno de los primeros estudios relacionados con la conservación de tejido fue realizado por Peirce y colaboradores, en 1949 ¹⁰¹. En dicho estudio se analizó la preservación de tejidos bajo diferentes condiciones, encontrando que los tejidos refrigerados retienen su viabilidad por determinado tiempo, dependiendo del tipo de tejido, del tamaño del mismo, la disponibilidad de oxígeno, temperatura de almacenamiento y otros factores. Sus observaciones arrojaron que la demanda de

oxígeno se reducía al disminuir la temperatura. Así, tejidos conservados a 0°C podían sobrevivir por un tiempo cuando el oxígeno era excluido. Por otra parte, otros estudios reportaron la conservación de diferentes tejidos en solución de Ringer o solución salina, a temperaturas de entre 3 °C a 6 °C. Es entonces claro que ciertos tejidos pueden ser preservados por simple refrigeración. La piel y los vasos sanguíneos pueden preservarse hasta por una semana en ausencia de un ambiente amortiguador con solo conservarlos a 0°C y exclusión de oxígeno. Adicionalmente, los vasos sanguíneos conservados así durante 24 h se vuelven edematosos y son poco aptos para injertos vasculares. Su preservación en suero o sangre también es satisfactoria por cortos periodos de tiempo, pero las proteínas y grasas presentes parecen interferir seriamente con el metabolismo. Así, parece que el medio de conservación ideal debe contener concentraciones fisiológicas de sales, amortiguador, glucosa y pequeñas moléculas accesorias presentes en el suero ¹⁰¹.

Tabla 6. Soluciones empleadas en la conservación del cordón umbilical antes de su procesamiento y tiempo máximo en ser procesados.

Solución	Composición	Tiempo de conservación	Referencias
Amortiguador de cordón, pH 7.4.	NaCl 0.14 M KCl 0.004 M Buffer de fosfatos 0.001M Glucosa 0.011 M.	<3 h.	49
Amortiguador de fosfatos frío.	Calcio, magnesio, estreptomina y penicilina.	2-3 h.	80
Amortiguador de transporte.	Concentrado: NaCl 1.4M Na ₂ HPO ₄ 5.2mM KCl 40 mM.	<24 h.	82
Amortiguador de conservación y transporte.	50 mL de PBS 1X 1 mL de penicilina 1 mL de colistina .	<6 h.	86
Amortiguador salino de HEPES (1X).	NaCl 137 mM KCL 4 mM HEPES 10 mM	<3 h.	85

	Glucosa 11.1 mM.		
PBS suplementado.	PBS suplementado con antibiótico-antimicótico al 1.5%.	<3 h.	102

Abreviaturas. HEPES: ácido 2-[4-(2-hidroxiethyl)-1-piperacil] etanosulfónico, KCl: cloruro de potasio, NaCl: cloruro de sodio, Na₂HPO₄: fosfato ácido disódico, PBS: amortiguador salino de fosfatos.

Otro aspecto a considerar es la longitud del cordón, pues hay quien considera que éste debe desecharse si es menor a 12 cm, o si presenta áreas dañadas, ya que esto podría resultar en una baja cantidad de células extraídas. De la misma manera, si el cordón presenta coágulos, se recomienda cortar dicha sección y no forzar la salida de éstos ⁷⁹.

3.3.2 Consideraciones sobre los reactivos utilizados en el aislamiento

De forma general, Marin (2000) ⁸² propone algunas recomendaciones antes de llevar a cabo el aislamiento de células HUVEC:

- a) Calentar a baño María a 37°C una botella de buffer de transporte estéril. Esto evitará un choque térmico en las células que las inhabilite ⁴⁸.
- b) Preparar un área estéril en una campana de flujo laminar, lo que evitará contaminación de tipo bacteriana y fúngica tanto de los reactivos como de los cultivos.
- c) Antes de comenzar con el procedimiento, es recomendable la localización de la vena umbilical humana. No confundir con las arterias umbilicales, caracterizadas por ser conductos más rígidos, difíciles de dilatar (Figuras 1 y 2).
- d) Se recomienda almacenar la colagenasa en alícuotas de 10 - 12 mL a -20°C para evitar su desnaturalización.

- e) Las cajas de cultivo deben prepararse antes del procedimiento, pues deben cubrirse con gelatina o fibronectina para asegurar la adherencia celular (ver sección 3.3.2.4)
- f) Las células efluentes de la vena umbilical no se unen al sustrato y tampoco continúan creciendo en los cultivos ya establecidos en un medio libre de suero. La adición de 1-2% de suero al medio restaura estas capacidades ⁵¹.

En la Tabla 7 se presentan las posibles soluciones a diversos problemas que pueden surgir cuando se están aislando células HUVEC.

Tabla 7. Tabla de solución de problemas (Tabla tomada de Cheung, 2007 ⁸⁵).

Problema	Posible causa y solución
No hay células después de sembrar	Mal estado de la colagenasa (tipo, concentración, etc); preparar solución fresca.
No hay adherencia celular tras 24 h de siembra	Fibronectina en mal estado, malas condiciones de incubación, (hipoxia, alta concentración de CO ₂ , baja humedad); verificar.
Ausencia de confluencia después de 8 días/ células despegadas	Incompatibilidad con (HLA), malas condiciones de incubación, contaminación bacteriana; verificar incubadora y contaminación bacteriana.
Rápida senescencia (muchas células despegadas y muerte celular tras confluencia y subconfluencia)	Contaminación variada, múltiples resiembras; desechar cultivos, revisar por contaminación bacteriana y uso de cultivos primarios.
Presencia de micelio micro y macroscópico	Contaminación por hongos; desechar cultivos y descontaminar con antifúngicos.
Células elongadas, particularmente después de	Contaminación por células del músculo liso o fibroblastos; desechar cultivos.

Abreviaturas. CO₂: dióxido de carbono, HLA: antígenos leucocitarios humanos, HUVEC: células endoteliales de la vena umbilical humana.

El medio de cultivo suministra los aminoácidos utilizados en la síntesis de proteínas en el cultivo celular. El más comúnmente utilizado es el medio M199, sin embargo se demostró que el medio MCDB 131, con altos niveles de magnesio (10 mM) incrementa de dos a tres veces la proliferación celular, comparado con el medio M199 (1.6 mM). Medios artificiales que contienen factores de crecimiento también resultan eficientes, así como el enriquecimiento del medio (Tablas 4 y 5)⁸².

Se recomienda el uso de medios enriquecidos, tales como medio 199 (M199) o medio Dulbecco-Vogt, pues son ideales para promover el crecimiento celular, mientras que los medios deficientes en glutamina o el medio mínimo esencial (de Eagle) no son adecuados para el cultivo de células HUVEC⁵¹.

3.3.2.2 Uso de la colagenasa

En los resultados de su trabajo, entre otras cosas, Jaffe⁴⁹ describe los efectos de la colagenasa sobre la digestión de la vena umbilical en la histología de este tejido (Figura 6). De acuerdo con él, los estudios histológicos permitieron concluir que las muestras observadas después del uso de la colagenasa carecían del revestimiento endotelial de la vena, pero había dejado intactas la membrana basal y las estructuras subyacentes. Si el tiempo de incubación con la colagenasa hubiera sido mayor, o el cordón se hubiera dañado de forma deliberada por las pinzas, la membrana basal habría sido digerida y las estructuras subyacentes interrumpidas⁴⁹. Como consecuencia de esto, el número de células de músculo liso incrementaría en los cultivos⁸².

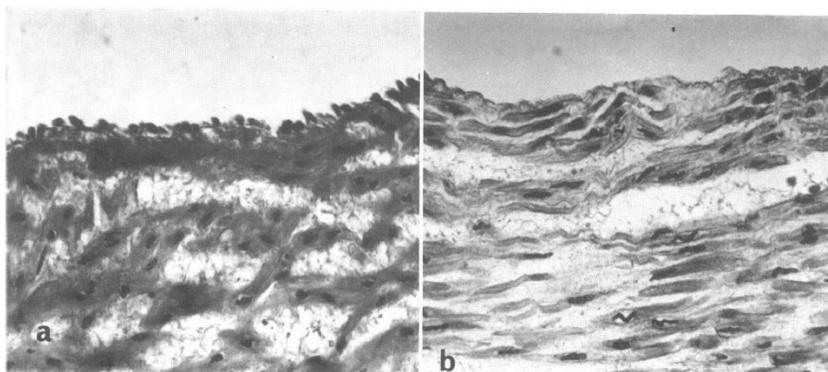


Figura 6. Fotomicrografía de la vena umbilical (a) antes y (b) después del tratamiento con colagenasa. Células endoteliales presentes en una capa continua en (a) y ausente en (b). Hematoxilina y eosina (x240). (Imagen tomada de Jaffe, 1973 ⁴⁹).

Otra consideración importante es que es necesario el uso de colagenasa recién preparada, ya que ésta tiende a precipitarse y dichos precipitados pueden llegar a ser citotóxicos ⁷⁹. Finalmente, es necesario considerar que la colagenasa trae consigo diversas proteasas contaminantes que pudieran disminuir el rendimiento del proceso de aislamiento. Además, la concentración y tiempo de incubación dependerá del tipo de colagenasa, así como del lote utilizado. En este sentido, puede tomarse en cuenta el uso de tripsina, ya que ésta es una enzima de uso común, cuya actividad es altamente reproducible ⁴⁸.

3.3.2.3 Uso del suero fetal bovino (SFB) en el cultivo de células HUVEC

Ya muchos estudios han confirmado la presencia de factores de crecimiento en el suero (bovino o humano) utilizado para enriquecer el medio con el cual se mantienen en cultivo a las células HUVEC. Uno de los primeros ensayos se dio a la tarea de investigar el efecto de éste sobre la síntesis de DNA de dichas células. Desde entonces ya era bien sabido que el suero contiene factores que estimulan el crecimiento celular al favorecer la síntesis de DNA (principalmente en fibroblastos). Sin embargo, la tasa de síntesis de DNA excepcionalmente baja *in vivo* en el endotelio intacto de los vasos capilares maduros, sugiere que dicho proceso es independiente de dichos factores. El estudio demostró que las células HUVEC confluentes no pueden ser estimuladas para sintetizar DNA a ninguna

concentración de suero, muy probablemente debido a la incapacidad de estas células de utilizarlos. Es posible que las membranas de las células confluentes no tengan sitios de unión o que éstos estén enmascarados, y por lo tanto, inaccesibles durante la confluencia. No obstante, tras la disrupción del endotelio, éstas son capaces de sintetizar DNA de nuevo para reparar el daño ¹⁰³.

Las células HUVEC pueden sobrevivir en un medio libre de SFB hasta por 12 h sin perder sus rasgos fenotípicos. Sin embargo, para experimentos más largos (en particular, aquellos de 24 h), la ausencia de factores de crecimiento dispara el proceso de apoptosis; este proceso puede ser eludido con el uso de un medio enriquecido con bajas concentraciones de proteínas (1%) en medio M199 con SFB. En este medio, las HUVEC son capaces de sobrevivir por 48 h ⁸⁶. Para un crecimiento óptimo, las células recién aisladas requieren un medio complementado al 20-30% con SFB, mientras que para el mantenimiento de la densidad de crecimiento de cultivos primarios y subcultivos, 10% de SFB es suficiente ⁵¹.

Una posibilidad para estimular el crecimiento selectivo de células endoteliales en medio libre de suero es suplementándolo con VEGF, también conocido como vasculotropina, el cual a la fecha, es el único factor de crecimiento conocido que es específico para EC. El VEGF es un factor de crecimiento angiogénico que resulta estable al calor y al medio ácido; este consiste de una pequeña familia de glicoproteínas diméricas de unión a heparina químicamente similares con un peso molecular aproximado de 46 kD ¹⁰⁴. Se ha demostrado que este factor es una molécula esencial en el desarrollo y formación de vasos sanguíneos en mamíferos, tanto en condiciones normales como patológicas. Así pues, es un mitógeno altamente selectivo y potente para las EC ⁶⁹. La concentración de SFB y factores de crecimiento pueden modificar la síntesis de algunas moléculas de las EC. Particularmente, se ha observado que la privación progresiva de SFB disminuye la secreción de IL-8 al medio ⁸².

3.3.2.4 Uso de heparina

Se ha demostrado que la heparina, un mucopolisacárido sulfatado, incrementa la proliferación de EC en presencia de factores de crecimiento que se unen a ésta, tal como el ECGF ⁸². En 1983 un estudio describió por primera vez el uso de heparina en los cultivos para potenciar el efecto estimulador del ECGF en la proliferación de células HUVEC. Es posible que la acción de este componente se dé a través de la unión a la superficie celular, donde facilita la comunicación intracelular y la accesibilidad a los receptores de membrana ⁵⁷. Por otro lado, la heparina estabiliza la actividad del factor de crecimiento al prevenir la degradación proteolítica, e inducir la oligomerización de moléculas del FGF. Como consecuencia de este último evento, la unión a receptores de FGF resulta en la dimerización y activación de los mismos ⁸². La concentración de heparina utilizada en los cultivos de HUVEC reportada en diversos estudios va desde 10 µg/mL hasta 8000 U/mL ^{60,67,79,83-85,105}.

3.3.2.5 Uso de reactivos que favorecen la adhesión en el cultivo de células HUVEC

Un avance significativo en la proliferación y mantenimiento de células HUVEC fue el incorporar al cultivo fibronectina (o gelatina), ya que ésta ayudaba no sólo a mejorar la capacidad replicativa de las células, sino que permitía la resiembra de las mismas (Tabla 8). El cultivo de EC depende de la presencia de una superficie cubierta y la disponibilidad de factores de crecimiento en el medio. La ECM de las EC es una red densa compuesta de colágeno, fibronectina, vitronectina, hialuronano, laminina y glicosaminoglicanos. En varios estudios se ha demostrado la interacción de las EC con estos componentes a través de receptores específicos, como las integrinas 1β ⁸². En uno de ellos se demostró que cubrir las cajas de cultivo con fibronectina, gelatina de colágeno o hialuronano potencia la actividad básica del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) ¹⁰⁶. Por otro lado, Maciag y colaboradores (1981) ⁵⁴ describieron que los cultivos privados de fibronectina humana eran incapaces de proliferar a una baja densidad de células

HUVEC, incluso en presencia de SFB al 20%. Sin embargo, dicho recubrimiento no es necesariamente esencial para obtener una proliferación eficiente ⁸².

Si las cajas de cultivo son preparadas, pero no son utilizadas de inmediato, pueden almacenarse hasta por 2 semanas a 4°C bajo condiciones estériles ⁷⁹.

Tabla 8. Uso de gelatina para la adherencia celular.

Concentración de la gelatina	Condiciones del tratamiento	Adicionales	Referencias
1% (v/v).	4°C, toda la noche.	Antes de sembrar, la gelatina se aspira y la caja se lava con medio de cultivo.	⁵³
1 %.	1h, a 37°C.	Gelatina tipo B al 2% diluída en 50% de agua destilada y filtrada con filtro de 0.22 µm.	⁸²
0.5 %.	20 min, a 37°C.	Diluir una solución de gelatina B al 2% en buffer salino de fosfatos Dubelcco (D-PBSA) .	⁸⁴
0.2 %.	20 min a temperatura ambiente.	Para 10 mL de gelatina al 0.2%, diluir 1 mL de la solución stock de gelatina al 2% en 9 mL de PBS.	⁷⁹

Abreviaturas. °C: grados Celsius, D-PBSA: amortiguador salino de fosfatos Dulbecco, PBS: amortiguador salino de fosfatos, %v/v: porcentaje volumen/ volumen.

3.3.3 Crecimiento celular

El éxito del cultivo de células HUVEC depende de muchos factores, por lo que el establecimiento de un protocolo no asegura que se lleve a término un cultivo. Se estima que un número considerable de cultivos extraídos de la vena umbilical no alcanzan densidades confluentes. De acuerdo con el reporte de Gimbrone y

colaboradores (1974) ⁵¹, de 200 cordones procesados, un tercio de éstos fracasaron para alcanzar densidades confluentes, y agregan que la iniciación del crecimiento parece estar relacionada con la presencia de agregados multicelulares en el efluente venoso. También es necesario tomar en cuenta que las células de la vena umbilical proliferan más rápido que aquellas aisladas de las arterias ⁸², así como el uso de una cubierta que ayude a la adherencia celular (como fibronectina, gelatina, etc), ECGF y medio enriquecido con suero, ya que esto permitirá el crecimiento a largo plazo. Bajo estas condiciones, fue posible realizar de 15 a 21 resiembras antes de que las células HUVEC se volvieran quiescentes, mientras que cultivos sin estos elementos cesaron su crecimiento después de la segunda resiembra ⁵⁴.

Se ha descrito que el tiempo para que un cultivo de células alcance confluencia es muy variado. Hay quienes lo sitúan entre 4 y 5 días ^{48,85}, de 6 a 8 días ⁸⁶, de 7 a 9 días ^{52,79,107} y hasta de 10 a 14 días ¹⁰⁸. Todo parece indicar que tanto el número de células sembradas en un principio, como el procedimiento mismo, las condiciones de incubación y la capacidad proliferativa de las células influyen sobre el tiempo en que éstas alcanzan el estado de confluencia. Una vez alcanzada la confluencia, se recomienda esperar 2 días más antes de comenzar a tratarlas, dado que la confluencia real (no mitosis) es alcanzada más tarde de lo que se puede observar con el microscopio ⁸⁶.

Es importante poner atención en que todo el material utilizado en el aislamiento de células sea estéril y libre de endotoxinas, ya que éstas interfieren con la proliferación y crecimiento celular. Adicionalmente, se recomienda realizar resiembras regularmente, pues la sobrepoblación puede provocar arresto del ciclo celular, dañando así la habilidad proliferativa de las células (3-4 semanas antes de la senescencia). Así mismo, durante las resiembras es importante remover el suero del medio, ya que éste inhibe la actividad de la tripsina. Finalmente, la viabilidad celular puede verse comprometida si los procedimientos de congelamiento/ descongelamiento no se llevan de forma adecuada ⁷⁹.

3.3.4 Contaminación

Existen al menos dos problemas comunes en el establecimiento de un cultivo primario de células HUVEC. Primero, la contaminación bacteriana/ fúngica, que es la mayor causa de fracaso en el cultivo celular. Y en segundo lugar, problemas relacionados con la frescura del cordón umbilical al inicio del proceso. Si bien hay discrepancias en el tiempo máximo de procesamiento (Tabla 6), lo más recomendable es procesarlo dentro de las primeras 24 h posteriores a su recolección ⁷⁹.

Por otro lado, Baudin (2007) ⁸⁶ explica cómo pueden identificarse dichos problemas:

Bacterias y hongos. Pueden identificarse con un microscopio óptico regular, sin embargo, puede ser necesaria la detección de bajos niveles de infección. Esto se logra incubando los cultivos celulares en caldos microbiológicos (medio tioglicolato fluido o caldo soya-triptona).

Mycoplasma. Usualmente no es detectado a la luz del microscopio porque se trata de un microorganismo intracelular. Puede ser detectado mediante cultivos en medios específicos o por tinción del *DNA* y análisis fluorescente.

Fibroblastos y células del músculo liso. Estas células presentan características que dificultan su identificación al microscopio. El uso de un panel de marcadores (como vimentina, α -actina del músculo liso, desmina y calponina) es difícil dado que las células HUVEC también expresan dichas proteínas; sólo la proteína-1 específica de fibroblastos, las metaloproteasas de matriz 2 y 3 y CD90 pueden ser más específicas para fibroblastos. Además, las células HUVEC retienen el potencial de diferenciarse a células parecidas a músculo liso si se les priva de factores de crecimiento.

Se ha detectado la presencia de fibroblastos en, al menos, el 10% de los cultivos. Estos carecen de cuerpos de Weibel-Palade (WPB) y su morfología era similar a la de las células del músculo liso. No obstante, la contaminación con estas células ocurrió en menos de 1 por cada 10,000 células ⁵¹. Sin embargo, otros autores

aseguran que tras resemenbrar los cultivos de HUVEC por tercera vez, éstos serán puros ^{86,108}.

3.3.5 Criopreservación de células HUVEC

Es recomendable congelar las células HUVEC que han sido resemenbradas tantas veces como sea posible para asegurar un *stock* adecuado para experimentos subsecuentes. Para ello, es necesario despegar las células, ya sea con tripsina o colagenasa (Tabla 9), utilizando DMSO o glicerol al 10% ⁵⁴.

Tabla 9. Condiciones y reactivos utilizados para el subcultivo de células HUVEC (Pase de células).

Células removidas con:	Concentración del reactivo	Tiempo/ temperatura de incubación	Referencias
EDTA/ colagenasa.	0.001%/ 0.1%.	No se menciona.	Jaffe et al. 1973 ⁴⁹ .
Tripsina / EDTA.	0.25%/ 0.05%.	2-3 min.	Gimbrone et al. 1974 ⁵¹ .
Tripsina.	0.2%.	5 min, 37°C.	Elgjo et al. 1975 ⁸⁸ .
Tripsina/ EDTA.	0.25%/ 0.05%.	2-3 min.	Haudenschild et al. 1975 ⁸⁷ .
Tripsina.	0.2%.	2-3 min, 37°C.	Henriksen et al. 1975 ⁸⁰ .
Tripsina/ EDTA.	0.01%/ 0.02%.	30 s.	Vaccaro et al. 1987 ⁵² .
Tripsina/ EDTA.	0.05%/ 0.02%.	30-60 s.	Marin et al. 2001 ⁸² .
Tripsina/ EDTA.	0.25%/ 1 Mm.	1-3 min, 37°C.	Larrivée & Karsan 2005 ⁷⁹ .
Tripsina/ EDTA.	0.25%/ 0.02% .	No se menciona.	Baudin et al. 2007 ⁸⁶ .
Colagenasa/ EDTA.	0.1%/ 0.02%.	5 min, 37°C.	Cheung & Cheung 2007 ⁸⁵ .

Abreviaturas. EDTA: ácido etilendiaminotetraacético,

En la Tabla 10 se muestra la composición del medio para criopreservar células HUVEC reportada en distintos trabajos.

Larrivé & Karsan (2005) recomiendan congelar células a partir de la segunda resiembra, para dar tiempo a que las características de la células se restablezcan. Esta información se confirmó en un estudio realizado en 2012, cuyo objetivo principal era establecer un banco de células vasculares humanas, y analizar el efecto de la criopreservación a corto y largo plazo ¹⁰⁹.

Tabla 10. Medio para criopreservar células HUVEC.

Composición del medio			Referencias
SFB (%)	Medio de cultivo (%)	DMSO (%)	
20, incluido en el medio de cultivo.	90.	10.	Vaccaro et al. 1987 ⁵²
45.	45.	10.	Larrivé & Karsan 2005 ⁷⁹
92.5.	20, incluido en el medio.	7.5.	Cheung & Cheung 2007 ⁸⁵
20, incluido en el medio de cultivo.	90.	10.	Polchow et al. 2012 ¹⁰⁹

Abreviaturas. DMSO: dimetil sulfóxido, SFB: suero fetal bovino.

3.3.6 Viabilidad de células HUVEC

El aislamiento de células permite una amplificación eficiente de las EC desde los cultivos primarios de la vena umbilical humana con un número reducido de resiembras. Sin embargo, las resiembras continuas pueden eventualmente resultar en cambios en la senescencia y pérdida del potencial replicativo. Si bien hay variación entre cada lote de células, las células HUVEC se pueden utilizar de

forma rutinaria entre 8 y 10 resiembras ^{69,79}; sin embargo, hay autores que no recomiendan utilizarlas después de la sexta resiembra ⁸⁴. Muchos estudios que involucran células HUVEC se han conducido entre las resiembras 2 y 4. En general, las células no deberían usarse más allá de la resiembra 5, debido a cambios en el fenotipo ⁸⁵.

Un estudio llevado a cabo en 1975 realizó la resiembra de células HUVEC 19 veces durante un año, encontrando por microscopía electrónica que los cultivos mantenían sus características estructurales finas como lo hacen *in vivo* ⁸⁷, mientras que en 1981, otro estudio demostró que era posible mantener a las células HUVEC entre 15 a 21 resiembras, siempre y cuando se utilizaran elementos que permitieran la proliferación (como matriz de fibronectina humana y medio enriquecido con ECGF). Si bien las células mantienen su integridad morfológica, observaron la aparición de células gigantes y alargadas, las cuales se identificaron como células senescentes. Además, encontraron que la ausencia de crecimiento de colonias celulares cuya densidad fuera aproximadamente de 10^3 , sugería que el ECGF es requerido para la proliferación y supervivencia del cultivo. Sin embargo, los cultivos cuya densidad de siembra fuera menor a 10^3 no proliferaron en presencia de medio enriquecido con SFB y ECGF ⁵⁴.

Si bien los trabajos citados no lo mencionan, el nivel de confluencia, así como el número de resiembras también pueden afectar la expresión de moléculas de membrana. Tal es el caso de la expresión de ICAM-1, que disminuye significativamente con el incremento del nivel de confluencia. Lo que concierne al número de resiembras, sólo los cultivos primarios y la primera y segunda resiembra permiten el estudio de inducción de P-selectina en la membrana de células HUVEC. En resiembras posteriores, el almacenamiento de dicha proteína, así como su inducción pierde importancia. El fenotipo del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) también puede cambiar desde que las células son aisladas hasta dos semanas después ⁸². Finalmente, una exposición prolongada a tripsina/EDTA disminuye la detección de algunas moléculas como ICAM-1, trombomodulina y PECAM/CD31 ⁸².

3.3.7 Ventajas y desventajas del aislamiento y cultivo de células HUVEC

Las células HUVEC resultan ser buenos modelos debido a su capacidad de inhibición por contacto y las limitaciones de densidad que presentan en el crecimiento, pues la proliferación celular es fuertemente inhibida una vez que el cultivo ha alcanzado el estado de confluencia ⁸⁴.

Otra ventaja del uso de células HUVEC como modelo es que distintos componentes de la ECM pueden promover la formación de estructuras similares a capilares. Por ello es que los modelos de angiogénesis han incrementado de forma significativa nuestro entendimiento del papel de la ECM en la morfogénesis vascular, pero obviamente no reflejan todos los pasos de la angiogénesis fisiológica. Estos modelos son, en general, simples, designados para células aisladas y particularmente convenientes para el tamizaje *in vitro* de la actividad de moléculas angiostáticas. También pueden utilizarse para evaluar la ultraestructura de las formaciones capilares, la síntesis de matriz de las EC o el papel de las moléculas de adhesión en el proceso de la morfogénesis tubular. Además permiten la caracterización funcional de las líneas de EC y el rol putativo de las moléculas de adhesión (como E-selectina, PECAM-1, cadherina-5 y las proteasas), así como la síntesis de proteínas extracelulares y la maduración de vasos sanguíneos, con lo que es posible estudiar el papel de los productos de glicación en la diabetes y las proteínas matricelulares durante la angiogénesis ⁷¹.

Un modelo debe ser barato, fácil de manipular, fácilmente reproducible y dentro del marco ético permitido. Así mismo, debe recapitular la fisiopatología de la enfermedad humana. En este sentido, las células (HUVEC) primarias son consideradas mejores representantes del comportamiento de las células *in vivo*, comparadas con las líneas celulares ¹¹⁰. De forma normal, las EC son quiescentes *in vivo*. Tras una herida, las células cambian su fenotipo, migran y proliferan para sanar la lesión en algunos días ¹¹⁰. Originalmente, se creía que las EC eran homogéneas, sin embargo, hoy es comúnmente aceptado que hay un alto grado de heterogeneidad en el árbol vascular, lo que permite la adaptación biológica a

las necesidades locales ¹¹¹. Además, la tasa de crecimiento de las EC *in vitro* excede por mucho el crecimiento *in vivo*; si bien esto puede solucionarse al manipular la tasa de proliferación usando inhibidores y factores de crecimiento para volver quiescentes a las células ⁶⁹.

Por otro lado, la vida útil de las células HUVEC es de aproximadamente 10 resiembras, aunque hay quienes aseguran que éstas pierden sus características primarias y respuesta a varios estímulos después de la resiembra 6. Si bien dichas células pueden mantenerse en cultivo hasta por cinco meses, no es posible realizar experimentos a largo plazo (por ejemplo, en años) con las mismas ¹¹².

Su aislamiento es laborioso, se requiere de cierta experiencia, los requerimientos de crecimiento de estas células son demandantes ⁵⁷, hay riesgo de infección ¹¹³ y los resultados experimentales obtenidos de diferentes células HUVEC no pueden ser fácilmente comparables con otros debido al origen del donador. Existen estudios que reportan que la respuesta a estímulos con IL-8 es diferente entre células comerciales y células aisladas, sin mencionar que el comportamiento de las EC también difiere dependiendo del origen vascular ¹¹². Así por ejemplo, está documentado que las células HUVEC tardan más en crecer, a diferencia de otros tipos de EC como EC capilares o bovinas ⁵³.

4. IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS HUVEC

El endotelio vascular está caracterizado por la heterogeneidad tanto de aspectos morfológicos como funcionales, proteínas marcadoras de activación celular y respuesta a factores de crecimiento. La heterogeneidad es detectable a diferentes niveles, se puede diferenciar el comportamiento de EC aisladas y compradas, de diferentes órganos y hasta de los diferentes regiones en el mismo órgano ⁶⁹. La forma más efectiva de caracterizar los cultivos de EC es examinar una serie de propiedades presentes en éstas ¹⁰⁴.

4.1 Descripción morfológica

La primera caracterización, realizada por Jaffe en 1973, fue morfológica. Al contar con un cultivo puro, era posible realizar una descripción más detallada de éste y obtener información valiosa que permitiera la distinción de éstas con otras células (contaminantes, principalmente).

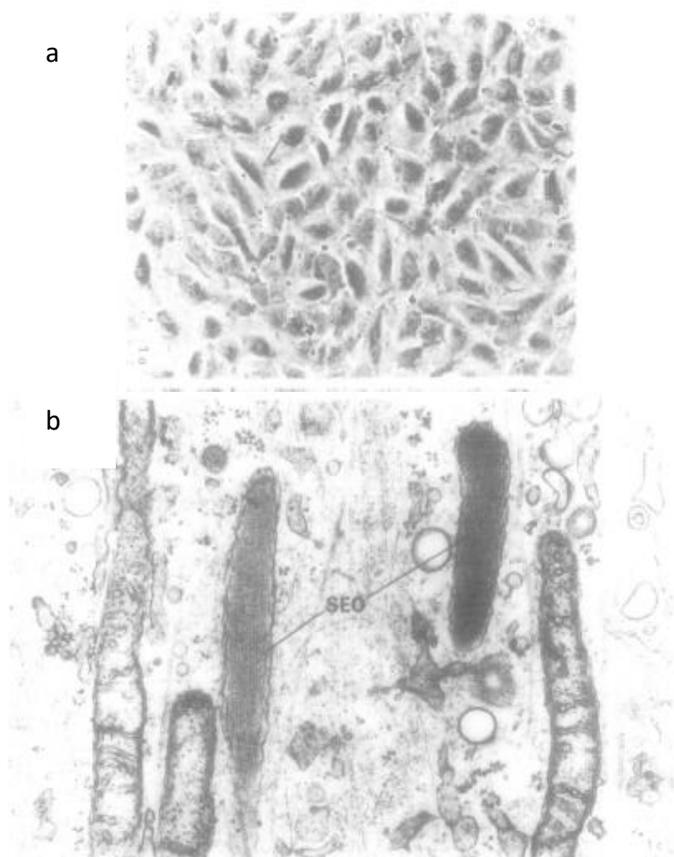


Figura 7. Micrografía de contraste de fases de células vivas. a) Endotelio primario confluyente formando monocapas de células poligonales con núcleos elipsoides que contienen 2 o 3 nucléolos.

b) Micrografía electrónica mostrando dos organelos específicos de células endoteliales (SEO) en un cultivo endotelial. Estos organelos, WPB, se caracterizan por una unidad de membrana que rodea túbulos de 150 Å de diámetro. Estos WPB no han sido reportados en otras células. X 60 000. (Imagen tomada de Haudenschild, 1976 ¹⁰³).

Después de 5 días de cultivo, crecieron células endoteliales formando una monocapa con un patrón en espiral poco definido. Las células eran homogéneas, cercanamente opuestas, largas y poligonales con un núcleo ovalado al centro. Por microscopía de contraste se pudo observar que los bordes celulares eran distintos y en algunas áreas aparecieron interdigitaciones que conectaban células separadas. La observación por microscopía de transmisión de electrones mostró células homogéneas, de 30x50 μm , planas, que crecían en una monocapa con bordes variados y núcleo prominente. Muchas células contenían yemas y fosas aparentemente en la superficie o cerca de la misma, predominantes en la región perinuclear o cerca de los bordes de la célula ⁴⁹.

Por microscopía de transmisión de electrones las células endoteliales vistas *in situ* en la vena del cordón umbilical se observaron delgadas y planas con vesículas pinocíticas y varias vesículas citoplasmáticas. El citoplasma también contenía cúmulos de ribosomas libres, retículo endoplásmico liso y rugoso, aglomeraciones de filamentos finos y microtúbulos prominentes. Adicionalmente, el citoplasma de estas células contenía numerosos cuerpos ovalados, en forma de varilla como aquellos descritos por Weibel y Palade en 1963⁴². En algunas células la cisterna del retículo endoplásmico estaba dilatada y contenía material granular. En otras células, el citoplasma contenía estructuras parecidas a cuerpos discoides descritos por Weibel-Palade⁴⁹.

Otra descripción de estas células reporta la formación de una monocapa uniforme de células poligonales en aproximadamente 1 semana (Figura 7). Se caracterizaron como células endoteliales por la presencia de WPB, vesículas pinocíticas, pequeñas cantidades de fibrillas de 100 Å localizadas cerca del núcleo, mitocondrias con formas tubulares, las cuales raramente mostraban ramificaciones; núcleo elipsoide con un fino patrón granular de cromatina condensada y de uno a tres nucléolos presentes en cada núcleo¹⁰³.

Los cultivos primarios de células endoteliales tienen una apariencia característica que las distingue de otro tipo de células. Conforme crecen y se expanden, las células crean contacto entre sí y aparecen siempre circunscritas por una capa de membrana basal. El núcleo contiene entre tres y cuatro nucléolos y el citoplasma es delgado y transparente. De tres a cuatro semanas, las células adquieren su típica forma de endotelio en monocapa confluyente, es decir, en forma hexagonal o cuboidal con un largo y redondo núcleo y poco superpuestas. Si se permite que las células permanezcan en confluencia, la monocapa decrece y se observan células elongadas más que cuboidales⁵³. Otras ultraestructuras características, encontradas en las EC son: nucléolos prominentes, región perinuclear rica en mitocondrias, retículo endoplásmico y complejos de Golgi, citoplasma periférico

atenuado conteniendo ribosomas libres y vesículas micropinocíticas y la presencia de abundantes microfilamentos en el citoplasma periférico ⁵¹.

Bajo el microscopio de electrones, el cultivo de células endoteliales tiene las características generales del endotelio vascular. Sin embargo, presentan mitocondrias elongadas con crestas paralelas y WPB. El citoplasma periférico muestra interdigitaciones complejas con células adyacentes, frecuentemente formando pequeños espacios en secciones cruzadas ⁵³.

Los WPB son gránulos ovoides, con forma de varilla y con una membrana que contiene arreglos paralelos de 6-26 estructuras tubulares, cada uno de aproximadamente 150 Å de ancho. Se trata de organelos de depósito para el factor VIII, poco frecuentes en microcapilares. La cantidad de éstos en las EC disminuye en función de la distancia desde el corazón ⁶⁹. Dichas estructuras son utilizadas para identificar a las células cultivadas como endotelio, ya que estos organelos no han sido descritos ni en fibroblastos ni en células del músculo liso ⁵¹.

Otra descripción común de las EC es la de capas confluentes con forma de guijarro (*cobblestone*) ^{48,69,86}, la cual simula la morfología del endotelio *in vivo*. Una vez que el cultivo se ha mantenido por largos periodos de tiempo, la monocapa comienza a desorganizarse. Así mismo, la morfología de guijarro también puede verse afectada por la exposición a un flujo dinámico. Así, las fuerzas de cizalla o de rozamiento pueden inducir la elongación de la célula en la dirección del flujo. Otra característica importante es su capacidad de formar estructuras parecidas a capilares cuando se colocan en una matriz de Matrigel, fibrina o colágeno y son estimuladas con suero o factores de crecimiento ^{69,114}.

Aun cuando las EC muestran numerosas características morfológicas, la examinación al microscopio no es suficiente para su identificación. Los WPB pueden identificarse solo por microscopía de electrones, pero son frecuentemente difíciles de localizar y el número de células que se puede identificar es limitado,

por lo que se sugiere la identificación de otros factores mencionados a continuación.

4.2 Marcadores celulares

Diferentes marcadores celulares están localizados en el citoplasma o membrana de las EC. Algunos de ellos son universales, como el CD31 y el factor VIII. Otros son específicos del tejido. A continuación, se presentan los marcadores más relevantes:

4.2.1 Marcadores proteicos

4.2.1.1 Molécula de adhesión endotelial a plaquetas (PECAM-1, endoCAM o CD31)

Es una glicoproteína de la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig). Esta proteína se encuentra en la membrana de las EC, cerca de las uniones intercelulares. Su principal función es regular la adhesión de las EC a otras EC y a los leucocitos ¹¹⁵. Es un marcador universal de endotelio, utilizado para la cuenta de microcapilares en muestras de tumores ⁶⁹. Sin embargo, se ha descrito que la molécula CD31 también puede ser expresada por monocitos y algunas poblaciones de leucocitos ¹¹⁶. Su detección se puede realizar mediante la técnica de citometría de flujo o por inmunofluorescencia ^{90,117}.

4.2.1.2 Antígeno CD36

También conocido como glicoproteína IV, este receptor es una glicoproteína transmembranal de 88 kD con un gran dominio extracelular y funge como receptor de adhesión para la trombospondina-1, entre otros. Originalmente encontrada en plaquetas y monocitos, también se expresa en células microvasculares, mas no en grandes vasos capilares ^{118,119}. Así mismo, se ha identificado no sólo en endotelio, sino en otras células como monocitos y en algunos tipos de células epidermales ¹¹⁹.

4.2.1.3 Antígeno CD34

El antígeno de células progenitoras humanas CD34 es una glicoproteína monomérica de 115kD que se expresa de forma selectiva en células progenitoras

hematopoyéticas de la médula espinal y en células endoteliales, en numerosos tejidos no hematopoyéticos, incluida la piel ¹²⁰; además de expresarse en células leucémicas y células madre ¹²¹. En otros estudios se ha descrito la expresión de CD34 en EC de capilares, arterias, venas, arteriolas y vénulas, así como en células de músculo liso de la aorta y algunos fibroblastos. Sin embargo, dicho marcador es comúnmente utilizado para detectar la presencia de EC mediante la técnica de inmunohistoquímica ^{69,121}.

4.2.1.4 VE-cadherina (CD144)

Las cadherinas son glicoproteínas transmembranales que promueven los contactos hemofílicos célula-célula dependiente de calcio. La VE-cadherina es un miembro de esta familia, encontrada específicamente en las uniones interendoteliales ¹²². Se ha demostrado que la VE-cadherina (o CD144) es necesaria para la génesis vascular y reparación de enfermedades vasculares ¹²³. Así mismo, esta proteína se utiliza como marcador de endotelio ⁶⁹, y para garantizar la madurez de las uniones célula-célula y la homogeneidad de las células HUVEC ⁹⁷.

4.2.1.5 Molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) y molécula vascular de adhesión celular-1 (VCAM-1)

Ambas moléculas son miembros de la superfamilia génica de inmunoglobulinas, y están implicadas en la adhesión de células inflamatorias del endotelio. Mientras la ICAM-1 media la adhesión de leucocitos al endotelio vía el antígeno-1 asociado a la función del linfocito (LFA-1), así como monocitos y neutrófilos vía Mac-1, la VCAM-1 puede mediar la adhesión al endotelio de células mononucleares vía dos ligandos de la familia de las integrinas, llamados integrina- $\alpha 4\beta 1$ e integrina activada- $\alpha 4\beta 7$ (o VLA-4) ¹²⁴. Su localización se puede realizar mediante el uso de anticuerpos monoclonales: CD54 para la molécula ICAM-1 y CD106 para la molécula VCAM-1 ^{69,86,125}.

4.2.1.6 Endotelina-1 (ET-1)

La ET-1 es un potente péptido vasoconstrictor que actúa de forma parácrina y local, mediante la unión a su receptor de endotelina-1. Se ha encontrado que los niveles de este péptido se encuentran incrementados en ciertas patologías como son la hipertensión, uremia y choque cardiogénico ¹²⁶. Se trata de la única endotelina producida por las EC. La inmunoreactividad de la ET-1 es revelada en los sobrenadantes de las EC por radioinmunoanálisis o por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) ⁶⁹.

4.2.1.7 Selectinas (E y P)

Las selectinas E y P son moléculas de adhesión que se encuentran en las EC. Pertenecen a la familia de lectinas dependientes de calcio y se encargan de dar soporte a la adhesión inicial y extravasación de los leucocitos ¹²⁷ en la superficie del endotelio a través del reconocimiento de carbohidratos, además de mediar la adhesión de leucocitos en condiciones de fuerzas de rozamiento (*shear stress*) ¹²⁸. La adhesión es mediada por la expresión de integrinas en los leucocitos y miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas como contrarreceptores expresadas por las EC ¹¹⁵.

La E-selectina, considerada un marcador de activación celular, media la interacción inicial de baja afinidad entre los leucocitos y la pared del vaso sanguíneo (*leukocyte rolling*). Esta proteína es expresada exclusivamente en las EC al ser estimuladas con citocinas inflamatorias ¹²⁷; sin embargo, es capaz de promover la adhesión de leucocitos de múltiples tipos celulares ¹²⁹. La P-selectina media la formación de rosetas de plaquetas activadas sobre los leucocitos ¹²⁸.

4.2.1.8 Antígeno del factor VIII o factor de von Willebrand (vWF)

El antígeno del factor VIII (F-VIII) es perinuclear y se ha asociado a los WPB. El vWF es sintetizado por células del endotelio vascular y es considerado como uno de los marcadores específicos de endotelio. Éste es expresado de forma normal

en células endoteliales, mientras que su expresión se reduce dramáticamente en células vasculares dañadas ^{69,123}.

El vWF tiende a disminuir con cada resiembra, llegando a tener un porcentaje de tinción del 93, 77 y 63% en las resiembras 3, 9 y 11 respectivamente. Esto indica que en las primeras resiembras las células se dividen de forma activa y contribuyen al crecimiento de los cultivos. Sin embargo, la población de células que se dividen disminuye rápidamente, mostrando que a un mayor número de resiembras, el número de células gigantes incrementa dramáticamente ⁵². La detección del vWF, mediante inmunofluorescencia, puede ser usado para garantizar la madurez de uniones y homogeneidad de las células HUVEC⁹⁷, así como para su identificación ¹¹⁵.

4.2.1.9 Molécula de adhesión de leucocitos de células endoteliales (ELAM-1)

Se trata de una proteína miembro de la familia de moléculas de adhesión de las selectinas (específicamente, a moléculas de lectina de adhesión celular LEC-CAM) que se encargan de mediar las interacciones entre leucocitos y endotelio. Debido a que el dominio N terminal contiene un motivo de lectina, se cree que dicha molécula reconoce ligandos constituidos de carbohidratos. La presencia de dicha estructura tanto en leucocitos como en otras células es suficiente para que la molécula ELAM-1 medie la adhesión activada por IL-1 en las células endoteliales ¹³⁰.

4.2.1.10 Claudina-5

Así como las EC expresan VE-cadherina en las uniones adherentes, también expresan claudina-5 en las uniones estrechas. Dicha proteína, que se expresa de forma ubicua, se encuentra concentrada en los bordes entre células endoteliales de vasos sanguíneos, pero no de células epiteliales (que también presentan uniones estrechas). La adhesión mediada por claudina-5, a diferencia de la VE-cadherina, es independiente de calcio, y si bien la resistencia en las barreras que crea ésta proteína es mínima en células HUVEC, es un marcador para otras EC

(como células dérmicas endoteliales de la microvasculatura) ¹³¹. La claudina-5 puede ser detectada por microscopía inmunofluorescente ¹³².

4.2.1.11 Integrina $\alpha_v\beta_3$

La integrina $\alpha_v\beta_3$ es un receptor expresado por las EC para proteínas de la ECM, como vitronectina, fibronectina y el VWF. Es considerada como un marcador de angiogénesis ¹³³, y su principal acción es mantener la integridad de la pared de los vasos sanguíneos. Esta puede ser localizada por la técnica de citometría de flujo, utilizando anticuerpos monoclonales CD51/61 ¹¹⁵.

4.2.2 *Actividad enzimática*

4.2.2.1 Enzima convertidora de angiotensina I (ACE)

Esta enzima cataliza la conversión de angiotensina I en el péptido vasoactivo angiotensina II y es responsable del catabolismo de la bradicinina. La presencia de esta enzima puede ser demostrada en células HUVEC de forma indirecta por microscopía inmunofluorescente. Además, su actividad enzimática puede ser medida en medios condicionados, mediante el uso de sustratos cromogénicos o fluorogénicos ⁶⁹.

4.2.2.2 Expresión y actividad de la óxido nítrico sintasa (eNOS)

La expresión de la NOS, y en particular de la forma endotelial constitutiva (eNOS) es monitoreada a distintos niveles: a) a nivel genético, b) a nivel de proteína, por inmunohistoquímica en monocapas subconfluentes y c) por Western blot en lisados celulares. La principal actividad de la enzima, así como aquella obtenida en respuesta a estímulos específicos con bradicina, sustancia P o VEGF, es evaluada mediante la conversión de L-[³H]-arginina en L-[³H]-citrulina, ambas en lisados celulares en monocapas subconfluentes; además se mide la acumulación de nitritos en el sobrenadante ⁶⁹.

4.2.3 Otros marcadores

4.2.3.1 Antígenos ABH en células endoteliales.

Las células endoteliales contienen antígenos ABH propios del tejido del tipo de sangre del donador, mientras que el tejido conectivo y el músculo liso carecen de este sistema de antígenos. Para identificarlos, se puede hacer uso de la aglutinina de una planta llamada *Ulex europaeus*⁸⁶. Cuando las células HUVEC son tratadas e incubadas con anticuerpos, éstas emiten fluorescencia, indicando la presencia del antígeno H, en tanto que células del músculo liso y fibroblastos carecen del mismo⁴⁹.

4.2.3.2 Incorporación de lipoproteínas acetiladas de baja densidad (Dil-Ac-LDL)

En este ensayo, las células son incubadas en presencia de lipoproteínas de baja densidad (LDL) acetiladas y el consumo de éstas es monitoreado por microscopía fluorescente. Esta técnica puede ser utilizada para verificar la presencia de endotelio y no de células vasculares del músculo liso. Así mismo, este marcador, así como la ACE, es constitutivo, por lo que puede ser modulado *in vitro*, dependiendo del estado de confluencia del cultivo^{69,86}.

Las lipoproteínas son marcadas con una sonda fluorescente conocida como perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametil-indocarbocianina o Dil, el cual es una molécula altamente lipofílica y puede ser incorporada de forma no covalente en las lipoproteínas. Debido a esto, la sonda no es capaz de ejercer efecto alguno sobre la carga de la superficie celular. Una vez que una lipoproteína que contiene el Dil es asimilada por una célula, las enzimas lisosomales actúan sobre ella, por lo que la sonda se acumula en las membranas lisosomales¹³⁴. La ventaja de utilizar el metabolismo de las LDL como marcador es que permite el marcado de células endoteliales viables, sin la necesidad de fijarlas o permeabilizarlas¹²³.

4.2.3.3 Liberación de prostaciclina (PGI₂)

Las prostaglandinas son productos de la vía metabólica del ácido araquidónico, sintetizadas por varios tejidos incluyendo las células del endotelio vascular. La PGI₂ es un potente vasodilatador que relaja el tono vascular del músculo liso en las terminales arteriolas ¹³⁵. Así mismo, las prostaglandinas están involucradas con la generación de inflamación aguda, mediante la unión específica a proteínas G ¹³⁶. La producción y liberación de PGI₂ en el sobrenadante es medida por kits comerciales de radioinmunoensayo, como el 6-keto-prostaglandina (PGF)_{1α} ⁶⁹.

4.2.3.4 Formación de capilares

La membrana basal del Matrigel es un extracto solubilizado de la ECM del sarcoma de *Engelbreth-Holm-Swarm (EHS)* ¹³⁷. Sus componentes y proporciones son típicas de la mayoría de las membranas basales; sin embargo, posee dos componentes principales: laminina y colágeno tipo IV. Así mismo, contiene proteoglicanos con cadenas de heparán sulfato, entactina (nidogen-1) y algunos otros componentes menores. El Matrigel es utilizado para formar un sustrato o un gel de tres dimensiones, en el cual las EC forman túbulos que simulan las relaciones celulares microanatómicas de la situación *in vivo* ¹⁰⁴.

Este ensayo es utilizado para evaluar la capacidad angiogénica de las células endoteliales mediante la observación de la formación de estructuras tubulares empleando diferentes técnicas de microscopía, por ejemplo microscopía digital en campos de bajo poder ⁹³, microscopía fluorescente ¹²³, microscopía invertida ^{138,139}, microscopía de contraste de fase inversa ¹⁴⁰; mediante el uso de *softwares* (Scion image ¹⁴¹) o por medio de fotografías ¹⁴².

4.3 Perfil de expresión de células endoteliales

Los genes expresados en EC han sido identificados a través de técnicas de clonación de moléculas que median procesos específicos de la pared vascular. Genes endoteliales identificados de esta manera incluyen a las moléculas PECAM, VCAM y endotelina-1. También se ha realizado el perfil transcripcional con microarreglos, el cual provee un nuevo acercamiento a la caracterización de genes específicos de EC. Estos estudios pueden llevarse a cabo con muestras de ácido ribonucleico (RNA) de cultivos celulares, que son hibridizadas en arreglos génicos. Los resultados de estos análisis son presentados en forma de mapas de calor (*heat maps*), los cuales son una representación gráfica de la expresión relativa de genes. Con esta tecnología ha sido posible identificar marcadores endoteliales tales como CD31, VE-cadherina, multimerina, el receptor cinasa con inserción de dominio (KDR) de células endoteliales vasculares y el vWF. Los genes adicionales que son expresados preferentemente por EC incluyen el receptor endotelial de diferenciación de esfingolípidos anclado a proteínas G (EDG-1), el receptor de adhesión celular a melanoma (MCAM), la endotelina-1, ICAM-2, receptor de proteína C, timosina- β 4 y el activador/inhibidor de plasminógeno tipo I. Otros genes expresados diferencialmente entre diferentes tipos de EC incluyen la trombomodulina, la aldo-ceto reductasa 3, el dominio 2 de asociación a Ras, la metaloproteasa de matriz 10 y ESM-1, así como cierto número de marcadores de secuencias expresadas (EST)¹¹⁶. Sin embargo, existen discrepancias en el número de genes que codifican para marcadores endoteliales; mientras algunos autores aseguran que son 64¹¹⁶, hay otros que aseguran que son 184 genes¹³⁹.

5. APLICACIONES DEL CORDÓN UMBILICAL COMO MODELO ENDOTELIAL

La habilidad de investigar el papel de variables individuales es fundamental para incrementar el entendimiento de cualquier condición o enfermedad en estudio. De ahí que el modelo endotelial de células HUVEC sea de gran importancia, pues al ser un modelo que utiliza células humanas, éste otorga mayor precisión en relación con los ensayos clínicos que son realizados posteriormente en humanos.

Las CVD son la principal causa de muerte y discapacidad en el mundo ¹⁴³. Muchas enfermedades cardiovasculares son causadas por daño y disfunción de las EC, lo cual ocurre en enfermedades metabólicas crónicas, como el síndrome metabólico o DM2. Así pues, la integridad del endotelio vascular es afectado por la proliferación y apoptosis de las EC, las cuales aseguran la función de los vasos sanguíneos ¹⁴⁴.

5.1 Aplicaciones en el estudio de enfermedades cardiovasculares

Las células del endotelio vascular responden a las fuerzas hemodinámicas ejercidas sobre éstas, y modulan sus funciones en consecuencia. Si bien las fuerzas de rozamiento son el fenómeno que más ha sido estudiado, se sabe que la presión hidrostática y las fuerzas de tracción también son capaces de modular la expresión génica. Así pues, se ha encontrado que la expresión de moléculas de adhesión y quimiocinas está modulada por las fuerzas de rozamiento, lo que sugiere que el reclutamiento de leucocitos puede estar relacionado con el condicionamiento físico de las células endoteliales en regiones específicas del sistema circulatorio. Las células endoteliales *in vivo*, están continuamente expuestas a las fuerzas de rozamiento, las cuales pueden diferir en el tiempo y entre diferentes partes del cuerpo. Sin embargo, la mayoría de los estudios de endotelio se realizan en condiciones estáticas o bien, examinan la transición entre condiciones estáticas y de flujo. En este contexto, Sheikh y colaboradores en el 2004 desarrollaron un sistema, a partir de células HUVEC, que no solo permitió estudiar los efectos de las fuerzas de rozamiento en la regulación de la adhesión de leucocitos y migración, sino también demostró que estas fuerzas modifican el reclutamiento de neutrófilos de las EC en respuesta al tratamiento con TNF- α . Entre las principales ventajas de dicho sistema está la capacidad de cultivar múltiples muestras en paralelo, además de que puede ser útil para investigar los efectos de los posibles factores liberados de EC sometidas a dichas fuerzas en cultivos pareados. Así por ejemplo, la respuesta al TNF- α de los cultivos estáticos pareados con aquellos sometidos a flujo, difirieron de aquellos cultivos estáticos en cajas Petri separadas. Así mismo, la naturaleza del tubo que suministraba el flujo y la temperatura del medio recirculante pudieron influenciar en la respuesta del endotelio. Adicionalmente, el sistema puede ser usado para exponer a las EC a diferentes flujos (flujo pulsátil, oscilatorio, constante, etc). Diferentes niveles de fuerzas de rozamiento causan una regulación diferencial en la respuesta de las EC

145

Desde la implantación del primer stent (dispositivo que funciona como una endoprótesis vascular) en una arteria coronaria humana en 1987 por Sigwart y colaboradores (citado por Yang ¹⁴³), los stent metálicos vasculares se han convertido en uno de los tratamientos más comunes para las CVD avanzadas. Sin embargo, el uso de estos dispositivos conlleva a ciertas desventajas, como el desarrollo de restenosis y trombosis. De ahí el ahínco de mejorar la biocompatibilidad de los stents. Un stent ideal debe exhibir de forma simultánea propiedades anticoagulantes y antiproliferativas, así como promover la regeneración de endotelio sano; sin embargo, hay muy pocas moléculas que poseen dicho perfil. Un candidato potencial es el NO, una molécula celular de señalización que se produce de forma constitutiva en las EC a través de la conversión enzimática de la L-arginina por la eNOS. La constante liberación del NO es fundamental para mantener la homeostasis cardiovascular y regular la vasodilatación. Además, el NO juega un papel crucial en la prevención de trombosis, en la inhibición de la proliferación y adhesión de las células vasculares del músculo liso y en la inhibición de la activación leucocitaria. También se ha encontrado que el NO tiene otras funciones biológicas importantes relacionadas con la respuesta inmune, como anticancerígeno y con efectos antibacteriales. Así pues, para probar que compuestos de organoselenio tienen actividad catalítica similar a la glutatión peroxidasa (GPx) para generar NO a partir de donadores endógenos de NO (RSNO), Yang y su equipo en el 2015 ¹⁴³ utilizaron células HUVEC como modelo de endotelio. El revestimiento bioactivo fabricado a partir de dichos compuestos demostró proveer de un microambiente capaz de mimetizar al endotelio y promover la recuperación endotelial en la superficie luminal del stent

¹⁴³

El crecimiento fetal reducido no solo se ha asociado con disfunción vascular en la edad adulta, sino que también se ve deteriorada la vasodilatación dependiente del endotelio en fetos. Estos cambios funcionales están asociados a la alteración de la expresión de diversos mediadores vasculares en las EC derivadas fetoplacentarias, incluyendo la eNOS y la arginasa-2. Por otra parte, los

mecanismos epigenéticos juegan un papel clave en el desarrollo vascular, su fisiología y fisiopatología. La expresión basal de varios genes cruciales para la función endotelial, como la eNOS y otros, está controlada por la metilación del DNA y las modificaciones post-transcripcionales de las histonas. Estos mecanismos operan de una manera gen-específica en las EC, sugiriendo la existencia de un código epigenético específico de endotelio. Un estudio realizado por Krause y colaboradores en 2013 ¹⁴⁶ examinó el papel de la DNA metiltransferasa 1 (DNMT1) dependiente de metilación y la expresión alterada de la eNOS en células HUVEC para la restricción de crecimiento intrauterina. Este es el primer estudio en demostrar un efecto epigenético en la expresión de la eNOS en EC humanas derivadas de fetos con una trayectoria de crecimiento alterada. Una comparación del patrón de metilación del promotor *NOS3* en EC normales reveló diferencias en tres islas CpG específicas. Una de ellas –en la región 352- pudiera jugar un papel en la regulación diferencial de la expresión basal de la eNOS en el endotelio de venas y arterias. La hipoxia crónica es un factor importante en los embarazos que presentan restricción de crecimiento intrauterino. Así, las células HUVEC aisladas de estos casos muestran niveles de expresión reducidos de la eNOS, en comparación con embarazos normales. Esto demuestra que los procesos epigenéticos pueden afectar la respuesta a hipoxia. Finalmente, la metilación del DNA mediada por el promotor del gen *NOS* en embarazos con restricción de crecimiento intrauterino no solo controla la expresión basal, sino también las respuestas celulares a factores que causan estrés (estresores) ¹⁴⁶.

Las enfermedades de los vasos sanguíneos periféricos y cardiovasculares son las condiciones más comunes durante la vejez. Usualmente, la aterosclerosis resulta ser la enfermedad subyacente, la cual es iniciada y agravada por los continuos defectos en la integridad del endotelio vascular, resultando en oclusión de vasos y daño subsecuente y disfunción de los tejidos y órganos involucrados. Una de las terapias más utilizadas para dichas condiciones es el uso de MSC. Se sabe que dichas células son capaces de liberar grandes cantidades de microvesículas bajo condiciones de hipoxia o privación de suero. Estas microvesículas son después

internalizadas por las EC, mejorando así la proliferación *in vivo*, la formación de vasos y promoviendo el proceso de angiogénesis. Recientemente se ha encontrado que las microvesículas son un mediador vital de la comunicación entre células, siendo la internalización de las mismas la clave de dicho proceso. El estudio realizado por Wei y su equipo en el 2016 ¹⁴⁷ demostró, mediante el uso de células HUVEC como modelo de endotelio, que la fosfatidilcolina expresada en microvesículas de MSC sometidas a hipoxia, y el receptor de fosfatidilcolina en células HUVEC, son esenciales en la incorporación de las vesículas al endotelio. Dicha información puede proveer de nuevas estrategias para el diseño de nuevos tratamientos terapéuticos para las condiciones mencionadas ¹⁴⁷.

La disfunción endotelial es reconocida como un factor de riesgo independiente en el desarrollo de CVD. La angiotensina II (Ang II) juega un papel fundamental en la regulación de la función cardiovascular. En estados patológicos, la Ang II activa diversas cascadas de señalización al unirse al receptor de Ang II (AT1R) en la vasculatura, dando lugar a la disfunción endotelial, hipertensión e inflamación vascular, todo lo cual está relacionado con la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) mediante la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa. Las ROS son los principales inductores de apoptosis. En condiciones de homeostasis, existe un balance entre la generación y eliminación de ROS. Cuando dicho equilibrio es alterado, la membrana mitocondrial es destruida debido a los niveles excesivos de ROS, lo que conduce a la liberación del citocromo C, dado que la expresión de Bax aumenta, activación de caspasas (específicamente la 3) y apoptosis. La expresión de la proteína antioxidante Bcl-2 también se ve reducida, lo que evita que ejerza su función antiapoptótica. Así mismo, la sobreproducción de ROS en las células puede causar daños permanentes en la transducción de señales e inducir la expresión de genes pro-inflamatorios, como *ICAM-1* y *VCAM-1*. Un flavonoide extraído de *Carthamus tinctorius* se ha usado como tratamiento para enfermedades cardiocerebrovasculares en la medicina tradicional china. Recientemente Wang y su equipo de trabajo ¹⁴⁸ encontraron en cultivos de células HUVEC que dicho flavonoide exhibe un fuerte efecto antioxidante, ya que

incrementa la actividad de la superóxido dismutasa y de la glutatión peroxidasa e inhibe el daño a células nerviosas inducido por estrés oxidante vía la regulación de la expresión de la vía Bcl-2/Bax. El co-tratamiento de Ang II y el flavonoide revirtió significativamente el daño al endotelio, en comparación con el tratamiento con Ang II sola. La Ang II es una importante hormona bioactiva del sistema renina-angiotensina y tiene un papel central en el control de CVDs como la aterosclerosis y la hipertensión. Además, se ha sugerido que tiene efecto sobre las EC y media la disfunción endotelial ¹⁴⁸.

La hipertensión y la hiperlipidemia como factores de riesgo independientes para la CAD, pueden acelerar la progresión de la aterosclerosis y en consecuencia de ésta también. Por una parte, la hipertensión causa disfunción endotelial, probablemente debido a la regulación a la alta de las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, las cuales promueven la adhesión de leucocitos al endotelio, así como inflamación. Por otra parte, la hiperlipidemia contribuye a la disfunción endotelial acompañada por la expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas y por lo tanto conduce a la infiltración subintimal temprana de células mononucleares. El factor de inhibición de la migración (MIF) es una citocina altamente conservada que tiene impacto en el infarto agudo al miocardio. Así mismo, su expresión también se ha correlacionado con el incremento en el adelgazamiento de la íntima y la deposición lipídica en las placas de la arteria carótida humana y se ha encontrado que el MIF promueve la expresión endotelial de ICAM-1 y VCAM-1. El MIF se ha encontrado elevado en la aorta de pacientes con hipertensión e hiperlipidemia, y se cree que juega un papel importante en la patología del síndrome metabólico. En un reporte publicado por Zhou y colaboradores en el 2016, donde se utilizaron células HUVEC como modelo de endotelio, se encontraron niveles de MIF significativamente elevados en plasma de pacientes con ambas afecciones. Se comprobó que el plasma de los pacientes estimuló significativamente la expresión de ICAM-1 y VCAM-1 en la superficie de estas células, lo que indica que altos niveles de MIF pueden contribuir a la deteriorada función endotelial en pacientes con hipertensión e hiperlipidemia. El

MIF puede actuar como un marcador potencial de la función endotelial en hipertensión e hiperlipidemia ¹⁴⁹.

La aterosclerosis es un proceso complejo que incluye eventos pro-inflamatorios y pro-oxidativos, los cuales reclutan e inducen a monocitos y linfocitos a adherirse a la superficie del endotelio dañado como el primer evento observable. Estudios epidemiológicos han reportado que numerosos factores de riesgo para la aterosclerosis, como factores de riesgo genéticos y ambientales, fumar, la dieta, infecciones y contaminación del aire, pueden inducir ROS, las cuales son importantes productos del estrés oxidante y contribuyen a la fisiopatología de muchas enfermedades crónicas inflamatorias. A nivel fisiológico, las ROS también funcionan como una molécula de señalización que participa en procesos de inflamación y supervivencia celular en distintas vías de señalización que involucran a p38, Ras/ERK, Akt, NF- κ B y Nrf2. El TNF- α es una citocina multifuncional que se cree media la respuesta inflamatoria al activar vías de señalización asociadas (como MAPK y NF- κ B) e induce la activación de otras citocinas, y la producción de ROS, lo que resulta en un círculo vicioso que agrava los procesos inflamatorios. Por lo tanto, se cree que la reducción de la inflamación y el estrés oxidante en las células endoteliales vasculares mediante la interrupción de las vías de señalización de MAPK y/o NF- κ B utilizando agentes farmacológicos, es una estrategia benéfica para el tratamiento de enfermedades vasculares. En este contexto, se realizó un estudio enfocado en evaluar los efectos de la luteolina, una flavonona con propiedades antioxidantes y anti-inflamatorias, en la expresión y función de Nox4, NF- κ B, p38 y ERK1/2 respecto a la respuesta inflamatoria y estrés oxidante inducido por TNF- α en EC vasculares. Los resultados del estudio realizado por Xia y colaboradores en el 2014 muestran que el tratamiento con luteolina atenúa la generación de ROS en células HUVEC expuestas a TNF- α debido a que inhibe a las subunidades Nox4 y p22phox de la NADPH oxidasa, identificada como la mayor fuente de ROS en la vasculatura. Se encontró incluso que la expresión de Nox-4 tiene efecto sobre la expresión de ICAM-1, VCAM-1 y Blc-2. Esto indica que tanto Nox-4 como las ROS participan de forma importante

en la progresión de la aterosclerosis y que la luteolina atenúa el estrés oxidativo inducido por TNF- α . Otro posible mecanismo de acción de la luteolina es que revierte los efectos de TNF a nivel del glutatión (GSH) y la actividad de la superóxido dismutasa (SOD). En muchos estudios se ha demostrado que la translocación de NF- κ B está relacionada con la apoptosis, a través de la activación de las caspasas 3 y 9 y la reducción de Bcl-2. La apoptosis no solo induce la inestabilidad y ruptura de la placa aterosclerótica, si no que promueve la absorción de ox-LDL endoteliales por macrófagos, transformándolas en células espumosas; por lo tanto, inhibir la translocación nuclear a NF- κ B puede ser un enfoque efectivo para suprimir la progresión de la aterosclerosis. Se concluye que Nox4/ROS- NF- κ B juegan un papel central en la patogénesis de la aterosclerosis causada por estrés oxidante e inflamación ¹⁵⁰.

La hipertensión exhibe efectos pro-inflamatorios en la arteria, estimulando genes involucrados en el reclutamiento de células inflamatorias en la pared arterial. El sulfuro de hidrógeno (H₂S) es una molécula fisiológica que actúa como mensajero, y está involucrada en la salud cardiovascular. El H₂S es generado en la periferia por la γ -cistationina liasa (CSE), mientras que en el cerebro su biosíntesis involucra a la cistationina- β sintasa (CBS). Por otra parte, se ha demostrado que el zofenoprilato, el metabolito activo del inhibidor de la ACE zofenopril, controla las características angiogénicas en el endotelio vascular a través de la producción enzimática de H₂S mediante regulación positiva de CSE. El zofenoprilato es el más efectivo de los inhibidores de la ACE que favorece la supervivencia de las EC y prolonga su tiempo de vida útil, restaurando sus funciones después del daño vascular, promoviendo la angiogénesis. En un estudio realizado por Monti y colaboradores en el 2016 ¹⁵¹, se demostró que el zofenoprilato abate las características inflamatorias inducidas por la IL-1 β en células HUVEC de una manera mediada por CSE/H₂S, en especial a la vía bioquímica de NF- κ B/ciclooxigenasa-2. Así mismo, se redujo la expresión de marcadores como CD40 y CD31, involucrados en el reclutamiento de células mononucleares y plaquetas ¹⁵¹.

5.2. Aplicaciones en el estudio de angiogénesis

Entender el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos se ha convertido en el principal objetivo de las más recientes actividades de investigación.

El proceso de angiogénesis, o la formación de nuevos vasos capilares a partir de vasos preexistentes, juega un papel fundamental en un número considerable de procesos fisiológicos y patológicos, particularmente en el crecimiento de tumores y metástasis. El brote angiogénico de los vasos sanguíneos se completa en tres pasos: proliferación de las células endoteliales, ruptura de la ECM y migración de las EC. La inducción de estos procesos mediante factores angiogénicos liberados tanto por tumores como por células del hospedero, depende del balance neto de reguladores positivos y negativos. La degradación de la ECM y la membrana basal es uno de los eventos cruciales en el proceso de angiogénesis. Las metaloproteasas de matriz (MMPs), pertenecientes a la familia de las endopeptidasas, son capaces de degradar las membranas basales y los componentes de la ECM. Por ello es que la expresión incrementada de estas proteínas ha sido fuertemente implicada en el crecimiento e invasión tumoral y metástasis. El factor nuclear NF- κ B es un factor de transcripción que contribuye al desarrollo del cáncer al regular un gran número de genes involucrados en los procesos de angiogénesis y tumorigénesis. Una vez activado, NF- κ B, p50 y p65 se traslocarán al núcleo y regularán positivamente varios genes necesarios para la angiogénesis del tumor. El trabajo realizado por Pratheeshkumar y Kuttan en el 2011 ¹⁵² indica que la sobreexpresión de NF- κ B es el componente clave de la cascada angiogénica. Se han desarrollado varias estrategias antiangiogénicas para inhibir el crecimiento tumoral al apuntar a diferentes componentes de la angiogénesis tumoral. Entre ellas se encuentra el uso de fitoquímicos con gran potencial como agentes antiangiogénicos, y más precisamente, del andrografólido, el cual es un diterpeno proveniente de *Andrographis paniculata* que exhibe propiedades antiulcerogénicas, antipiréticas, anti-inflamatorias e inmunomoduladoras. Dicho compuesto inhibe de forma significativa la invasión, migración y formación de capilares de las EC. Así mismo, la expresión de las

MMP-2 y MMP-9 es regulada negativamente e inhibe la activación o traslocación nuclear de factores de transcripción como NF-κB p50, NF-κB p65, entre otros ¹⁵².

Para entender mejor la interacción entre células, las moléculas de señalización y el microambiente físico, es necesario desarrollar técnicas efectivas de vascularización. Estudios previos han utilizado microtecnología para probar el microambiente angiogénico. Así, las EC son capaces de unirse para formar estructuras vasculares cuando están rodeadas de matriz extracelular, y expuestas a factores angiogénicos. Los modelos de angiogénesis *in vitro* proveen una excelente herramienta para estudiar las interacciones entre células en el contexto de la señalización paracrina y autocrina, así como el contacto con la ECM y entre células heterotípicas. Los factores angiogénicos liberados por las EC inducen el reclutamiento de MSC durante los brotes angiogénicos, lo que muestra que las MSC provenientes de ciertas fuentes dan soporte a la formación de estructuras vasculares estables, al proporcionar tanto factores angiogénicos como estabilizadores. Así pues, Trkov y su equipo en 2011 ¹⁵³ se dieron a la tarea de investigar las interacciones funcionales entre las MSC y las EC utilizando un simple pero altamente controlable sistema de hidrogel. Dicho sistema tiene como propósito explorar la naturaleza de la comunicación entre las MSC y las células HUVEC para comparar el potencial vasculogénico de las diferentes poblaciones de células mesenquimales (de médula ósea, vena y arteria umbilical humana). Estudios anteriores han sugerido que los factores de crecimiento liberados de las células endoteliales inducen la migración de MSC indiferenciadas hacia las EC. Para ello, los factores liberados por las EC establecen una distancia dependiente de un gradiente quimiotáctico en una matriz de fibrina que estimula la migración direccionada de las MSC. En resumen, el sistema de co-cultivo en hidrogel es de gran utilidad como una nueva plataforma para estudiar la vasculogénesis bajo condiciones de espacio controladas ¹⁵³.

Las células endoteliales vasculares juegan un papel importante en la regulación de tono y permeabilidad vascular, angiogénesis y en la respuesta vascular

inflamatoria. Estudios previos han demostrado que la inflamación crónica está ligada al proceso de angiogénesis; otros han demostrado que la inflamación está ligada a la angiogénesis a través de mecanismos que involucran la activación del endotelio. Las EC primero escapan de su localización a través de la membrana basal y migran hacia el estímulo angiogénico y proliferan para proveer el número necesario de células para generar nuevos vasos sanguíneos. Durante la activación de EC, éstas producen moléculas de adhesión y múltiples citocinas, las cuales pueden reclutar leucocitos a sitios de inflamación, promoviendo así la angiogénesis. La niclosamida es un antihelmítico oral utilizado en el tratamiento contra *Taenia sp*; recientemente varios estudios han mostrado que la niclosamida tiene actividad anticancerígena y podría, a su vez, tener un papel potencial en la regulación inmunológica y un efecto antiinflamatorio. Debido a que varias enfermedades tienen una base molecular común y tienen blancos celulares similares, se ha considerado el uso de un mismo fármaco para múltiples tratamientos. El estudio llevado a cabo por Huang M. y colaboradores en 2015⁹³ demostró que la niclosamida inhibe la adhesión de leucocitos mononucleares a las células endoteliales y suprime la expresión de ICAM y VCAM *in vitro* de forma dosis-dependiente. Así mismo, dicho fármaco es capaz de suprimir el proceso de angiogénesis inducido por VEGF *in vitro* e *in vivo*. Adicionalmente, la niclosamida es capaz de favorecer la activación de NF-κB mediada por la cinasa IκB (IKK) en EC inducidas por TNF-α, suprimir la activación del receptor de VEGF (VEGFR2) en células inducidas con VEGF y regular negativamente las vías P-AKT, PmTOR y P-p70S. Además, el fármaco suprime la proliferación y migración de las EC, y por lo tanto la inflamación y angiogénesis. Se demostró también que la activación de EC utilizando TNF-α incrementa la adhesión de leucocitos a las EC, pero la niclosamida inhibe estas interacciones. Así pues, se cree que la niclosamida ejerce su efecto antiinflamatorio al modular la expresión de moléculas de adhesión, al suprimir la unión de leucocitos a las células HUVEC, inhibiendo la actividad de NF-κB y la proliferación celular, la angiogénesis inducida por VEGF y AKT y su cascada de señalización⁹³.

Recientemente se han realizado investigaciones para identificar nuevos mecanismos del proceso de angiogénesis. Los mecanismos subyacentes a la angiogénesis han sido extensivamente estudiados en los últimos 40 años, resultando en una mejor comprensión de los procesos celulares complejos que juntos inician y mantienen la angiogénesis, así como de importantes blancos terapéuticos. Se ha reportado que el H₂S, el cual señala en parte a través de los canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}), puede inducir respuestas angiogénicas que son eliminadas por la inhibición de dichos canales. Adicionalmente, el péptido natriurético tipo C (CNP), que también media algunos de sus efectos a través de la activación de los K_{ATP}, ha mostrado promover el crecimiento de las EC *in vitro* y la angiogénesis colateral *in vivo*. Lo anterior permite especular la posibilidad de que la activación de los K_{ATP} dispare la angiogénesis en respuesta a diferentes estímulos fisiológicos. Los K_{ATP} están regulados por una variedad de factores fisiológicos como hipoxia e isquemia, así como por niveles hormonales. Los K_{ATP} son proteínas hetero-octaméricas de la membrana que permiten el flujo selectivo de iones K⁺ a través de la membrana plasmática y la mitocondria, a través de una vía permeable. Existen dos subtipos de canales: K_{ir}6.1 y K_{ir}6.2. El objetivo del estudio realizado por Umaru y colaboradores en 2015¹⁴¹ fue conocer si la estimulación directa de estos canales inducía el crecimiento, migración y formación de capilares en EC, proceso crítico durante la formación de nuevos vasos sanguíneos. El estudio estableció así al CNP como el segundo polipéptido angiogénico, además del VEGF, cuyos efectos también están mediados por los canales; así mismo el H₂S participa en las respuestas angiogénicas del CNP a través de la subunidad K_{ir}6.1. Dichas moléculas deben ser consideradas para uso clínico, y reexaminarse bajo esta nueva perspectiva¹⁴¹.

La angiogénesis es esencial en la reparación de tejido; ocurre en heridas vasculares causadas por varias patologías, como CVD y muchas otras enfermedades crónicas metabólicas. Por lo tanto, los factores que pueden restaurar el daño al endotelio y estimular nuevo crecimiento colateral de vasos pueden tener papeles fundamentales en el tratamiento de daño vascular. En este

sentido, el ejercicio es la mejor manera de prevenir tanto CVD como enfermedades metabólicas. La irisina, secretada por el músculo esquelético en respuesta a PGC-1 α durante el ejercicio, es un fragmento peptídico escindido y secretado del dominio de la fibronectina tipo III contenido en la proteína 5 (FnDC5), un tipo de proteína transmembranal del músculo esquelético. Se cree que la irisina está involucrada en el incremento del gasto energético del cuerpo, reduciendo así el peso, y aumentando la sensibilidad a la insulina en ratones. Un estudio previo que demostraba que la irisina es capaz de promover la proliferación de células HUVEC a través de la vía de señalización ERK y que parcialmente protegía a las células de apoptosis inducida por alta glucosa, sugiere que existe una relación entre esta proteína y el endotelio vascular. La enfermedad isquémica del corazón ocurre con frecuencia debido a la interrupción del flujo sanguíneo debido a una oclusión aguda de la arteria mayor coronaria. Por lo tanto, estrategias para tratar dicha condición se enfocan en mejorar la angiogénesis y la neovascularización para restablecer el flujo sanguíneo al miocardio, rodeando el área infartada. El estudio elaborado por Wu y su equipo en 2015 ¹⁴⁰ concluyó que la irisina promueve el proceso de angiogénesis al incrementar la migración celular y formación de capilares en células HUVEC, pues regula positivamente la expresión de mRNAs y proteínas, así como la actividad gelatinolítica de las MMP-2 y MMP-9, regulada por la vía ERK (activada por la irisina) ¹⁴⁰.

La ruta de señalización NOTCH se da a través del contacto célula-célula y está mediada por interacciones receptor-ligando ancladas a la membrana. Se trata de una vía altamente conservada que participa en procesos como la determinación del destino celular y diferenciación. La vía NOTCH ha sido recientemente implicada en el desarrollo vascular y angiogénesis. La expresión de Delta 4 (Dll4) es particularmente crítica para la angiogénesis porque la haploinsuficiencia resulta en anomalías vasculares y letalidad embrionaria. Su expresión está restringida al endotelio que desarrolla vasos sanguíneos y arterias. El mecanismo mediante el cual los ligandos parecidos a Delta (DLL) ejercen su acción es poco conocido. Una hipótesis sugiere que la endocitosis de DLL permite al ligando

someterse a modificaciones post-transcripcionales o una asociación con un cofactor en el endosoma para hacerlo un ligando más efectivo. Debido a la evidencia de acumulación de DLL en vesículas intracelulares en *Drosophila* y pez zebra, se especula que los DLL puedan incorporarse a los exosomas. Estos son producidos por cuerpos multivesiculares a través de la endocitosis y pueden fusionarse con los lisosomas para degradarse y así liberar dichas vesículas al espacio extracelular. Estas vesículas –ahora llamadas exosomas- exhiben proteínas transmembranales con la misma orientación que la membrana plasmática. Pueden ser detectadas en circulación y tienen un papel importante en la presentación de antígenos y la coagulación. Se ha postulado que los exosomas tienen potencial de señalización; sin embargo, no hay evidencia de que los DLL sean incorporados en los exosomas. El estudio realizado por Sheldon y colaboradores en 2010 ¹⁵⁴ investigó la posibilidad de que Dll4 fuera incorporado en los exosomas, y se demostró que las células HUVEC producen de forma natural exosomas que contienen Dll4. El estudio evidenció que, una vez que se induce la producción de Dll4 en células HUVEC, la proteína es incorporada en los exosomas. Así mismo, el Dll4 puede ser transferido a las células, tanto *in vitro* como *in vivo*. Los exosomas que contienen Dll4 son capaces de afectar la formación de capilares, incrementando así la ramificación y densidad general de los vasos *in vitro* e *in vivo*. Esto indica la inhibición de la vía NOTCH, probablemente debido a la inducción de un fenotipo celular particular (*tip cell*), producido en las puntas de los brotes vasculares. Durante el proceso de angiogénesis, este tipo de célula promueve el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y activa la señalización por NOTCH en las células vecinas, lo que podría explicar el porqué los exosomas que contienen Dll4 tienen también la habilidad de formar vasos sanguíneos largos. Algunos de los mecanismos involucrados en cambiar a las células HUVEC en *tip cells* es que los exosomas que contienen Dll4 se unen al receptor NOTCH en la superficie celular y éste compite con ligandos unidos a membrana, se internaliza en los exosomas y es degradado. Así mismo, atrapa nuevos receptores NOTCH de los compartimentos endosomales, antes de que éstos alcancen la superficie celular. En conclusión,

Dll4 es expresado en *tip cells*, y éstas controlan la diferenciación celular e inhiben la respuesta angiogénica de las EC adyacentes a través de la señalización NOTCH¹⁵⁴.

La enfermedad arterial periférica (PAD) es una condición patológica común causada por la aterosclerosis, trombosis, diabetes y bajo flujo sanguíneo; está caracterizada por la oclusión de arterias e isquemia en las extremidades. La isquemia es causada por la obstrucción parcial o total de las arterias, lo que conduce a que las extremidades induzcan respuestas isquémicas agudas caracterizadas por un incremento en el estrés oxidativo, daño endotelial e inflamación. La PAD se desarrolla cuando las plaquetas acumuladas limitan el suministro de sangre a los tejidos distantes y las arterias se activan por rutas inflamatorias. De acuerdo a la evidencia acumulada, la inflamación participa de forma importante en la iniciación y progresión de la aterosclerosis periférica y el nivel de marcadores de inflamación están asociados con la severidad de la PAD. Dicha condición es, por lo tanto, una de las más comunes y severas manifestaciones de la aterosclerosis sistémica y de las patologías asociadas a inflamación. Adicionalmente, la PAD es considerada como un marcador independiente de enfermedades vasculares avanzadas porque los pacientes que la padecen tienen una alta mortalidad cardiovascular. Por ello ha habido un creciente interés en desarrollar estrategias terapéuticas que mejoren el suministro de sangre a tejidos isquémicos para un tratamiento exitoso de la PAD. El nivel fisiológico de ROS involucra la proliferación y migración de las EC y el reclutamiento de células inflamatorias a tejidos isquémicos. Las ROS juegan un papel esencial en la neovascularización reparativa inducida por isquemia, de forma dependiente de la concentración. Por otro lado, un exceso de ROS generado por las células inflamatorias produce apoptosis y heridas. La sobreproducción de ROS contribuye a varias CVD y la isquemia de extremidades está caracterizada por la disfunción mitocondrial y un incremento en la producción de ROS. En el esfuerzo de controlar los niveles de estrés oxidativo, recientemente se ha desarrollado un polímero antioxidante que responde a H₂O₂ llamado PVAX

un polioxilato que contiene “*alcohol vanillico*” (VA), el componente principal de las hierbas *Gastrodia elata* y vainilla, conocidas por ejercer efectos antioxidantes y antiinflamatorios. El PVAX fue diseñado para incorporar uniones a peroxalato que depuran H_2O_2 en su estructura y liberan VA en presencia de H_2O_2 . En el estudio realizado por Kwon y colaboradores en 2016 ¹⁵⁵ se investigaron los efectos de nanopartículas de PVAX en la migración y angiogénesis de EC. En el modelo de células HUVEC, el VA induce migración de las EC y la regulación positiva de mRNA de VEGF de forma dependiente de concentración, lo que sugiere su potencial terapéutico. Así mismo, las nanopartículas de PVAX demostraron reducir de forma eficiente el estrés oxidativo al depurar el H_2O_2 , acelerar la migración de EC y regular positivamente la expresión de VEGF y PECAM-1. Así mismo, el PVAX exhibe efectos antiinflamatorios al suprimir el reclutamiento de macrófagos al sitio de isquemia ¹⁵⁵.

5.3. Aplicaciones en diabetes

La diabetes asociada a complicaciones cardiovasculares es un serio factor de amenaza para la calidad de vida de los pacientes diabéticos. La hiperlipidemia e hiperglicemia son los principales factores que llevan a padecimientos cardiovasculares. El daño y disfunción del endotelio es crítico en este proceso. La disfunción endotelial es una condición en la que el endotelio pierde sus propiedades fisiológicas. Uno de los síntomas iniciales inducido por la presencia de diabetes es la degeneración de la respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio vascular. El NO es el principal relajante en arterias, mientras que la contribución del factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) predomina en algunos vasos de resistencia. La diabetes es capaz de dañar la propiedad de vasorelajación del endotelio, lo que resulta en la disfunción endotelial, la cual puede ser considerada el primer paso en el desarrollo de CVD. La respuesta inflamatoria y el bloqueo de vasos pueden ser causados por algún tipo de masa liberada del endotelio. Las reacciones oxidativas están presentes en todos los hechos que resultan en la disfunción endotelial. Cuando el endotelio se expone a factores que dañan la vasculatura, se estimulan diversas enzimas que producen ROS. Los altos niveles de glucosa elevan la producción de ROS desde la cadena de transporte de electrones de la mitocondria. Un incremento en las ROS está asociado con complicaciones de la diabetes. El osthol (un compuesto cumarínico) es aislado de frutos secos de *Cnidium monnieri*. Sus propiedades farmacológicas han sido estudiadas por sus efectos antiproliferativos, vasorelajantes, antihepatitis, antiinflamatorios, antiagregatorios y antialérgicos. Se ha encontrado que el osthol mejora la resistencia a insulina al aumentar la liberación de adiponectina en ratones. Zhu y colaboradores en 2011 ¹⁵⁶ examinaron si el osthol presentaba efectos terapéuticos en el endotelio vascular disfuncional inducido por alta glucosa crónica. El estudio demuestra que los niveles disminuidos de NO aumentaron significativamente con el tratamiento con osthol, por lo que se cree que éste puede mejorar la disfunción endotelial debida a altas concentraciones de glucosa. El tratamiento con osthol además redujo los niveles altos de ROS producidos por la diabetes ¹⁵⁶.

Las EC son blanco primario de daño oxidativo inducido por hiperglicemia; los niveles elevados de glucosa intracelular incrementan la generación de superóxidos mitocondriales, llevando a la activación de las vías del poliol y la hexosamina, lo que deriva finalmente en disfunción endotelial. El riesgo de hipertensión está incrementado en paciente con diabetes; así mismo, la disfunción endotelial se correlaciona con una resistencia significativa a la insulina en la descendencia de parientes de primer grado con DM2. La diabetes mellitus gestacional (GDM) está definida como la intolerancia a la glucosa diagnosticada durante el embarazo, y afecta a 3-10% de los nacimientos. Igual que con la DM2, la exposición fetal a GDM está fuertemente asociada con alto riesgo de resistencia a la insulina en la adultez. Ya se había reportado que el cultivo de células HUVEC provenientes de embarazo con GDM exhibían tasas reducidas de proliferación celular debido a una alteración en la señalización de calcio. Los productos de las ROS y peroxidación de lípidos están elevados en la sangre del cordón y en los embriones de embarazos afectados por la diabetes. La vía del factor nuclear 2 sensible a reacciones de óxido reducción (redox) y relacionado a eritroides (Nrf2) asociado a la proteína Keap1 es crítica en la activación transcripcional de genes de defensa antioxidante y en la restauración de la homeostasis vascular redox. De forma normal, el Nrf2 es blanco de la degradación proteosomal al unirse a la proteína Keap1, pero en respuesta a estrés oxidativo, se acumula en el núcleo y se une a elementos de respuesta antioxidante (ARE) o electrofílica (EpRE) en la región promotora de los genes que codifican para las enzimas detoxificantes de la fase II, como la quinona oxidorreductasa de NAD(P)H (NQO1), la glutamato cisteín ligasa (GCLM) y el transportador de cisteína/glutamato (xCT) involucrado en la síntesis de glutatión (GSH). El objeto del estudio realizado por Cheng y su equipo en 2013⁸⁹ fue determinar los efectos de GDM en el estado redox y las defensas antioxidantes de Nrf2 en EC fetales en contacto con un producto de peroxidación lipídica, el 4-hidroxinonenal (HNE). Se trata del primer análisis proteómico de células HUVEC sanas y de embarazos con GDM (HUVEC GDM), demostrando que la GDM altera proteínas involucradas en el estrés oxidante, así como la NQO1

y la síntesis de GSH. También se identificaron marcadores de estrés oxidativo en células HUVEC GDM, incluyendo la generación mitocondrial de especies superóxido, carbonilación de proteínas y daño al DNA. Así pues, la vía de defensa antioxidante de Nrf2 podría proveer de blancos terapéuticos para mejorar el estrés oxidativo asociado a la diabetes, envejecimiento y nefropatía ⁸⁹.

En recientes estudios epidemiológicos en humanos se han identificado que las condiciones del ambiente intrauterino pueden influir en el fenotipo de la descendencia tanto al nacer como en la edad adulta. La GDM se desarrolla en mujeres embarazadas y se caracteriza por la intolerancia a la glucosa resultando en hiperglicemia materna, lo que puede llevar a la disfunción del endotelio tanto en la micro como macrocirculación fetal, hiperglicemia fetal e hiperinsulinemia crónica, produciendo así consecuencias a largo plazo para el niño, quien resultará más sensible a desarrollar DM2 y CVD. Los cambios fenotípicos y moleculares inducidos por la GDM in útero serían los responsables del incremento de riesgo cardiovascular y DM2 en niños, ya que la exposición a D-glucosa induce cambios epigenéticos que afectan de forma negativa la función endotelial. Los microRNAs (miRs) son una clase de RNAs pequeños, no codificantes que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional. Dichos RNAs son componentes de la maquinaria epigenética que han mostrado estar regulados recíprocamente. El miR101 es conocido por afectar la función endotelial y la angiogénesis bajo condiciones normales de glucosa, así como actuar sobre la metil transferasa EZH2 para su inhibición. Dicha enzima es parte del complejo represor de *polycomb 2*, un complejo de múltiples subunidades que inicia y mantiene la trimetilación de la histona H3 en la lisina 27, marca epigenética asociada con la formación de la heterocromatina y el silenciamiento génico. Las EC vasculares humanas resultan altamente responsivas incluso al más débil o transitorio incremento en la concentración de glucosa, cambiando el estado de su cromatina, lo cual resulta en alteración de la expresión génica. Así, en dichas células la histona H3 se ha reportado particularmente responsiva a la exposición de altos niveles de glucosa *in vitro*. Las células HUVEC representan un buen modelo celular permitiendo

análisis no invasivos del efecto del ambiente intrauterino en el endotelio fetal. Por ejemplo, anormalidades moleculares, especialmente en la maquinaria de producción del NO y el sistema de transporte de adenosina, han sido descritos en células HUVEC de embarazos con GDM. Sin embargo, el estudio realizado por Floris y colaboradores en 2015 ⁹⁰ provee una caracterización funcional del efecto de GDM en células HUVEC. Este es el primer estudio en detectar cambios en los niveles de miR-101 y EZH2 inducidos por diabetes. Un estudio reciente indica un papel proangiogénico para EZH2 en células HUVEC, ya que ha identificado 949 genes regulados positivamente al doble de su expresión debido al *knockdown* de EZH2; muchos de estos genes han sido implicados en la disfunción endotelial y CVD, reafirmando así la hipótesis de que la disminución de EZH2 puede favorecer un incremento en el perfil de riesgo cardiovascular de la descendencia de embarazos con complicaciones por GDM ⁹⁰.

La GDM es un síndrome asociado a la hiperglicemia materna y a una señalización defectuosa de la insulina en la placenta. La GDM deriva en la disfunción endotelial vascular fetoplacentaria, una condición asociada al consumo reducido de adenosina extracelular, y subsecuente incremento de la misma. La concentración de adenosina en sangre de la vena umbilical está elevada en embarazos donde la madre tiene diabetes. Debido a que los niveles plasmáticos de adenosina son regulados principalmente por la capacidad del endotelio de consumir y metabolizar este nucleósido, las ectonucleosidasas no se expresan en células HUVEC, y el suero de la sangre umbilical contiene adenosina desaminasa, una enzima que metaboliza la adenosina, lo que es comparable en embarazos normales y con GDM. Por ello, se ha propuesto que los transportadores de nucleósidos son críticos en este tipo celular en GDM. En las células HUVEC, en condiciones fisiológicas, el consumo de adenosina es mediado por los transportadores de nucleósidos 1 (hENT1). Debido a que la GDM está asociada con una reducción de transportadores hENT1 dependientes de NO en células HUVEC, los cambios en la expresión y/o actividad de los hENT1 puede resultar en la alteración de las concentraciones fisiológicas de adenosina en plasma, llevando a la disfunción

endotelial. Los niveles elevados de D-glucosa extracelular reducen la actividad y expresión de los hENT1 en una manera dependiente de NO en células HUVEC, efectos que son revertidos por la insulina; sin embargo, esta hormona reduce la expresión y actividad de los hENT1 en células HUVEC cultivadas en condiciones fisiológicas de D-glucosa. Así mismo, se cree que los receptores de adenosina son críticos en el efecto de la insulina en células HUVEC provenientes de embarazos con GDM. El estudio llevado a cabo por Westermeier y colaboradores en 2011 ¹⁵⁷, mostró que la reducción de los transportadores de adenosina asociados a GDM en células HUVEC puede ser revertida por la insulina en embarazos normales, lo que involucra el restablecimiento de la expresión y actividad de los hENT1. La insulina también revierte la expresión y actividad de la eNOS incrementadas por GDM. No obstante, la expresión y actividad de los hENT1 se redujo por la insulina vía el NO en células HUVEC. El genotipo de las células HUVEC con GDM puede ser revertido a un fenotipo normal por la insulina a través de la modulación de los niveles extracelulares de adenosina y de su receptor (A_{2A}). Adicionalmente, debido a que las células HUVEC provenientes de pacientes con GDM expresan preferentemente la isoforma IR-A de los receptores de insulina (asociada a la resistencia a la insulina), se sugiere un papel importante de dicho receptor en el endotelio fetoplacentario en la GDM ¹⁵⁷.

Los pacientes con DM2 tienen un doble riesgo de sufrir CVD comparados con los individuos no diabéticos. La exposición continua a niveles altos de glucosa es aceptada como el principal factor implicado en la patogénesis de complicaciones vasculares por diabetes. Sin embargo, disminuir los niveles de glucosa no es suficiente para apagar el ambiente pro-oxidante intracelular. Un mecanismo patogénico explica en parte el concepto de “memoria metabólica”, definido como la perpetuación del daño vascular a pesar del logro de mejorar el control glicémico. Los experimentos *in vitro* en EC cultivadas, así como los estudios *in vivo* en animales diabéticos, han revelado una persistencia mediada por las ROS del estrés vascular después de la normalización de los niveles glicémicos, con marcadores a largo plazo de estrés oxidante y sobreactivación de las vías de

señalización ampliamente relacionadas con la patogénesis de la disfunción endotelial y complicaciones diabéticas. El péptido similar a glucagon 1 (GLP-1) mejora la función endotelial en diabetes, por lo que las estrategias terapéuticas para pacientes con DM2 están enfocadas en incrementar la respuesta a la incretina, ya sea inhibiendo la actividad de la dipeptidil peptidasa 4 (DPP-4) o usando análogos de GLP-1 resistentes a la degradación. La DPP-4 es una glicoproteína transmembranal ubicua que se une a los dipéptidos en el dominio N-terminal de una gran cantidad de sustratos, incluyendo las hormonas incretinas GLP-1 y el polipéptido gástrico inhibitorio (GIP). Entre los inhibidores de la DPP-4, es de reciente comercialización el potente inhibidor teneligliptina. El estudio presentado por Pujadas y colaboradores en 2016¹⁵⁸ exploró los efectos de dicho fármaco, comparados con la sitagliptina en la disfunción endotelial y respuesta antioxidante en EC expuestas a altas concentraciones de glucosa. La inhibición de la DPP-4 aumenta los niveles de las incretinas biológicamente intactas, mejorando el metabolismo de la glucosa a través de la regulación positiva de la secreción de insulina y la supresión de la liberación de glucagon. Se ha demostrado que un tratamiento de 24 semanas con teneligliptina mejora la función endotelial por índice de hiperemia reactiva, al reducir los marcadores de estrés oxidante; por otra parte, el efecto de la disminución de glucosa no fue significativamente diferente entre quienes tomaron teneligliptina o sitagliptina, lo que sugiere que los efectos antioxidantes y renoprotectores de la teneligliptina son más fuertes que aquellos de los otros inhibidores de la DPP-4. Este es el primer estudio que describe la acción directa de un inhibidor de la DPP-4 en la producción de ROS en un modelo celular endotelial. La novedad del estudio es demostrar que la tenelipliptina inicia la cascada transcripcional antioxidante a nivel del mRNA en un modelo de EC *in vitro*, promoviendo la expresión de genes blanco de Nrf2, como el gen que codifica para la heme oxigenasa (*HMOX*), el gen codificante para la NAD(P)H quinona deshidrogenasa (*NQO*) o el gen que codifica para la tioredoxin reductasa citoplasmática (*TXNRD*), y normalizando los niveles de *TXNIP*, lo que está regulado por altos niveles de glucosa; además de inducir la cascada transcripcional relacionada a Nrf-2, incluso bajo condiciones de alta glucosa y

memoria metabólica. El modelo endotelial permitió demostrar que la teneligliptina disminuye la expresión de marcadores de estrés del retículo endoplásmico (ER), y que la teneligliptina es capaz de contrarrestar el fenotipo apoptótico inducido por la hiperglicemia, restaurando las capacidades proliferativas de las células HUVEC

158

El metilglioxal (MGO) es un metabolito activo de la glucosa. Se forma por peroxidación de lípidos, en el catabolismo de la treonina y en la oxidación de la acetona. El MGO es un fuerte candidato como marcador clínico en las fluctuaciones glicémicas, además se ha implicado en la patogénesis de aterosclerosis e hipertensión. La apoptosis ha emergido como uno de los mecanismos clave, lo que da lugar a disfunción endotelial como resultado de un incremento en la actividad coagulante de las células endoteliales vasculares. Se ha descrito también que las ROS generadas por el MGO provocan apoptosis celular en HUVECs y otros estudios han sugerido que el efecto del MGO sobre el endotelio está modulado por la vía NF- κ B y por la eNOS. El Aktm, un efector negativo de PI3K, actúa como un regulador positivo de la eNOS endotelial y juega un papel importante en la apoptosis. La evidencia sugiere que la vía PI3K/Akt/eNOS y NF- κ B juegan un papel crucial en la inhibición de daño al endotelio por ROS. Por lo anterior, Chu y colaboradores en 2016¹⁵⁹ realizaron un estudio para evaluar si la fosfocreatinina (PCr) protege contra la apoptosis inducida por MGO en HUVEC. El MGO es un metabolito altamente reactivo de la glucosa conocido por inducir daño celular, citotoxicidad y apoptosis en EC. El mayor hallazgo de este estudio reveló que la PCr posee los efectos protectores en la disfunción endotelial inducida por MGO a través de la neutralización de las vías apoptóticas mitocondriales. Los efectos antiapoptóticos de la PCr son obtenidos al inhibir la sobreproducción intracelular de ROS, la acumulación de calcio intracelular y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la modulación de las vías de señalización PI3K/Akt/eNOS y NF- κ B. La NADPH oxidasa 4 (NOX4) ha sido implicada como la mayor fuente de ROS en la vasculatura. Esta enzima es un cofactor esencial de la eNOS y de varios sistemas antioxidantes y participa en

papeles críticos en la patogénesis del estrés oxidante. El estudio confirmó que la PCr ejerce sus efectos protectores contra daño celular al inhibir la liberación de la enzima lactato deshidrogenasa, la cual es producida cuando hay daño a la membrana plasmática. Así mismo, el tratamiento con PCr redujo la sobreexpresión de NOX4 inducida por MGO en HUVEC. El estudio provee evidencia de que la PCr previene la apoptosis inducida por MGO en HUVEC al reducir o suprimir eventos secuenciales como la sobreproducción de ROS, la regulación a la baja de cascadas de señalización apoptóticas asociadas a la generación de ROS, la acumulación intracelular de calcio y la despolarización del potencial de membrana mitocondrial. Por ello, la PCr pudiera ser la base farmacológica de la aplicación clínica a complicaciones cardiovasculares por diabetes ¹⁵⁹.

La diabetes mellitus es la quinta causa de muerte a nivel mundial. La hiperglicemia crónica daña el sistema vascular, y origina la micro y macroangiopatía. En las últimas décadas, las complicaciones vasculares por diabetes han sido una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en pacientes con DM2, y como resultado, la prevención de dichas complicaciones es de gran importancia. La disfunción endotelial, expuesta a varios factores de daño citotóxico, juega un papel importante en el desarrollo de complicaciones vasculares y acelera su progresión. En estudios recientes se ha demostrado que tal condición está asociada con la presencia de proteínas de glicación no enzimáticas conocidas como productos avanzados de glicación final (AGEs). Estos derivan de la reacción de glicación no enzimática cuando se reducen azúcares, proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Se ha encontrado que éstos disparan y agravan el daño al endotelio en las complicaciones vasculares asociadas a diabetes, al unirse a su receptor (RAGE), un receptor transmembranal de la familia de las inmunoglobulinas. Dicha interacción provoca la generación de estrés oxidante y altera la señalización celular, estimula la transcripción de genes y finalmente aumenta la liberación de moléculas pro-inflamatorias. Por lo tanto, el sistema AGE-RAGE pudiera ser un nuevo blanco terapéutico para prevenir las complicaciones vasculares de la diabetes. La especie *Anoectochilus roxburghii* se ha utilizado como remedio

casero en China para tratar varias enfermedades, como diabetes, cáncer, enfermedades del hígado, entre otras. El mayor ingrediente de esta especie es el kinsenósido-3-(*R*)-3-β-D glicopiranosil oxibutanólido, que exhibe efectos marcados como antihiper glucemiante. Dado que ya se ha confirmado que el kinsenósido mejora la función vascular de EC, Liu Q. y colaboradores evaluaron en 2016¹⁶⁰ los efectos protectores de dicha molécula en la disfunción endotelial inducida por AGEs. Los resultados del estudio arrojaron que la elevación de los AGEs (niveles por encima de los 200 µg/mL) se correlaciona con la inhibición de la viabilidad celular. Además, la producción de NO también se vio reducida. El NO es una molécula importante sintetizada por las EC y la biodisponibilidad de éste es considerada como un marcador primario de disfunción endotelial. A diferencia de otros receptores que son regulados negativamente al incrementar el número de ligandos, la interacción de los ligandos con RAGE lleva al incremento de la expresión del receptor. Así, bajo condiciones de hiperglicemia, la expresión del RAGE aumenta, y al interaccionar con los AGEs en la superficie celular, aumenta el estrés oxidativo de las EC, disparando cascadas de señalización intracelular, y afectando la activación de la transcripción de numerosas citocinas y moléculas de adhesión, muchas de las cuales están estrechamente vinculadas con la inflamación y aterosclerosis. Una de las vías de señalización relacionadas con inflamación, activada por sobreproducción de ROS, es NF-κB, por lo que ésta resulta un blanco clave para la señalización de RAGE. La translocación de NF-κB citosólico al núcleo es el paso clave para el inicio de la transcripción de un número importante de proteínas, incluyendo citocinas y moléculas de adhesión. Tanto estas proteínas como los niveles de expresión génica de NF-κB nuclear están regulados positivamente en células inducidas por AGEs¹⁶⁰.

5.4. Aplicaciones en genética

Las transfecciones celulares proveen poderosas herramientas experimentales para estudiar la regulación génica *in vivo* e *in vitro*. Las técnicas de transfección son usadas para introducir DNA foráneo en los procedimientos de terapia génica. Las transfecciones estables se refieren a la producción de una población de células en las cuales el gen de interés es expresado de manera estable en la misma. Así, el gen no solo es introducido en la célula, sino que también es integrado al DNA del hospedero y reproducido durante los ciclos celulares y división celular. El segundo tipo de transfecciones son las transfecciones transitorias, en las cuales los plásmidos de DNA son introducidos en una población celular, pero no es posible aislar líneas celulares estables; en vez de eso, la expresión génica es estudiada inmediatamente después del procedimiento de transfección, usualmente en las primeras 24-72 h. La ventaja de esta segunda técnica es la simplicidad de la misma y el hecho de que la misma preparación de DNA puede ser introducida en varios tipos celulares. Debido a que las membranas celulares crean barreras para las moléculas de DNA, se han desarrollado diferentes técnicas que facilitan las transfecciones celulares. Si bien hay muchos métodos para la transfección, los lípidos catiónicos se han convertido en el estándar para portar los plásmidos de DNA. Las EC son un blanco prometedor en la terapia génica somática en CVD, enfermedad isquémica y cáncer, dado que el endotelio está involucrado en estas condiciones patológicas, y además son accesibles para la transferencia génica a través de la circulación. En varios experimentos y estudios clínicos se ha demostrado el potencial terapéutico de la terapia génica somática en enfermedades vasculares: en el tratamiento contra la restenosis, se obtuvieron resultados positivos en la transfección de genes que codifican para el VEGF, eNOS, la timidina cinasa, entre otros; en la aterosclerosis, las estrategias de terapia génica han sido utilizadas en el tratamiento de la proliferación vascular, disfunción endotelial, trombosis, e isquemia; también se ha reportado que transferir genes que codifican para la COX y eNOS puede proteger contra la hiperplasia de la íntima en arterias carótidas lesionadas por angioplastia. Si bien la expresión transgénica más eficiente es el uso de adenovirus, éstos

suelen dañar la pared de los vasos, al grado de causar lesiones ateroscleróticas tempranas. Por ello, se ha preferido el uso de transfecciones no virales, como son los liposomas catiónicos. Así, el estudio efectuado por Kaiser y Toborek en 2001¹⁶¹ se enfoca en la optimización de la técnica de transfección con dichos liposomas. Estos contienen lípidos cargados positivamente que se pueden mezclar con DNA cargado negativamente para formar complejos lípido-DNA. Las ventajas más importantes de éstos es que son fáciles de preparar, pueden transferir genes de varios tamaños y no son infecciosos; sin embargo, tienen baja eficiencia de transfección. Se encontró que el liposoma más adecuado para transfectar células HUVEC es el liposoma pFx-7, disponible de forma comercial¹⁶¹.

El proceso de angiogénesis coincide con un incremento en la entrada de células tumorales a la circulación sanguínea, facilitando así la metástasis. Estudios previos han revelado que dirigir la terapia al proceso de angiogénesis es una nueva estrategia para la terapia antitumoral. El VEGF-A es el factor más importante en la angiogénesis tumoral, el cual activa dos receptores de tirosincinasa, VEGFR1 (Flt-1) y VEGFR2 (o KDR). Se encontró que el KDR estaba sobreexpresado en EC activadas de vasos sanguíneos nuevos y fuertemente asociadas con la invasión y metástasis en enfermedades humanas. La efectividad de la estrategia del gen suicida contra las células cancerosas ha sido probada en varios tipos de tumores. Entre las diversas combinaciones de genes suicidas y prodrogas, destaca el gen del virus simple del herpes/timidina cinasa (HSV-TK). Sin embargo, la expresión no selectiva y ubicua del gen suicida pudiera causar efectos adversos inesperados, como la supresión de la médula ósea. Así, un prerrequisito para lograr la efectividad y seguridad de la terapia génica contra el cáncer es la inducción de una fuerte expresión del tumor vascular selectivo de genes suicidas. El éxito de una terapia génica depende en gran medida del desarrollo de un vector que inserte correctamente el gen, que sea seguro, y eficiente. La exposición a ultrasonido en combinación con microburbujas es un nuevo sistema de incorporación génica no-viral que puede mejorar la eficiencia de

la transfección. Debido a que las EC tienen una estabilidad genómica relativa, éstas son capaces de evitar el problema de la resistencia a fármacos. El crecimiento y persistencia de tumores sólidos así como su metástasis es dependiente del proceso de angiogénesis, por lo que la angiogénesis provee un blanco para enfoques terapéuticos de tumores sólidos, y la inhibición de la angiogénesis es muy prometedora. El estudio dirigido por Wang en 2008 ¹⁶² demostró que el promotor de KDR y el gen suicida mostraron un efecto “asesino-selectivo” en las células HUVEC transfectadas, por lo cual ofrecen un enfoque atractivo para la terapia génica para atacar vasos tumorales ¹⁶².

La expresión aberrante o la función de diferentes miRNAs ha sido ligada a múltiples patologías cardiovasculares, incluyendo hipertrofia cardíaca y remodelación, infarto al miocardio, falla cardíaca, arritmia, hipertensión, aterosclerosis, aneurisma e infarto en modelos animales. Estudios recientes han sugerido que los miRNAs circulantes pueden ser usados como nuevos biomarcadores para CVD. Además, se ha demostrado que los miRNAs encapsulados en microvesículas secretados por las células se pueden internalizar en otras células y modular las funciones biológicas de las células receptoras, por lo que se piensa que son biológicamente funcionales y pudieran estar involucrados en la comunicación a distancia entre células, creando la posibilidad de que los miRNAs circulantes representen un nuevo blanco terapéutico para las enfermedades humanas. Estudios previos en pacientes con hemorragia intracraneal identificaron un grupo de 30 miRNAs circulantes que eran selectivamente regulados positivamente tanto en hombres como mujeres, en comparación con pacientes sanos. Se ha demostrado que uno de estos miRNAs es el miR-365, que tiene un papel importante en la regulación de la proliferación celular en células cancerígenas transformadas. Sin embargo, los efectos de miR-365 en las funciones vasculares de las EC aún no se conocen. Por ello, Wu y colaboradores ¹⁶³ investigaron en 2016 el impacto del miR-365 en la proliferación de células HUVEC. En este estudio se identificó a miR-365 como un supresor de la proliferación en EC vasculares, indicando que este miRNA pudiera estar

involucrado en la modulación de la proliferación celular no solo de células transformadas, sino de células normales. Otros estudios evidencian que el tratamiento de EC con lipoproteínas oxidadas de baja densidad (LDL-ox) incrementan la expresión de miR-365, lo que media la respuesta apoptótica al reprimir la expresión de Bcl-2. Esto sugiere que miR-365 pudiera tener una participación importante en regular la fisiología vascular y pudiera estar involucrado en la patogénesis de la enfermedad vascular. Además, se encontró que el tratamiento con microvesículas que contienen miRNAs, disminuye la expresión de SGK-1, aunque el efecto fue mínimo. El miR-365 contenido en las microvesículas puede ejercer acción biológica en las EC vasculares, apoyando que el transporte de microRNAs mediado por vesículas representa una novedad de comunicación remota entre células. Estos resultados han dado nuevas pistas acerca de los mecanismos moleculares de las enfermedades vasculares que cursan con funciones proliferativas endoteliales dañadas. En conclusión, se identificó que miR-365 es un supresor de la proliferación de EC, y sus efectos están relacionados a la inhibición de la expresión de SGK-1 por miR-365, sugiriendo que dicho microRNA tiene un papel importante en la fisiopatología vascular y en la modulación de las funciones de las EC ¹⁶³.

Las acuaporinas (AQP) pertenecen a la familia de canales de agua o solutos y son ampliamente expresadas en diferentes tipos celulares como la epidermis, adipocitos y músculo esquelético. Estas proteínas juegan un papel importante en la regulación de funciones fisiológicas como el proceso neuroexcitatorio, proliferación de la epidermis, concentración de la orina y la secreción transepitelial en las glándulas exócrinas. Las AQP también se ven involucradas en la migración celular y formación de capilares. Si bien existen diferentes AQP (de la 0 a la 2), la AQP1 es específica y fuertemente expresada en la microvasculatura de las células endoteliales; sin embargo, su regulación no ha sido del todo comprendida. El factor de transcripción MEF2 se une a una secuencia consenso en la región del promotor de sus genes blanco; Mef2c es expresado en células endoteliales tanto *in vivo* como *in vitro*, y juega un papel importante en la angiogénesis durante el

desarrollo de la vasculatura. El presente estudio, dirigido por Jiang en 2016 ¹⁴², busca dilucidar el mecanismo regulatorio de la transcripción de AQP1 a través de Mef2c. Se sabe que Mef2c coopera con Sp1 para activar la transcripción de AQP1 al unirse al promotor más próximo en HUVECs. La sobreexpresión de Mef2c, Sp1 o Mef2c/Sp1 incrementa la migración de dichas células y su habilidad para formar capilares, siendo abolidas por el *knockout* de AQP1. La interrupción en la unión tanto de MEF2 o Sp1 al promotor de AQP1 reduce de forma significativa su expresión. Mef2c controla la migración y formación de capilares de HUVECs mientras que AQP1 promueve la angiogénesis al incrementar la motilidad de dichas células. La falta de AQP1 es capaz de alterar la angiogénesis y crecimiento tumoral debido a un incremento de la necrosis; además causa estructuras anormales en la microvasculatura y reduce la densidad vascular en cáncer de mama. El *knockout* de AQP1 reduce tanto la migración como la formación de capilares en células endoteliales en condiciones basales y se ha demostrado que cuando Mef2c está sobreexpresado, es crítico en la vasculogénesis y angiogénesis durante el desarrollo vascular y regula a VEGF, por lo que la deficiencia de este factor causa anomalías graves en el desarrollo vascular, incluyendo malformaciones severas en la vasculatura embrionaria y en el endocardio. Se demostró que Mef2c interactúa de manera funcional con Sp1 para activar la transcripción del gen de AQP1, el cual le confiere actividad angiogénica a Mef2c. Las interacciones de las AQP y elementos del citoesqueleto o transportadores de iones en la punta de los lamelipodios llevan al influjo de agua a través de la membrana celular. El agua y los solutos incrementan entonces la presión hidrostática local para crear espacio para la polimerización de la actina, la cual pudiera contribuir a la migración de células endoteliales dependiente de AQPs. La regulación positiva de AQP1 por hipoxia puede resultar en un incremento en la permeabilidad del agua, dando como resultado la formación de edemas asociados a un microambiente tumoral. Finalmente, los resultados sugieren que diversos factores de transcripción pudieran estar involucrados en la regulación de AQP1 ¹⁴².

5.5. Otras aplicaciones

5.5.1. Inmunología

Las células HUVEC son consideradas el mejor modelo *in vitro* para estudiar la función endotelial de la unidad feto-madre. Dichas células expresan y secretan la hormona liberadora de corticotropina (CRH), citocinas y NO, así como otros péptidos y hormonas que se sabe desarrollan funciones inmunológicas y/o endocrinas y paracrinas relacionadas a los cambios adaptativos propios del embarazo. La urocortina-1 es un péptido de 40 aminoácidos miembro de la familia de las CRH. El RNA de la urocortina-1 está presente en diferentes células del sistema nervioso central, así como en varios tejidos periféricos incluyendo la placenta, la decidua, membranas fetales, endometrio, corazón y tracto gastrointestinal. Se ha sugerido que la urocortina-1 tiene acción vasoactiva en la circulación feto-placentaria, pues estimula la vía del NO de la placenta e incrementa la permeabilidad de las EC. Así mismo, los niveles maternos de urocortina-1 correlacionan con la alteración del flujo uterino durante la gestación, sugiriendo un papel para este péptido en la modulación del tono de la vena umbilical humana bajo condiciones fisiológicas y patológicas. En este contexto, Borges L. y su equipo de trabajo investigaron en 2015 ⁹⁴ la localización de la urocortina-1 en el cordón umbilical y evaluaron si compuestos seleccionados (IL-8, INF- γ , TLR4, lipopolisacáridos, ET-1, PG-F2 α), relacionados con los mecanismos involucrados en el inicio y término de la labor de parto alteran la liberación de urocortina-1 en células HUVEC. La urocortina-1 tiene potentes propiedades antioxidantes endoteliales y funciona como un regulador del estrés oxidativo en lesiones inflamatorias. Se demostró que los efectos antiinflamatorios de la urocortina-1 son tejido-específicos dado que estimula la producción de ciclooxigenasa 2 (COX2) y prostaglandina E₂ en células HUVEC a través de la activación de la vía CRH2R. Así mismo, la exposición de células HUVEC a citocinas proinflamatorias (como IL-8 y INF γ) o lipopolisacáridos (LPS) incrementan la liberación del péptido, por lo que incrementos de dichas citocinas proinflamatorias están relacionados con la iniciación de la labor de parto, lo que

induce al cordón umbilical a liberar urocortina-1. Por otra parte, se encontró que las hormonas esteroideas son moduladores de la expresión de la urocortina-1 en células HUVEC y en diferentes tejidos; que la urocortina-1 también tiene potentes efectos antioxidantes al suprimir la formación de ROS en células HUVEC y que sólo factores vasoactivos selectos pueden inducir la liberación de urocortina-1 (como ET-1, pero no así PG-F2 α), sin embargo, este efecto depende de la intensidad del estímulo. Con base en lo anterior se afirma entonces que la urocortina-1 es un modulador endotelial sensible a cambios inmuno-inflamatorios en la unidad feto-madre ⁹⁴.

5.5.2. Cáncer

El tratamiento de tumores vasculares con vacunas se ha considerado como una importante inmunoterapia por diversas razones, entre las cuales se encuentra el hecho de que las EC usualmente están más conservadas genéticamente que las células tumorales y que la inhibición de una sola EC puede inhibir hasta 100 células tumorales, mejorando así la eficiencia de la terapia antitumoral. Estudios recientes en vacunas anti-angiogénicas pueden dividirse en 2 enfoques: uno es la vacuna dirigida específicamente a blancos angiogénicos como el VEGRF2 y el otro es la vacuna completa de EC con actividad anti-angiogénica. Las células que más comúnmente han sido utilizadas para la inmunoterapia de tumores son las células HUVEC. En el año 2000 se utilizaron para inhibir el crecimiento de fibrosarcomas, hepatomas y cáncer de mama (citado por Mu ¹⁶⁴); en 2006 (citado por Mu ¹⁶⁴) se demostró que la vacunación con células HUVEC viables provee de potentes efectos antitumorales en el carcinoma de pulmón de Lewis y en modelos de mielomas tumorales, además de prolongar la esperanza de vida de modelos tumorales metastásicos. En 2008 (citado por Mu ¹⁶⁴) se describió el uso de inyecciones intradermales de células HUVEC para tumores cerebrales recurrentes o cáncer colorrectal. Tras el tratamiento, se detectaron en tres pacientes respuestas inmunes anti-tumorales específicas por al menos nueve meses. Uno de los principales defectos del uso de las células HUVEC es su corto tiempo de vida útil (alrededor de 10 resiembras), tras el cual presentan una morfología

alargada, incrementa la granularidad y la vacuolización, pierden la capacidad de formar capilares y se presenta actividad β -galactosidasa asociada a la senescencia. Todo esto acompañado de cambios funcionales que pudieran dar lugar al fracaso de la terapia. Esto hace posible traer nuevos enfoques para aumentar el tiempo de vida útil de las células. Entre los principales intentos está la expresión ectópica de oncogenes virales, transformación espontánea, adición de factores de crecimiento exógenos, expresión del gen de la transcriptasa inversa de la telomerasa humana y la fusión de células tumorales. En 1983, Edgell y colaboradores (citado por Mu ¹⁶⁴) establecieron células híbridas fusionando células HUVEC con una línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano (A549), pero no fue hasta el año 2016, con el trabajo de Mu y colaboradores ¹⁶⁴, que su actividad anti-tumoral fue demostrada en el suero de ratones inmunizados con estas células híbridas. Se confirmó que la fusión de células HUVEC-A549 co-expresa marcadores endoteliales y tumorales y mantienen la formación de capilares hasta por 30 resiembras. Se sugiere que su actividad anti-tumoral se debe a la actividad anti-angiogénica, la cual depende de varios aspectos: la inmunidad humoral estuvo involucrada, ya que la IgG neutralizante de las células HUVEC, estuvo significativamente elevada en el suero de los ratones inmunizados con HUVEC-A549; además, la inmunidad celular jugó un papel importante basado en la evidencia de que los linfocitos T fueron activados y finalmente, los mediadores inmunosupresores de VEGF y TGF- β que pudieran promover angiogénesis, disminuyeron significativamente sus niveles en el suero de estos ratones ¹⁶⁴.

5.5.3. Estudios durante el embarazo

Existe evidencia que asocia a mujeres que fuman durante el embarazo con un bajo riesgo de desórdenes hipertensivos durante el mismo embarazo. Sin embargo, se ha reportado que entre más haya fumado una mujer antes del embarazo, menor riesgo tendrá de desarrollar hipertensión gestacional y preeclamsia. Dicho efecto protector persiste incluso si la mujer deja de fumar durante el embarazo. La nicotina, y su mayor metabolito, la cotinina, pudieran

actuar disminuyendo el riesgo de hipertensión gestacional y preeclamsia. En años anteriores, el papel central de los desórdenes hipertensivos durante el embarazo había sido atribuido a un desequilibrio en algunos factores vasoactivos solubles. Así, por ejemplo, se observó en mujeres con preeclamsia un exceso del receptor 1 del factor VEGF (sFlt-1) en circulación, capaz de unirse a VEGF y del factor de crecimiento placentario (PIGF), previniendo la acción de estos factores angiogénicos en los tejidos vasculares. También se ha descrito que mujeres con preeclamsia presentan altos niveles séricos de la forma soluble de la endogлина (sENG). En el estudio realizado por Romani y colaboradores en 2011¹⁶⁵ se utilizó como modelo *in vitro* a las células HUVEC para investigar los posibles efectos de la nicotina y cotinina en la producción de factores anti-angiogénicos. De acuerdo con los resultados, tanto la nicotina como la cotinina reducen, en parte, el riesgo de preeclamsia al reducir la liberación de sENG y sFlt-1. Es posible que este efecto se deba no solo a estas dos sustancias, sino a otras como monóxido de carbono. Se cree que uno de los mecanismos mediante el cual la nicotina y cotinina ejercen su efecto es que ambas inducen la liberación de sFlt-1, sENG y PIFG desde la placenta, factores vasoactivos importantes involucrados en la patogénesis de la preeclamsia¹⁶⁵.

La evidencia en la población humana y en modelos animales indica que la exposición a factores ambientales durante el desarrollo temprano son determinantes críticos de la susceptibilidad a enfermedades a lo largo de la vida. Si bien existe una amplia variedad de perturbaciones prenatales (tales como desnutrición materna o diabetes) la obesidad materna es de particular interés ya que representa un potente factor de riesgo para desarrollar obesidad infantil, pues hay estudios que así lo confirman. Los estudios previos indican que la resistencia materna a la insulina, la epigenética o adaptaciones metabólicas a un ambiente intrauterino obeso pueden contribuir a desarrollar obesidad. Poco se ha estudiado del fenotipo metabólico que compete a dicho problema debido a la dificultad de obtener células y tejidos de infantes. Sin embargo, el cordón umbilical resulta una fuente accesible de células de recién nacidos para llevar a cabo dichos estudios,

algunos de los cuales identificaron diferencias en la expresión génica relacionada al desarrollo vascular. La diabetes gestacional está asociada a la reducción de la vasodilatación e incremento de la adhesión leucocitaria en células HUVEC, mediada por mRNAs específicos. Así mismo, el incremento de la metilación en el promotor de la eNOS se ha reportado en éstas células en infantes con restricción de crecimiento intrauterino. Costa y colaboradores demostraron en 2016¹⁶⁶ que la obesidad materna es capaz de alterar el metabolismo de las células HUVEC, pues está asociada a cambios transcripcional en las mismas. Dado que las células HUVEC se originan en la etapa fetal, éstas representan un modelo apropiado para evaluar si la exposición prenatal, como lo es la obesidad materna, resulta en la transcripción autónoma de patrones en la descendencia. Este es el primer estudio en realizar análisis de respuestas transcripcionales a la obesidad materna en células HUVEC. Para esto, se utilizaron y compararon mujeres con embarazo temprano vs mujeres con sobrepeso y obesidad, se recolectaron los cordones umbilicales y se realizaron análisis de laboratorio. De acuerdo con los resultados, la obesidad materna está asociada a perturbaciones de la expresión génica en las células HUVEC de la descendencia, especialmente en genes relacionados con la función mitocondrial y metabolismo de lípidos. Se identificaron diversos genes relacionados con obesidad, diabetes y otros desórdenes metabólicos, tales como el gen que codifica para el receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), el gen que codifica para el factor de transcripción 2 de unión a elementos regulatorios de esterol (SREBP2) y el gen codificante para el receptor de tirosin cinasa 2 conocido como erb-b2 (ERBB2). Así mismo, se presentó expresión alterada de genes y vías de señalización relacionadas con el metabolismo mitocondrial, y cuyos defectos se relacionan directamente con obesidad. Así, los resultados obtenidos sugieren que la expresión génica mitocondrial alterada pudiera ser un marcador temprano de riesgo de enfermedad metabólica infantil resultado de la obesidad materna. De entre los genes que se encontraron alterados en la obesidad materna están algunos críticos para la señalización de insulina, tales como PIK3R1, MAP4K5 y MAP3K13. Finalmente, un análisis al lipidoma del cordón umbilical de niños cuya madre era obesa, mostró que el

número de ácidos grasos libres (palmitato, estearato y lípidos que contienen ácidos grasos de omega-6) estaba incrementado de forma significativa, concluyendo que el metabolismo de lípidos alterado es una marca temprana de la transmisión madre-hijo de la obesidad y riesgo de enfermedad metabólica ¹⁶⁶.

5.5.4. Formación de hueso

La formación y reparación del hueso son procesos que involucran factores mecánicos, biomecánicos, moleculares y celulares. Una microvasculatura funcional es por lo tanto fundamental en el proceso de regeneración ósea, ya que provee el oxígeno, nutrientes y células necesarias, y funciona como conducto para remover desechos. Hay evidencia sustancial de que la interacción entre las células vasculares y las células responsables de la formación de hueso es crítica en el desarrollo concomitante de una vasculatura funcional y el mantenimiento de la homeostasis esquelética. Se ha establecido que el mejoramiento de la diferenciación osteogénica de los osteoblastos es debido al contacto directo con EC, resultando en una elevación de la expresión de marcadores como fosfatasa alcalina (ALP) y colágeno tipo I. Se ha encontrado un incremento en la actividad de la ALP en co-cultivos de células HUVEC y células estromales de médula ósea (HBMSC). En otras investigaciones se demostró que la señalización de la proteína 2 que media la morfogénesis del hueso (BMP-2) mejora la diferenciación osteogénica de las HBMSC en co-cultivos *in vitro*, con un incremento significativo de actividad ALP. Así mismo, se observó una regulación positiva de la expresión del gen *BMP-2* y su proteína por EC en respuesta a hipoxia y/o VEGF y que los co-cultivos de células HUVEC y osteoblastos MG-63 resultaban en la proliferación de osteoblastos y niveles elevados de colágeno tipo I y ALP, así como la reducción de osteocalcina, la cual es un marcador tardío de osteogénesis. Por otro lado, el VEGF ha demostrado ser el componente central en el desarrollo óseo y esencial para los procesos involucrados en la reparación de fracturas y formación de hueso, como lo demostró la isoforma VEGF165 y sus receptores, que resultan esenciales para la proliferación endotelial, migración, permeabilidad vascular y sobrevivencia celular. La condrogénesis y osteogénesis durante la formación

endocondrial de hueso están dinámicamente ligadas a la invasión de la vasculatura, por lo que el VEGF y sus receptores han mostrado interactuar con las EC durante el desarrollo óseo. El estudio dirigido por Inglis en 2016¹⁶⁷ examinó los procesos interactivos de tres principales tipos celulares: células femorales de la diáfisis (osteocitos), epífisis (condrocitos) y EC, para entender los procesos de angiogénesis y osteogénesis que ocurren durante el desarrollo esquelético. Se demostró que los niveles de ALP estaban elevados cuando células madre derivadas del fémur (FFDSC) fetal fueron co-cultivadas en contacto directo con las células HUVEC. Sin embargo, la adición de VEGF a los co-cultivos resultó en diferentes respuestas: en las células de la diáfisis disminuyeron los niveles de ALP, mientras que en la epífisis la respuesta fue variable. En el ambiente esquelético, las células vasculares juegan un papel fundamental en la modulación de la progresión osteogénica del desarrollo del hueso y en la cascada temporal de reparación de defectos en el mismo. El estudio concluyó que el contacto con co-cultivos de células madre derivadas de fémur fetal y células HUVEC mejora los mecanismos de osteogénesis y angiogénesis del hueso, ya que hubo un aumento significativo de marcadores tempranos de osteogénesis (ALP y colágeno tipo I) y una modulación significativa de la actividad del receptor de VEGF, que no resultó en la modulación de la expresión del gen *VEGF*¹⁶⁷.

5.5.5. Medicina regenerativa

El descubrimiento de las células madre embrionarias (iPSCs) ha proporcionado una oportunidad de utilizar a estas células en terapias en pacientes con desórdenes degenerativos, sin los obstáculos inmunológicos. La estrategia emergente de convertir células somáticas a un estado de iPSCs provee de tecnología crítica para la medicina regenerativa; no obstante, es necesario mejorar la eficiencia de reprogramación y la seguridad de la metodología. La diferenciación hematopoyética de iPSCs ha sido extensamente estudiada para proveer un número apropiado de células madre hematopoyéticas como terapia de reemplazo en varias patologías; sin embargo, esta capacidad hematopoyética varía entre las mismas iPSCs. Se ha sugerido que el tipo de célula somática que da origen a las

iPSCs puede afectar la diferenciación *in vitro*. La metilación residual de DNA heredada de las células somáticas y utilizada para generar iPSCs (como memoria epigenética), pudiera ser la responsable de estas diferencias. Las EC están estrechamente relacionadas con las células hematopoyéticas, pues derivan del mismo precursor durante el desarrollo. Por lo tanto, iPSCs derivadas de dichas células pudieran mejorar la capacidad de diferenciación de células hematopoyéticas, debido a su memoria epigenética. Así pues, Phetfong y colaboradores en 2016¹⁶⁸ compararon la eficiencia de generación de las iPSCs de células HUVEC, células endoteliales progenitoras (EPCs) y fibroblastos dérmicos humanos (HDFs). En vista de las capacidades de diferenciación en linajes específicos, las iPSCs derivadas de células HUVEC y EPCs diferenciaron a un linaje endotelial mejor que los HDFs. En este sentido, se cree que la memoria epigenética influye en el potencial de diferenciación de iPSCs. Específicamente, se cree que la hipometilación del gen de la angiopoyetina I (*ANGPT1*), cuya proteína es un factor importante que juega un papel crucial en la remodelación vascular y angiogénesis, es lo que promueve la diferenciación de células endoteliales en iPSCs hacia el linaje endotelial. De los tres tipos celulares, las células HUVEC fueron las que mejor se diferenciaron. Se concluyó que las EC son las fuentes más apropiadas para la generación de iPSCs, y que las iPSCs derivadas de éstas son una mejor fuente para generar células endoteliales y hematopoyéticas¹⁶⁸.

Las células madre mesenquimales (MSC) son comúnmente utilizadas en terapia de células madre; sin embargo, los mecanismos mediante los cuales ejercen su efecto, no son del todo comprendidos. Inicialmente, el efecto de estas células se basaba en su habilidad de diferenciación multipotente y efectos paracrinos; no obstante, la retención de MSC es pobre y la tasa de supervivencia en tejidos dañados reduce sus efectos terapéuticos. Ello sugiere que los efectos paracrinos de las MSC son importantes en el reemplazo de células dañadas, por lo que es esencial identificar estrategias que mejoren la efectividad de las terapias basadas en MSC. Se ha sugerido que los factores paracrinos de las MSC median la

regeneración a través de la activación y reclutamiento de células madre circulantes y células progenitoras al sitio de daño, donde colaboran para sanar el tejido. Ya otros estudios han demostrado que existen varios factores con propiedades angiogénicas y quimiotácticas que actúan a favor: el factor 1 derivado de células estromales (SDF-1) es crítico para la migración celular, el receptor de quimiocinas 4 (CXCR4) promueve el reclutamiento de células progenitoras, el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) es capaz de inducir la proliferación de células epiteliales y MSC y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) recluta MSC e induce la proliferación de fibroblastos. Para evaluar el efecto de estos factores, Shen y colaboradores en 2015 ⁹⁶ utilizaron células HUVEC como modelo de endotelio y el medio condicionado por las MSC. Los resultados indicaron que la liberación local de los factores mencionados es capaz de inducir la proliferación de células en el tejido dañado, por lo que el uso de MSC es adecuado para la medicina regenerativa ⁹⁶.

5.5.6. Endocrinología

El receptor de andrógenos (AR) es un factor de transcripción inducible por ligando, y miembro de la superfamilia del receptor esteroide-tiroide-retinoide, que media los efectos biológicos de los andrógenos en un amplio rango de procesos fisiológicos y patológicos. La creciente literatura demuestra que la expresión del AR en EC de varios tejidos sugiere un rol potencial de los andrógenos, actuando a través de procesos mediados por dicho receptor, la modulación de la homeostasis de las EC. La señalización de andrógenos juega un papel crucial en varias enfermedades de alta incidencia y prevalencia, como las CVD, hiperplasia benigna de próstata y cáncer de próstata. Para estos casos, se ha formulado la hipótesis de que los andrógenos ejercen su papel, al menos parcialmente, modulando la función homeostática de las EC, presuntamente actuando a través del AR. En el caso de las CVDs, la interacción entre los andrógenos y las EC de la pared de los vasos capilares ha sido hipotetizada con base en las siguientes observaciones: 1) la suplementación de testosterona inhibe la formación de ateromas en modelos animales, 2) la ausencia de andrógenos está asociada a la disminución de la

adherencia arterial central en seres humanos, 3) la testosterona es un factor de protección contra la aterosclerosis a través de la inmunomodulación del desarrollo y estabilidad de plaquetas, 4) la administración oral a largo plazo de testosterona induce la vasorelajación tanto dependiente como independiente de endotelio y 5) contrariamente, los hombres tienen una mayor incidencia de CVD que las mujeres durante los años reproductivos. Todo lo anterior sugiere que los andrógenos están asociados con un riesgo incrementado de CVD tanto en hombres como mujeres. En el trabajo realizado por Torres-Estay y colaboradores en 2016 ¹⁶⁹ se utilizaron células HUVEC como modelo para la caracterización mecanística del papel biológico de los andrógenos, actuando como señalización endógena del AR en EC humanas. Así mismo, resulta útil porque estas células han demostrado reproducir la mayoría de los efectos biológicos de los andrógenos observados en células endoteliales de la próstata. De acuerdo a los resultados, se comprobó que sólo la proliferación de EC está modulada de forma directa por la activación de las EC. La privación de andrógenos no demostró efecto sobre la supervivencia de células HUVEC *in vitro*. Las conclusiones del estudio fueron que 1) la expresión del AR en EC define la presencia de diferentes subpoblaciones funcionales de EC que pueden ser afectadas de forma distinta por los andrógenos y 2) que la dihidrotestosterona (DHT) puede tener diferentes papeles en la modulación de las EC utilizando mecanismos dependientes e independientes de AR ¹⁶⁹.

5.5.7. Inflamación

Los procesos inflamatorios son reconocidos como parte de la etiología de una gran variedad de enfermedades crónico-degenerativas, incluyendo la diabetes y el cáncer. Este tipo de procesos involucran no sólo a leucocitos propios de los tejidos y monocitos, sino también a otro tipo de células como fibroblastos, células epiteliales, musculares y endoteliales. Por lo tanto, para entender la interacción de las células del sistema inmunológico con su microambiente, se ha vuelto necesario entender los procesos inflamatorios a nivel celular y molecular. En este sentido, la adhesión de leucocitos en el endotelio vascular es esencial para la migración de diferentes tipos celulares al sitio de daño o infección. Si bien ya se han identificado

diferentes moléculas involucradas con dicho proceso, pocos estudios toman en cuenta las condiciones de flujo, las cuales son esenciales en este tipo de fenómenos. El flujo vascular, las fuerzas de fricción y la presión son importantes en procesos endoteliales, tales como la vasodilatación, el paso de nutrientes y la coagulación, incluso en la formación de nanopartículas y en los focos de inflamación en algunas enfermedades, como la aterosclerosis y el lupus. En los últimos años se ha demostrado que estos factores físicos son capaces de modular la expresión génica endotelial. Las fuerzas de fricción han mostrado alterar la expresión de genes como *p53*, el cual está implicado en el arresto del ciclo celular de los neutrófilos, o proteínas como Hur, involucrada en la regulación de moléculas como el TLR4 e ICAM. Así, cambios en la velocidad del flujo pueden favorecer o afectar la adhesión leucocitaria o modificar la morfología endotelial y suscitar su activación. López-Macay y colaboradores en 2015 ¹⁰² realizaron un estudio cuyo propósito fue diseñar un modelo de vena humana *ex vivo* que permitiera la activación del endotelio humano bajo condiciones de flujo, para evaluar componentes moleculares de adhesión y los parámetros fisicoquímicos de fricción, para lo cual se utilizaron células HUVEC activadas con TNF- α . Los resultados mostraron que la viabilidad de las células en este modelo es de 1 h a 5 días, manteniendo su función endotelial, lo que significa que el modelo permite realizar ensayos que requieren de tiempos prolongados. Así mismo, dicho modelo permitió el análisis de tejido humano en condiciones similares a las fisiológicas, lo que favorece la investigación sobre condiciones agudas. Así mismo, la vena umbilical humana mantiene su morfología diferenciada y responde a los mismos factores que arterias y venas, como estímulos biomecánicos e inflamatorios, lo que significa que también expresa moléculas de superficie características del endotelio y responde a estímulos mecánicos como presión, tipo de flujo y fuerzas de fricción ¹⁰².

5.5.8. Exosomas

Muchos estudios han permitido la identificación de tejidos hematopoyéticos (sangre, médula espinal y sangre de cordón umbilical) de EPCs raras, llamadas células endoteliales formadoras de colonias (ECFCs) o células endoteliales de crecimiento tardío. Estas EPCs presentes en las paredes de los vasos (en la íntima del endotelio vascular), pueden diferenciarse de células progenitoras hematopoyéticas porque son capaces de generar monocitos e incapaces de generar progenie del endotelio, pero ejercen un efecto pro-angiogénico mediado por mecanismos parácrinos que involucran la secreción de factores y citocinas que estimulan la angiogénesis, por lo que también se conocen como células angiogénicas circulantes (CACs). Diversos estudios han sugerido que las EPC derivadas de la sangre de cordón (CB) tienen mayor potencial *in vivo* para formar vasos capilares largos que las EPCs de la sangre periférica de adultos. Por otra parte, se sabe que la vía de señalización NOTCH juega un papel crítico al promover la supervivencia y la vasculogénesis de las ECFCs derivadas de la CB, sin embargo, hay evidencia que sugiere que la generación óptima de EPCs CD34⁺ requieren de la presencia de células CD34⁻ que secreten citocinas angiogénicas. Por ello en este estudio realizado por Castelli y colaboradores en 2016¹⁷⁰ se explora la capacidad de las ECFCs de generar ECs a partir de células de la CB CD34⁺ en un medio condicionado (CM) por células HUVECs. Los resultados obtenidos mostraron que el uso del CM incrementó la proliferación de células endoteliales (ECs), a diferencia del control, expandiendo el número de células de 10⁸ (3 a 4 resiembras) a 10¹⁷ (en 12 resiembras); además se observó el desarrollo de hasta un 60% de ECs. El co-cultivo realizado con células HUVECs y células CD34⁺ mostró un incremento del 80% de ECs positivas. También se encontró que las ECs suplementadas con el CM pueden formar capilares y que éstas incorporan los exosomas de las HUVECs. El efecto pro-angiogénico del CM puede relacionarse con la presencia de factores solubles presentes en el medio o con la presencia de pequeñas vesículas extracelulares, incluyendo exosomas, los cuales son capaces de promover la diferenciación de las EPCs; el hecho de que mejore la capacidad de las CD34⁺ de generar ECs, pero no de la progenie endotelial,

puede deberse a que el CM promueve la generación de células CD34⁺ por dos vías: una que involucra la liberación de factores solubles que promueven la diferenciación y proliferación de EPCS y la otra que se relaciona con la liberación de exosomas pro-angiogénicos. Los exosomas endoteliales juegan un papel importante en el desarrollo vascular ya que son capaces de incorporar y transferir a las células endoteliales vecinas el ligando 4 (DLL4), induciendo así la vía NOTCH e incrementando la formación de estructuras capilares; además los exosomas contienen otros agentes (miR-214, angiopoyetina-2 y metaloproteasas) implicados en su actividad pro-angiogénica ¹⁷⁰.

6. CONCLUSIONES

El aislamiento y caracterización de las células HUVEC revolucionó la biología vascular permitiendo grandes avances en diversos campos de la ciencia. Las células HUVEC como modelo de endotelio han facilitado el estudio de las CVD, principal causa de muerte a nivel mundial.

Si bien su empleo no sustituye los modelos animales, otorga grandes ventajas y beneficios a la investigación y desarrollo de nuevas terapias. Investigaciones sobre cáncer, medicina regenerativa o incluso investigación genética han empleado células HUVEC para comprobar hipótesis en esas áreas, demostrando así la diversidad de posibilidades que otorga el uso de este modelo.

7. LITERATURA CITADA

1. Doke SK, Dhawale SC. Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm J SPJ Off Publ Saudi Pharm Soc.* 2015;23(3):223-229. doi:10.1016/j.jsps.2013.11.002.
2. Montagutelli X. Animal models are essential to biological research: issues and perspectives. *Futur Sci OA.* 2015;1(4):4-6.
3. MacGowan A, Rogers C, Bowker K. In vitro models, in vivo models, and pharmacokinetics: what can we learn from in vitro models? *Clin Infect Dis.* 2001;33 Suppl 3(Suppl 3):S214-S220. doi:10.1086/321850.
4. Johnson CI, Argyle DJ, Clements DN. In vitro models for the study of osteoarthritis. *Vet J.* 2016;209:40-49. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.07.011.
5. Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, et al. Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association. *Circ Res.* 2012;111(1):131-150. doi:10.1161/RES.0b013e3182582523.
6. Sonneveld E, Riteco JAC, Jansen HJ, et al. Comparison of in vitro and in vivo screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicol Sci.* 2006;89(1):173-187. doi:10.1093/toxsci/kfj009.
7. Ferreira FA, Souza RR, Bonelli RR, Américo MA, Fracalanza SEL, Figueiredo AMS. Comparison of in vitro and in vivo systems to study ica-independent Staphylococcus aureus biofilms. *J Microbiol Methods.* 2012;88(3):393-398. doi:10.1016/j.mimet.2012.01.007.
8. Rocha E Silva LF, Montoia A, Amorim RCN, et al. Comparative in vitro and in vivo antimalarial activity of the indole alkaloids ellipticine, olivacine, cryptolepine and a synthetic cryptolepine analog. *Phytomedicine.* 2012;20(1):71-76. doi:10.1016/j.phymed.2012.09.008.
9. Rosa R, Monteleone F, Zambrano N, Bianco R. In vitro and in vivo models for analysis of resistance to anticancer molecular therapies. *Curr Med Chem.* 2014;21(14):1595-1606. doi:10.2174/09298673113209990226.
10. Veres G, Hegedűs P, Barnucz E, et al. Endothelial dysfunction of bypass graft: direct comparison of in vitro and in vivo models of ischemia-reperfusion injury. *PLoS One.* 2015;10(4):e0124025. doi:10.1371/journal.pone.0124025.
11. Society NEA-V. Alternatives to animals in science. Boston, MA. <http://www.neavs.org/alternatives/in-research>. Published 2017. Accessed January 15, 2017.
12. BBEMG. In vitro models. <http://www.bbemg.be/en/main-research/research-methods/info-invivo-studies.html>. Published 2016. Accessed January 17, 2017.

13. Marx U, Embleton MJ, Fischer R, et al. Monoclonal Antibody Production. In: *National Academy of Science*. Vol 204188. Washington (DC); 1999:1-46. doi:10.1016/S1010-6030(03)00074-1.
14. Benam KH, Dauth S, Hassell B, et al. Engineered In Vitro Disease Models. *Annu Rev Pathol*. 2015;10:195-262. doi:10.1146/annurev-pathol-012414-040418.
15. Vertrees RA, Jordan JM, Solley T, Goodwin TJ. Tissue Culture Models. 2009;(January). doi:10.1007/978-0-387-89626-7.
16. Schultheiss D, Bloom D a, Wefer J, Jonas U. Tissue engineering from Adam to the zygote: historical reflections. *World J Urol*. 2000;18(1):84-90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10766050>.
17. Vacanti CA. The history of tissue engineering. *J Cell Mol Med*. 2006;10(3):569-576. doi:10.1111/j.1582-4934.2006.tb00421.x.
18. Zhang D, Luo G, Ding X, Lu C. Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development. *Acta Pharm Sin B*. 2012;2(6):549-561. doi:10.1016/j.apsb.2012.10.004.
19. Davila JC, Rodriguez RJ, Melchert RB, Daniel Acosta J. Predictive Value of in Vitro Model Systems in Toxicology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1998;38(1):63-96. doi:10.1146/annurev.pharmtox.38.1.63.
20. Reichert WM. Indwelling Neural Implants Strategies for Contending with the in Vivo Environment. In: *Indwelling Neural Implants Strategies for Contending with the in Vivo Environment*. CRC Press/. Boca Raton, FL; 2008. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3934/>.
21. Onat D, Brillon D, AM S, PC C. Human Vascular Endothelial Cells: A Model System for Studying Vascular Inflammation in Diabetes and Atherosclerosis. *Curr Diab Rep*. 2012;11(3):193-202. doi:10.1007/s11892-011-0182-2.Human.
22. Rhim JS, Tsai WP, Chen ZQ, et al. A human vascular endothelial cell model to study angiogenesis and tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 1998;19(4):673-681.
23. Schleger C, Platz SJ, Deschl U. Development of an in vitro model for vascular injury with human endothelial cells. *ALTEX*. 2004;21 Suppl 3:12-19.
24. NIH. What is coronary heart disease? National Heart, Lung, and Blood Institute. <http://www.nhlbi.nih.gov/health/health-topics/topics/cad/#>. Published 2012. Accessed January 28, 2017.
25. Fearon IM, Ga??a MD, Nordskog BK. In vitro models for assessing the potential cardiovascular disease risk associated with cigarette smoking. *Toxicol Vitro*. 2012;27(1):513-522. doi:10.1016/j.tiv.2012.08.018.
26. Vion AC, Ramkhelawon B, Loyer X, et al. Shear stress regulates endothelial microparticle release. *Circ Res*. 2013;112(10):1323-1333. doi:10.1161/CIRCRESAHA.112.300818.

27. Can A, Karahuseyinoglu S. Concise review: human umbilical cord stroma with regard to the source of fetus-derived stem cells. *Stem Cells*. 2007;25(11):2886-2895. doi:10.1634/stemcells.2007-0417.
28. Kim D-W, Staples M, Shinozuka K, Pantcheva P, Kang S-D, Borlongan C. Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells: Phenotypic Characterization and Optimizing Their Therapeutic Potential for Clinical Applications. *Int J Mol Sci*. 2013;14(6):11692-11712. doi:10.3390/ijms140611692.
29. Kilman HJ. Umbilical Cord. Yale University School of Medicine. http://kilmanlabs.yale.edu/placenta/research/Umbilical_Cord_EOR_163162_284_18220.pdf. Published 2006. Accessed February 16, 2017.
30. Weiss ML, Medicetty S, Bledsoe AR, et al. Human umbilical cord matrix stem cells: preliminary characterization and effect of transplantation in a rodent model of Parkinson's disease. *Stem Cells*. 2006;24(3):781-792. doi:10.1634/stemcells.2005-0330.
31. NHS. What is the umbilical cord? <http://www.nhs.uk/chq/pages/2299.aspx?categoryid=54>. Published 2015. Accessed February 16, 2017.
32. Wang Y ZS. Placental Blood Circulation. In: Sciences M& CL, ed. *Vascular Biology of the Placenta*. San Rafael, CA; 2010. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK53254/>.
33. Mizoguchi M, Suga Y, Sanmano B, Ikeda S, Ogawa H. Organotypic culture and surface plantation using umbilical cord epithelial cells: Morphogenesis and expression of differentiation markers mimicking cutaneous epidermis. *J Dermatol Sci*. 2004;35(3):199-206. doi:10.1016/j.jdermsci.2004.06.003.
34. Miki T, Lehmann T, Cai H, Stolz DB, Strom SC. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells. *Stem Cells*. 2005;23(10):1549-1559. doi:10.1634/stemcells.2004-0357.
35. Kobayashi K, Kubota T, Aso T. Study on myofibroblast differentiation in the stromal cells of Wharton's jelly Expression and localization of a -smooth muscle actin. *Early Hum Dev*. 1998;51:223-233.
36. Wang H-S, Hung S-C, Peng S-T, et al. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 2004;22(7):1330-1337. doi:10.1634/stemcells.2004-0013.
37. Garzón I, Alfonso-Rodríguez CA, Martínez-Gómez C, et al. Expression of epithelial markers by human umbilical cord stem cells. A topographical analysis. *Placenta*. 2014;35(12):994-1000. doi:10.1016/j.placenta.2014.09.007.
38. Taghizadeh RR, Cetrulo KJ, Cetrulo CL. Wharton's Jelly stem cells: Future clinical applications. *Placenta*. 2011;32(SUPPL. 4):S311-S315. doi:10.1016/j.placenta.2011.06.010.
39. De Bruyn C, Najjar M, Raicevic G, et al. A rapid, simple, and reproducible method for the isolation of mesenchymal stromal cells from Wharton's jelly without

- enzymatic treatment. *Stem Cells Dev.* 2011;20(3):547-557. doi:10.1089/scd.2010.0260.
40. Lewis WH. Endothelium in tissue cultures. *Am J Anat.* 1922;30(1):39-59. doi:10.1002/aja.1000300104.
 41. Majno G, Shea SM, Leventhal M. Endothelial contraction induced by histamine-type mediators: an electron microscopic study. *J Cell Biol.* 1969;42(3):647-672. doi:10.1083/jcb.42.3.647.
 42. Weibel ER, Palade GE. New Cytoplasmic Components in Arterial Endothelia. *J Cell Biol.* 1964;23:101-112. doi:10.1083/jcb.23.1.101.
 43. Stemerman MB, Spaet TH. The subendothelium and thrombogenesis. *Bull N Y Acad Med.* 1972;48(2):289-301.
 44. Tannock IF, Hayashi S. The Proliferation of Capillary Endothelial Cells The Proliferation of Capillary Endothelial Cells '. *Cancer Res.* 1972;32(January):77-82.
 45. Parry EW, Abramovich DR. The ultrastructure of human umbilical vessel endothelium from early pregnancy to full term. *J Anat.* 1972;111(Pt 1):29-42. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1271112&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 46. Thorgeirsson G, Lazzarini Robertson A. The vascular endothelium- Pathobiologic significance. Review article. *Am Assoc Pathol.* 1978;93(3):804-845.
 47. Nachman RL, Jaffe EA. Endothelial cell culture: Beginnings of modern vascular biology. *J Clin Invest.* 2004;114(8):1037-1040. doi:10.1172/JCI200423284.
 48. Jiménez N, Krouwer VJD, Post JA. A new, rapid and reproducible method to obtain high quality endothelium in vitro. *Cytotechnology.* 2013;65(1):1-14. doi:10.1007/s10616-012-9459-9.
 49. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Miinick CR. Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins. *J Clin Invest.* 1973;52(April):2745-2756. doi:10.1172/JCI1107470.wash.
 50. Nachman RL. Endothelium: From cellophane to orchestral maestro. *J Clin Invest.* 2012;122(3):796-797. doi:10.1172/JCI62589.
 51. Gimbrone MA, Cotran RS, Folkman J. Human Vascular Endothelial Cells In Culture. *J Cell Biol.* 1974;60:673-684.
 52. Vaccaro PS, Joseph LB, Titterington L, Stephens RE. Methods for the initiation and maintenance of human endothelial cell culture. *Vasc Surg.* 1987;21:391-400.
 53. Folkman J, Haudenschild CC, Zetter BR. Long-term culture of capillary endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;76(10):5217-5221. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/291937>.
 54. Maciag T, Hoover G a, Stemerman MB, Weinstein R. Serial propagation of human endothelial cells in vitro. *J Cell Biol.* 1981;91(2 Pt 1):420-426.
 55. Wagner DD, Olmsted JD, Marder VJ. Immunolocalization of von Willebrand Protein in Weibel-Palade Bodies of Human Endothelial Cells Unlabeled

- Peroxidase-Anti-Peroxidase Staining. *J Cell Biol.* 1982;95(1):355-360. doi:10.1083/jcb.95.1.355.
56. Colucci M, Balconi G, Lorenzet R, et al. Cultured human endothelial cells generate tissue factor in response to endotoxin. *J Clin Invest.* 1983;71(6):1893-1896. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=370395&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
 57. Thornton SC, Mueller SN, Levine EM. Human Endothelial Cells: Use of Heparin in Cloning and Long-Term Serial Cultivation. *Source Sci New Ser.* 1983;222(4624):623-625. doi:10.1126/science.6635659.
 58. McIntyre TM, Zimmerman GA, Satoh K, Prescott SM. Cultured endothelial cells synthesize both platelet-activating factor and prostacyclin in response to histamine, bradykinin, and adenosine triphosphate. *J Clin Invest.* 1985;76(1):271-280. doi:10.1172/JCI111957.
 59. Gelehrter TD, Sznycer-Laszuk R. Thrombin induction of plasminogen activator-inhibitor in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest.* 1986;77(1):165-169. doi:10.1172/JCI112271.
 60. Namiki A, Brogi E, Kearney M, et al. Hypoxia induces vascular endothelial growth factor in cultured human endothelial cells. *J Biol Chem.* 1995;270(52):31189-95. doi:10.1074/jbc.270.52.31189.
 61. Ribatti D, Presta M, Vacca a, et al. Human erythropoietin induces a pro-angiogenic phenotype in cultured endothelial cells and stimulates neovascularization in vivo. *Blood.* 1999;93(8):2627-2636.
 62. Quesenberry PJ, Gimbrone MA. Vascular Endothelium as a Regulator of Granulopoiesis: Production of Colony-Stimulating Activity by Cultured Human Endothelial Cells. *Blood.* 1980;56(6):1060-1068.
 63. Killackey JJF, Johnston MG, Movat HZ. Increased Permeability of Microcarrier-Cultured Endothelial Monolayers In Response To Histamine and Thrombin. *Sci York.* 1986;122(1):50-61.
 64. Zwaginga JJ, Sixma JJ, Groot PG De. Activation of Endothelial Cells Induces Platelet Thrombus Formation on Their Matrix. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1990;10(1):49-61. doi:10.1161/01.ATV.10.1.49.
 65. Koenig A, Yakisan E, Reuter M, et al. Differential Regulation of Stem Cell Factor mRNA Expression in Human Endothelial Cells by Bacterial Pathogens: An In Vitro Model of Inflammation. *Blood.* 1994;83(10):2836-2843.
 66. Waldman WJ, Knight DA, Huang EH. An in vitro model of T cell activation by autologous cytomegalovirus (CMV)-infected human adult endothelial cells: contribution of CMV-enhanced endothelial ICAM-1. *J Immunol.* 1998;160(7):3143-3151.
 67. Lee OH, Bae SK, Bae MH, et al. Identification of angiogenic properties of insulin-like growth factor II in in vitro angiogenesis models. *Br J Cancer.* 2000;82(2):385-391. doi:10.1054/bjoc.1999.0931.

68. Kahn J, Mehraban F, Ingle G, et al. Gene expression profiling in an in vitro model of angiogenesis. *Am J Pathol.* 2000;156(6):1887-1900. doi:10.1016/S0002-9440(10)65062-6.
69. Bachetti T, Morbidelli L. Endothelial Cells in Culture: a Model for Studying Vascular Functions. *Pharmacol Res.* 2000;42(1):9-19. doi:10.1006/phrs.1999.0655.
70. Nakatsu MN, Hughes CCW. Chapter 4 An Optimized Three-Dimensional In Vitro Model for the Analysis of Angiogenesis. *Methods Enzymol.* 2008;443(8):65-82. doi:10.1016/S0076-6879(08)02004-1.
71. Vailhé B, Vittet D, Feige JJ. In vitro models of vasculogenesis and angiogenesis. *Lab Invest.* 2001;81(4):439-452. doi:10.1038/labinvest.3780252.
72. Starke RD, Ferraro F, Paschalaki KE, et al. Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *Vasc Biol.* 2011;117(3):1071-1081. doi:10.1182/blood-2010-01-264507.The.
73. Tammali R, Reddy ABM, Srivastava SK, Ramana K V. Inhibition of aldose reductase prevents angiogenesis in vitro and in vivo. *Angiogenesis.* 2011;14(2):209-221. doi:10.1007/s10456-011-9206-4.
74. Korybalska K, Kawka E, Breborowicz A, Witowski J. Atorvastatin Does Not Impair Endothelial Cell Wound. *J Physiol pharmacology.* 2012;63(4):389-395.
75. Siemerink MJ, Klaassen I, Vogels IMC, Griffioen AW, Van Noorden CJF, Schlingemann RO. CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis.* 2012;15(1):151-163. doi:10.1007/s10456-011-9251-z.
76. Hettler A, Werner S, Eick S, Laufer S, Weise F. A new in vitro model to study cellular responses after thermomechanical damage in monolayer cultures. *PLoS One.* 2013;8(12):1-23. doi:10.1371/journal.pone.0082635.
77. Park JY, Kim BS, Lee J. Evaluation of the angiogenic potency of a novel exopolysaccharide produced by the MK1 bacterial strain. *Arch Pharm Res.* 2016;39(9):1223-1231. doi:10.1007/s12272-016-0776-y.
78. Roudsari LC, West JL. Studying the influence of angiogenesis in in vitro cancer model systems. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;97:250-259. doi:10.1016/j.addr.2015.11.004.
79. Larrivée B, Karsan A. Isolation and Culture of Primary Endothelial Cells. In: Helgason CD, Miller CL, eds. *Basic Cell Culture Protocols.* Totowa, NJ: Humana Press; 2005:315-329. doi:10.1385/1-59259-838-2:315.
80. Henriksen T, Evensen SA, Elgjo R, Vefling A. Human Fetal Endothelial Cells in Culture. *Scand J Haematol.* 1975;14:233-241.
81. Yamamoto K. Human endothelial cells in culture. *Arch Histol Jpn.* 1979;42(1):1-10. doi:10.1679/aohc1950.42.1.
82. Marin V, Kaplanski G, Grès S, Farnarier C, Bongrand P. Endothelial cell culture: Protocol to

- obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *J Immunol Methods*. 2001;254(1-2):183-190. doi:10.1016/S0022-1759(01)00408-2.
83. Ulrich-Merzenich G, Metzner C, Bhone RR, Malsch G, Schiermeyer B, Vetter H. Simultaneous isolation of endothelial and smooth muscle cells from human umbilical artery or vein and their growth response to low-density lipoproteins. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2002;38(May):265-272. doi:10.1290/1071-2690(2002)038<0265:SIOEAS>2.0.CO;2.
 84. Freshney RI. Culture of Specific Cell Types. *Cult Anim Cells*. 2005:375-420. doi:10.1002/0471747599.cac023.
 85. Cheung AL, Cheung AL. Isolation and Culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). *Curr Protoc Microbiol*. 2007:A.4B.1-A.4B.8. doi:10.1002/9780471729259.mca04bs4.
 86. Baudin B, Bruneel A, Bosselut N, Vaubourdolle M. A protocol for isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells. *Nat Protoc*. 2007;2(3):481-485. doi:10.1038/nprot.2007.54.
 87. Haudenschild CC, Cotran RS, Gimbrone MA, Folkman J. Fine Structure of Vascular Endothelium in Culture. *J Ultrastruct Res*. 1975;50:22-32.
 88. Elgjo RF, Henriksen T, Evensen SA. Ultrastructural identification of umbilical cord vein endothelium in situ and in culture. *Cell Tissue Res*. 1975;162(1):49-59. doi:10.1007/BF00223261.
 89. Cheng X, Chapple SJ, Patel B, et al. Gestational diabetes mellitus impairs nrf2-mediated adaptive antioxidant defenses and redox signaling in fetal endothelial cells in utero. *Diabetes*. 2013;62(12):4088-4097. doi:10.2337/db13-0169.
 90. Floris I, Descamps B, Vardeu A, et al. Gestational Diabetes Mellitus Impairs Fetal Endothelial Cell Functions Through a Mechanism Involving MicroRNA-101 and Histone Methyltransferase Enhancer of Zester Homolog-2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(3):664-674. doi:10.1161/ATVBAHA.114.304730.
 91. Shao C, Chen J, Chen P, et al. Targeted transplantation of human umbilical cord blood endothelial progenitor cells with immunomagnetic nanoparticles to repair corneal endothelium defect. *Stem Cells Dev*. 2015;24(6):756-767. doi:10.1089/scd.2014.0255.
 92. Yin Y, Liu H, Wang F, Li L DM, Huang L et al. Transplantation of cryopreserved human umbilical cord blood-derived endothelial progenitor cells induces recovery of carotid artery injury in nude rats. *Stem Cell Res Ther*. 2015;6(37):1-12. doi:10.1186/s13287-015-0022-4.
 93. Huang M, Qiu Q, Zeng S, et al. Niclosamide inhibits the inflammatory and angiogenic activation of human umbilical vein endothelial cells. *Inflamm Res*. 2015;64(12):1023-1032. doi:10.1007/s00011-015-0888-8.
 94. Borges LE, Bloise E, Dela Cruz C, et al. Urocortin 1 expression and secretion by human umbilical vein endothelial cells: In vitro effects of

- interleukin 8, interferon γ , lipopolysaccharide, endothelin 1, prostaglandin F-2 α , estradiol, progesterone and dexamethasone. *Peptides*. 2015;74:64-69. doi:10.1016/j.peptides.2015.10.010.
95. Rapp BM, Reza M, Ofstein RH, et al. Resident Endothelial Progenitor Cells from Human Placenta Have Greater Vasculogenic Potential than Circulating Endothelial Progenitor Cells from Umbilical Cord Blood. *Cell Med*. 2011;21(1):85-96. doi:10.3727/215517911X617888.
 96. Shen C, Lie P, Miao T, et al. Conditioned medium from umbilical cord mesenchymal stem cells induces migration and angiogenesis. *Mol Med Rep*. 2015;12(1):20-30. doi:10.3892/mmr.2015.3409.
 97. Ebrahim N a, Leach L. Temporal Studies into Attachment, VE-Cadherin Perturbation, and Paracellular Migration of Human Umbilical Mesenchymal Stem Cells Across Umbilical Vein Endothelial Monolayers. *Stem Cells Dev*. 2015;24(4):426-436. doi:10.1089/scd.2014.0207.
 98. Pafumi C, Farina M, Bandiera S, et al. Differences in umbilical cord blood units collected during cesarean section, before or after the delivery of the placenta. *Gynecol Obstet Invest*. 2002;54(2):73-77. doi:10.1159/000067714.
 99. Noh E, Kim Y, Cho M. Comparison of oxidative stress markers in umbilical cord blood after vaginal and cesarean delivery. *Obstet Gynecol Sci*. 2014;57(2):109-114. <http://synapse.koreamed.org/search.php?where=aview&id=10.5468/ogs.2014.57.2.109&code=3021OGS&vmode=FULL>.
 100. Glasser L, Sutton N, Schmelting M, Machan JT. A comprehensive study of umbilical cord blood cell developmental changes and reference ranges by gestation, gender and mode of delivery. *J Perinatol*. 2015;35(7):469-475. doi:10.1038/jp.2014.241.
 101. Peirce C, Gross R, Bill A, Merrill K. Tissue-Culture Evaluation of the Viability of Blood Vessels Stored by Refrigeration. *Ann Surg*. 1949;129(3):333-348.
 102. López-Macay A, Ruiz-Medina EJ, Ventura-Gallegos JL, et al. [Characterization of hemodynamic ex vivo model to study endothelial activation by TNF- α in prefunded human veins]. *Gac médica México*. 2015;151(2):206-215. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25946532>.
 103. Haudenschild C, Folkman Z, Klagsbrun M. Human Vascular Endothelial Cells in Culture. *Exp Cell Res*. 1976;98:175-183.
 104. Manconi F, Markham R, Fraser IS. Culturing endothelial cells of microvascular origin. *Methods Cell Sci*. 2000;22(2-3):89-99. doi:10.1023/A:1009895723488.
 105. Jarell B, Levine E, Shapiro S, et al. Human adult endothelial cell growth In culture. *J Vasc Surg*. 1984;1(6):757-764.
 106. Relou IAM, Damen CA, van der Schaft DWJ, Groenewegen G, Griffioen AW. Effect of culture conditions on endothelial cell growth and responsiveness. *Tissue Cell*. 1998;30(5):525-530. doi:10.1016/S0040-8166(98)80032-3.

107. Saba SR, Mason RG. Effects of platelets and certain platelet components on growth of cultured human endothelial cells. *Thromb Res.* 1975;7:807-812.
108. Lewis JL, Hoak JC, Maca RD, Glenna L. Replication of Human Endothelial Cells in Culture Feline Leukemia and RD-114 Virus Group-Specific Proteins: Comparison of Amino Terminal Sequence. *Science* (80-). 1973;181(4098):453-454.
109. Polchow B, Kebbel K, Schmiedeknecht G, et al. Cryopreservation of human vascular umbilical cord cells under good manufacturing practice conditions for future cell banks. *J Transl Med.* 2012;10:98. doi:10.1186/1479-5876-10-98.
110. Garbern JC, Mummery CL, Lee RT. Regenerative biology. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2013;1:1-18. doi:10.3402/arb.v1.25247.
111. Staton CA, Reed MWR, Brown NJ. A critical analysis of current in vitro and in vivo angiogenesis assays. *Int J Exp Pathol.* 2009;90(3):195-221. doi:10.1111/j.1365-2613.2008.00633.x.
112. Bouis D, Hospers GAP, Meijer C, Molema G, Mulder NH. Endothelium in vitro: A review of human vascular endothelial cell lines for blood vessel-related research. *Angiogenesis.* 2001. doi:10.1023/A:1012259529167.
113. Hughes SE. Functional Characterization of the Spontaneously Transformed Human Umbilical Vein Endothelial Cell Line ECV304: Use in an in Vitro Model of Angiogenesis. *Exp Cell Res.* 1996;225(168):171-185. doi:10.1006/excr.1996.0168.
114. Franke R-P, Gräfe M, Seiffge D, Mittermayer C, Drenckhahn D. Induction of human vascular endothelial stress fibres by fluid shear stress. *Nature.* 1984;307(16):648-649.
115. Pu F., Williams R., Markkula T., Hunt J. Expression of leukocyte-endothelial cell adhesion molecules on monocyte adhesion to human endothelial cells on plasma treated PET and PTFE in vitro. *Biomaterials.* 2002;23:4705-4718. doi:10.1016/S0142-9612(02)00219-3.
116. Ho M, Yang E, Matcuk G, et al. Identification of endothelial cell genes by combined database mining and microarray analysis. *Physiol Genomics.* 2003;13(3):249-262. doi:10.1152/physiolgenomics.00186.2002.
117. Albelda SM, Muller W a, Buck C a, Newman PJ. Molecular and Cellular Properties of PECAM-1(endoCAM/CD31): A Novel Vascular Cell-Cell Adhesion Molecule. *J Cell Biol.* 1991;114(5):1059-1068. doi:10.1083/jcb.114.5.1059.
118. Dawson DW, Pearce SF a, Zhong RQ, Silverstein RL, Frazier W a, Bouck NP. CD36 mediates the in vitro inhibitory effects of thrombospondin- 1 on endothelial cells. *JCell Biol.* 1997;138(3):707-717. doi:10.1083/jcb.138.3.707.
119. Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H. Membrane Glycoprotein CD36: A Review od Its Role in Adherence, Signal, Transduction, and Transfusion Medicine. *Blood.* 1992;80(5):1105-1115.

120. Nickoloff BJ. The human progenitor cell antigen (CD34) is localized on endothelial cells, dermal dendritic cells, and perifollicular cells in formalin-fixed normal skin, and on proliferating endothelial cells and stromal spindle-shaped cells in Kaposi's sarcoma. *Arch Dermatol.* 1991;127(4):523-529. doi:10.1001/archderm.1991.04510010091009.
121. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* 2006;54(4):385-395. doi:10.1369/jhc.4A6514.2005.
122. Kelper T, Santoso S, Nawroth PP, Orlova V, Chavakis T. The role of junctional adhesion molecules in cell-cell interactions. *Histol Histopathol.* 2005;20:197-203.
123. Doan CC, Le TL, Hoang NS, Doan NT, Le VD, Do MS. Differentiation of umbilical cord lining membrane-derived mesenchymal stem cells into endothelial-like cells. *Iran Biomed J.* 2014;18(2):67-75. doi:10.6091/ibj.1261.2013.
124. Steffen BJ, Butcher EC, Engelhardt B. Evidence for involvement of ICAM-1 and VCAM-1 in lymphocyte interaction with endothelium in experimental autoimmune encephalomyelitis in the SJL/J mouse. *Am J Pathol.* 1994;145(1):189-201. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1887301&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
125. Davis MJ, Gordon JL, Gearing AJH, et al. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol.* 1993;171:223-229.
126. Wagner O, Christ G, Veirhapper H, et al. Polar secretion of endothelin-1 by cultured endothelial cells. *J Biol Chem.* 1992;267:16066-16068.
127. Dong ZM, Chapman SM, Brown AA, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD. The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis. *J Clin Invest.* 1998;102(1):145-152. doi:10.1172/JCI3001.
128. Asa D, Raycroft L, Ma L, et al. The P-selectin Glycoprotein Ligand Functions as a Common Human Leukocyte Ligand for P- and E-selectins. *J Biol.* 1995;270(19):11662-11670.
129. Rice JW, Davis JE, Crowl RM, Johnston P a. Development of a high volume screen to identify inhibitors of endothelial cell activation. *Anal Biochem.* 1996;241(2):254-259. doi:10.1006/abio.1996.0407.
130. Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FCA, et al. ELAM-1 Mediates Cell Adhesion by Recognition of a Carbohydrate Ligand, Sialyl-Lex. *Science (80-).* 1990;250:1130-1132.
131. Kluger MS, Clark PR, Tellides G, Gerke V, Pober JS. Claudin-5 controls intercellular barriers of human dermal microvascular but not human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33(3):489-500. doi:10.1161/ATVBAHA.112.300893.

132. Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: Claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol.* 1999;147(1):185-194. doi:10.1083/jcb.147.1.185.
133. Aitkenhead M, Wang S-J, Nakatsu MN, Mestas J, Heard C, Hughes CCW. Identification of endothelial cell genes expressed in an in vitro model of angiogenesis: Induction of ESM-1, (beta)ig-h3, and NrCAM. *Microvasc Res.* 2002;63(2):159-171. doi:10.1006/mvre.2001.2380.
134. Voyta JC, Via DP, Butterfield CE, Zetter BR. Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol.* 1984;99(6):2034-2040. doi:10.1083/jcb.99.6.2034.
135. Pober JS, Sessa WC. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2007;7(10):803-815. doi:10.1038/nri2171.
136. Birukova AA, Zagranichnaya T, Fu P, et al. Prostaglandins PGE2 and PGI2 promote endothelial barrier enhancement via PKA- and Epac1/Rap1-dependent Rac activation. *Exp Cell Res.* 2007;313(11):2504-2520. doi:10.1016/j.yexcr.2007.03.036.
137. Yang S, Graham J, Kahn JW, Schwartz E a, Gerritsen ME. Functional roles for PECAM-1 (CD31) and VE-cadherin (CD144) in tube assembly and lumen formation in three-dimensional collagen gels. *Am J Pathol.* 1999;155(3):887-895. doi:10.1016/S0002-9440(10)65188-7.
138. Tian Y, Jain S, Kelemen SE, Autieri M V. AIF-1 expression regulates endothelial cell activation , signal transduction , and vasculogenesis. *Cardiovasc Res.* 2009;19140:256-266. doi:10.1152/ajpcell.00325.2008.
139. Takase H, Matsumoto K, Yamadera R, et al. Supplementary Data Genome-wide identification of endothelial cell-enriched genes in the mouse embryo. *Blood.* 2012;120(4):914-923. doi:10.1182/blood-2011-12-398156.
140. Wu F, Song H, Zhang Y, et al. Irisin induces angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in zebrafish embryos in vivo via activation of the ERK signaling pathway. *PLoS One.* 2015;10(8):1-17. doi:10.1371/journal.pone.0134662.
141. Umaru B, Pyriochou A, Kotsikoris V, Papapetropoulos A, Topouzis S. ATP-Sensitive Potassium Channel Activation Induces Angiogenesis In Vitro and In Vivo. *J Pharmacol Exp Ther.* 2015;354(1):79-87. doi:10.1124/jpet.114.222000.
142. Jiang Y, Liu H, Liu W-J, et al. Endothelial Aquaporin-1 (AQP1) Expression Is Regulated by Transcription Factor Mef2c. *Mol Cells.* 2016;39(4):292-298. doi:10.14348/molcells.2016.2223.
143. Yang Z, Yang Y, Xiong K, et al. Nitric oxide producing coating mimicking endothelium function for multifunctional vascular stents. *Biomaterials.* 2015;63:80-92. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.06.016.
144. Song H, Wu F, Zhang YY, et al. Irisin promotes human umbilical vein endothelial cell proliferation through the ERK signaling

- pathway and partly suppresses high glucose-induced apoptosis. *PLoS One*. 2014;9(10):3-10. doi:10.1371/journal.pone.0110273.
145. Sheikh S, Gale Z, Ed Rainger G, Nash GB. Methods for exposing multiple cultures of endothelial cells to different fluid shear stresses and to cytokines, for subsequent analysis of inflammatory function. *J Immunol Methods*. 2004;288(1-2):35-46. doi:10.1016/j.jim.2004.02.005.
 146. Krause BJ, Costello PM, Muñoz-Urrutia E, Lillycrop KA, Hanson MA, Casanello P. Role of DNA methyltransferase 1 on the altered eNOS expression in human umbilical endothelium from intrauterine growth restricted fetuses. *Epigenetics*. 2013;8(9):944-952. doi:10.4161/epi.25579.
 147. Wei X, Liu C, Wang H, et al. Surface Phosphatidylserine Is Responsible for the Internalization on Microvesicles Derived from Hypoxia-Induced Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells into Human Endothelial Cells. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147360. doi:10.1371/journal.pone.0147360.
 148. Wang C, He Y, Yang M, Sun H, Zhang S, Wang C. Safflor yellow B suppresses angiotensin II-mediated human umbilical vein cell injury via regulation of Bcl-2/p22phox expression. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;273(1):59-67. doi:10.1016/j.taap.2013.08.018.
 149. Zhou B, Ren C, Zu L, Zheng L, Guo L, Gao W. Elevated plasma migration inhibitory factor in hypertension – hyperlipidemia patients correlates with impaired endothelial function. *Medicine (Baltimore)*. 2016;95(43):1-7.
 150. Xia F, Wang C, Jin Y, et al. Luteolin Protects HUVECs from TNF- α -induced Oxidative Stress and Inflammation via its Effects on the Nox4/ROS-NF- κ B and MAPK Pathways. *J Atheroscler Thromb*. 2014;21(8):768-783. doi:10.5551/jat.23697.
 151. Monti M, Terzuoli E, Ziche M, Morbidelli L. H2S dependent and independent anti-inflammatory activity of zofenoprilat in cells of the vascular wall. *Pharmacol Res*. 2016;113:426-437. doi:10.1016/j.phrs.2016.09.017.
 152. Pratheeshkumar P, Kuttan G. Andrographolide inhibits human umbilical vein endothelial cell invasion and migration by regulating MMP-2 and MMP-9 during angiogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2011;30(1):33-41. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21609314>.
 153. Trkov S, Eng G, di Liddo R, Parnigotto PP, Vunjak-Novakovic G. Micropatterned 3-Dimensional Hydrogel System to Study Human Endothelial-Mesenchymal Stem Cell Interactions. *J Tissue Eng Regen Med*. 2011;4(3):205-215. doi:10.1002/term.231.Micropattern ed.
 154. Sheldon H, Heikamp E, Turley H, et al. New mechanism for Notch signaling to endothelium at a distance by delta-like 4 incorporation into exosomes. *Blood*. 2010;116(13):2385-2394. doi:10.1182/blood-2009-08-239228.
 155. Kwon B, Kang C, Kim J, et al. H2O2-responsive antioxidant polymeric nanoparticles as

- therapeutic agents for peripheral arterial disease. *Int J Pharm.* 2016;511(2):1022-1032. doi:10.1016/j.ijpharm.2016.08.014.
156. Zhu G, Li G. The role of osthole on the human umbilical vein endothelial cells in chronic high glucose. *Int Conf Hum Biomed Eng.* 2011;(978):224-226. doi:10.1109/HHBE.2011.6027939.
 157. Westermeier F, Salomón C, González M, et al. Insulin restores gestational diabetes mellitus-reduced adenosine transport involving differential expression of insulin receptor isoforms in human umbilical vein endothelium. *Diabetes.* 2011;60(6):1677-1687. doi:10.2337/db11-0155.
 158. Pujadas G, de Nigris V, Prattichizzo F, la Sala L, Testa R, Ceriello A. The dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor teneligliptin functions as antioxidant on human endothelial cells exposed to chronic hyperglycemia and metabolic high-glucose memory. *Endocrine.* 2016;4:1-12. doi:10.1007/s12020-016-1052-0.
 159. Chu P, Han G, Ahsan A, et al. Phosphocreatine protects endothelial cells from Methylglyoxal induced oxidative stress and apoptosis via the regulation of PI3K/Akt/eNOS and NF- κ B pathway. *Vascul Pharmacol.* 2016. doi:10.1016/j.vph.2016.08.012.
 160. Liu Q, Qiao A-M, Yi L-T, Liu Z-L, Sheng S-M. Protection of kinsenoside against AGEs-induced endothelial dysfunction in human umbilical vein endothelial cells. *Life Sci.* 2016;162:102-107. doi:10.1016/j.lfs.2016.08.022.
 161. Kaiser S, Toborek M. Liposome-Mediated High-Efficiency Transfection of human endothelial cells. *J Vasc Res.* 2001;38:133-143.
 162. Wang Y, Xu HX, Lu M De, Tang Q. Expression of thymidine kinase mediated by a novel non-viral delivery system under the control of vascular endothelial growth factor receptor 2 promoter selectively kills human umbilical vein endothelial cells. *World J Gastroenterol.* 2008;14(2):224-230. doi:10.3748/wjg.14.224.
 163. Wu X, Jiang F. MicroRNA-365 is a negative regulator of endothelial cell proliferation. *J Mol Biochem.* 2016;5:78-86.
 164. Mu X, Fang C, Zhou J, et al. Fusion with human lung cancer cells elongates the life span of human umbilical endothelial cells and enhances the anti-tumor immunity. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2016;142(1):111-123. doi:10.1007/s00432-015-2002-6.
 165. Romani F, Lanzzone A, Tropea A, Tiberi F, Catino S, Apa R. Nicotine and cotinine affect the release of vasoactive factors by trophoblast cells and human umbilical vein endothelial cells. *Placenta.* 2011;32(2):153-160. doi:10.1016/j.placenta.2010.11.010.
 166. Costa SMR, Isganaitis E, Matthews TJ, et al. Maternal obesity programs mitochondrial and lipid metabolism gene expression in infant umbilical vein endothelial cells. *Int J Obes.* 2016;40(11):1627-1634. doi:10.1038/ijo.2016.142.
 167. Inglis S, Christensen D, Wilson DI, Kanczler JM, Oreffo ROC. Human

endothelial and foetal femur-derived stem cell co-cultures modulate osteogenesis and angiogenesis. *Stem Cell Res Ther.* 2016;7(1):13. doi:10.1186/s13287-015-0270-3.

168. Phetfong J, Supokawej A, Wattanapanitch M, Kheolamai P, U-pratya Y, Issaragrisil S. Cell type of origin influences iPSC generation and differentiation to cells of the hematoendothelial lineage. *Cell Tissue Res.* 2016;365(1):101-112. doi:10.1007/s00441-016-2369-y.
169. Torres-Estay V, Carreño D V., Fuenzalida P, et al. Androgens modulate male-derived endothelial cell homeostasis using androgen receptor-dependent and receptor-independent mechanisms. *Angiogenesis.* 2016;(2). doi:10.1007/s10456-016-9525-6.
170. Castelli G, Parolini I, Cerio AM, et al. Conditioned medium from human umbilical vein endothelial cells markedly improves the proliferation and differentiation of circulating endothelial progenitors. *Blood Cells, Mol Dis.* 2016;61:58-65. doi:10.1016/j.bcmd.2016.07.007.