



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**EXPANSIÓN DE PRECURSORES VASCULARES HUMANOS DERIVADOS DE  
SANGRE PERIFÉRICA EN UN SISTEMA DE CULTIVO EN SUSPENSIÓN**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**BIOL. GÓMEZ CALDERON ALAN JESÚS**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. PAUL MONDRAGÓN TERÁN**  
CENTRO MÉDICO NACIONAL 20 DE NOVIEMBRE, ISSSTE.

**COMITÉ TUTOR: DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES**  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA**  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.

**CD. MX., FEBRERO, 2019**



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.

OFICIO CPCB/110/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 29 de octubre de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **GÓMEZ CALDERÓN ALAN JESÚS** con número de cuenta **308180547**, con la tesis titulada **"EXPANSIÓN DE PRECURSORES VASCULARES HUMANOS DERIVADOS DE SANGRE PERIFÉRICA EN UN SISTEMA DE CULTIVO EN SUSPENSIÓN"**, realizada bajo la dirección del **DR. PAUL MONDRÁGON TERÁN**:

Presidente: DR. JUAN ANTONIO SUÁREZ CUENCA  
Vocal: DR. JULIO ISABEL PÉREZ CARREÓN  
Secretario: DR. LUIS FERNANDO COVARRUBIAS ROBLES  
Suplente: DRA. ELIZABETH ORTIZ SÁNCHEZ  
Suplente: DRA. ILEANA PATRICIA CANTO CETINA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 30 de enero de 2019

  
**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**  
**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



## **Agradecimientos institucionales**

*A través de las siguientes líneas, expresaré mi más sincero agradecimiento a las instituciones y personas, que con su soporte han colaborado en la realización de este trabajo de investigación.*

*Agradezco en primer lugar al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por el apoyo y el renombre otorgados en la realización de mis estudios de maestría, también agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) por el sustento económico brindado.*

*A mi tutor el Dr. Paul Mondragón Terán, por su experiencia, orientación y asesoramiento crítico, por creer en mí y por apoyarme e impulsarme, dándome la oportunidad de crecer profesionalmente, pero también personalmente.*

*A mis asesores el Dr. Luis Fernando Covarrubias y la Dra. Ileana Patricia Canto Cetina por su colaboración y asesoramiento, que sin duda fue elemental en etapa tan importante.*

## **Agradecimientos personales**

*A mis padres Arturo Gómez Gómez y Elvia Calderón Paniagua, les agradezco por guiarme y enseñarme que la perseverancia, el compromiso y la responsabilidad, son la clave de todo; les agradezco su apoyo incondicional no solo por el brindado en esta etapa, sino por el manifestado a lo largo de toda mi vida, por lo que no sin duda alguna no habría logrado llegar hasta este punto. Los amo y todos estos logros son por ustedes y para ustedes.*

*A mi novia Ericka Hernández Tapia, por su cariño y afecto incondicional, por alentarme y apoyarme siempre, por estar a mi lado en los momentos complicados sin embargo también en los mejores momentos, siendo este uno de ellos, te agradezco y te amo.*

*A mi hermano, abuelos, tíos y primos por apoyarme y alentarme en todo momento.*

*A mi amigo Alejandro por su discusión crítica y compartir además de ideas, una sincera amistad.*

*A mis amigos del Laboratorio Mario Téllez, Abisai, Felipe, Mario Marroquín, Daniel y Tuareg, con los cuales he aprendido y crecido en ésta última etapa, por compartir el conocimiento, discusiones y sin duda alguna muchas risas.*

*A la Dra. Rebeca Pérez Cabeza de Vaca y a la Dra. Mónica Escamilla, por su asesoramiento crítico.*

*A la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México, le agradezco por ser mi alma mater al formarme y permitirme ser parte de ésta inmensa comunidad.*

## Dedicatoria

*Mi tesis la dedico con todo mi cariño a los seres queridos que perdí y los cuales me vieron crecer, dedicando especialmente este trabajo a mi tío José Calderón quien fue una persona muy valiente y un guerrero, quién ante la adversidad siempre guardó una sonrisa y a mi abuelo Mariano Gómez quien con su cariño, afecto y enseñanzas me transmitió a través de mi padre la responsabilidad y el valor de ser una persona íntegra.*

*“La ciencia no sabe de países, porque el conocimiento le pertenece a la humanidad y es la antorcha que ilumina el mundo. La ciencia es el alma de la prosperidad de las naciones y la fuente de todo progreso.”*

**Louis Pasteur**

*“Los científicos no persiguen la verdad; es ésta la que los persigue a ellos”*

**Karl Schlecta**

## Índice

### Lista de abreviaturas

### Símbolos y formulas

### Lista de figuras

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>1. Introducción</b> .....	3
1.1 Células troncales y células progenitoras .....	3
1.2 Nicho de las células troncales hematopoyéticas en la médula ósea .....	5
1.2.1 Nicho Endostial.....	5
1.2.2 Nicho Vascular .....	8
1.3 Movilización de las células troncales hematopoyéticas desde la médula ósea hacia sangre periférica.....	11
1.4 Migración y adhesión celular .....	13
1.5 Diferenciación de las progenitoras vasculares por <i>shear stress</i> .....	15
1.6 Células progenitoras vasculares derivadas de sangre periférica humana .....	17
1.7 Potencial terapéutico de las células progenitoras endoteliales .....	20
<b>2. Justificación</b> .....	21
<b>3. Objetivos</b> .....	22
3.1 General.....	22
3.2 Particulares.....	22
<b>4. Antecedentes</b> .....	23
<b>5. Metodología</b> .....	25
5.1 Obtención de muestras de sangre periférica humana.....	25
5.1.1 Aislamiento de por gradiente de Ficoll de células mononucleares de sangre periférica humana .....	25
5.1.2 Cinética de proliferación de las PVs .....	26
5.1.3 Proceso de vasculogenesis <i>in vitro</i> de PVs en monocapa .....	27
5.1.4 Inmunocitoquímica de PVs en monocapa.....	27



5.1.5	Inmunocitoquímica de estructuras microvasculares <i>in vitro</i> .....	28
5.1.6	Citometría de flujo de PVs en monocapa .....	28
5.2	Adhesión de PVs a microacarreadores.....	29
5.3	Cultivo en agitación constante .....	30
5.3.1	Obtención celular del cultivo en agitación .....	32
5.3.2	Proceso de vasculogenesis <i>in vitro</i> posterior al proceso de agitación constante .....	32
5.3.3	Inmunocitoquímica de PVs posterior al proceso de agitación.....	32
5.3.4	Inmunocitoquímica de estructuras microvasculares <i>in vitro</i> posterior al proceso de agitación .....	33
5.3.5	Citometría de Flujo de las PVs posterior al proceso de agitación .....	34
5.4	Análisis estadístico .....	34
<b>6.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>35</b>
6.1	Caracterización fenotípica de células progenitoras endoteliales derivadas de sangre periférica humana .....	35
6.1.1	Proceso de derivación de las PVs .....	35
6.1.2	Caracterización del inmunofenotipo de los PVs en cultivo en monocapa .....	39
6.1.3	Prueba de formación de microvasculatura a partir de PVs en cultivo estático .....	41
6.1.4	Inmunocitoquímica de prueba de microvasculatura .....	42
6.1.5	Prueba de adhesión inicial de PVs a microacarreadores .....	44
6.1.6	Cultivo en suspensión.....	58
<b>7.</b>	<b>Discusión</b> .....	<b>73</b>
<b>8.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	<b>78</b>
<b>9.</b>	<b>Literatura citada</b> .....	<b>79</b>

## Lista de abreviaturas

AH: Acido Hialuronico

CAR: *CXCL12- abundant reticular cell*

CDKs: *Cycline-dependent kinase*

CMNs: Células Mononucleares

CTHs: Células troncales hematopoyéticas

CXCR4: CXC Receptor type 4

EGM-2: *Endothelial Growth Medium-2*

eNOS: *endothelial Nitric Oxide Synthase*

FBS: *Fetal Bovine Serum*

FGF: *Fibroblastic Growth Factor*

FGF: *Fibroblastic growth factor*

G-CSF: *Granulocyte- Colony Stimulating Factor*

Gro- $\alpha$ : *Growth regulated oncogene- $\alpha$*

hEGF: Human Epidermal Growth Factor

hFGF- $\beta$ : *human Fibroblastic Growth Factor- $\beta$*

HUVECs: *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

ICAM-1: *Intercellular Molecule Adhesión*

MMPs: Metaloproteinasas de matriz extracelular

MO: Médula Osea

PBS: *Phosphate Buffer Saline*

PECAM: *Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*

PFA: *Paraformaldehído*

proMPPs: Precursora inactiva de Metaloproteinasas

PSGL.1: *P-selectin glycoprotein lignd-1*

R3-IGF-1: *Insulin Like Growth Factor-1*

SCF: *Stem Cell Factor*

SDF-1: *Stromal Cell Derived Factor 1 o*

SDF-1: *Stromal Cell Derived Factor-1*

*Shear stress: esfuerzo de corte*

SNO: *Spindle-shaped N-cadherin<sup>+</sup>CD45<sup>+</sup> Osteoblastic Cells*

TGF- $\beta$ : *Transforming growth factor- $\beta$*

V-CAM: *Vascular Cell Adhesion Molecule*

VEGF-2: *Vascular Endothelial Growth Factor-2*

## Símbolos y formulas

- Esfuerzo de corte: en estructuras vasculares

$$\tau = 4\mu Q / \pi r^3$$

- Velocidad específica de crecimiento:

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

- Tasa de duplicación:

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

- Esfuerzo de corte en matraz en agitación orbital:

$$\tau = \alpha \sqrt{\eta \rho (2\pi f)^3}$$

## Lista de figuras

- Figura 1. Clasificación de las células troncales de acuerdo con su origen y plasticidad o potencial de diferenciación.** En la etapa embrionaria, las células totipotentes, pluripotentes y multipotentes formarán desde un individuo completo hasta tejidos de cualquier capa embrionaria; en etapa adulta, las células unipotentes o progenitores, darán lugar a células órgano y tejido específicas. Modificado de Ho, L. & Crabtree, G. (2010). .....3
- Figura 2. El nicho endostial como una estructura compleja.** El nicho endostial se encuentra compuesto por células troncales, células progenitoras, factores de crecimiento y una matriz extracelular, todos estos elementos participan en la hematopoyesis y el mantenimiento de las CTHs. Modificado de Tmma & Ribatti., 2017.....7
- Figura 3. Nicho vascular.** La hematopoyesis ocurre en los espacios inter sinusoidales y está mediada por distintas señales provenientes tanto del nicho endostial y de los vasos sanguíneos, además de todos los tipos celulares adventiciales. Modificado de Tmma & Ribatti., 2017..... 10
- Figura 4. Quimiotaxis para el reclutamiento de CTHs.** Modelo simplificado que esquematiza el proceso por el cual señales provenientes de la circulación periférica (lideradas principalmente por el VEGF y óxido nítrico), se encargan de movilizar a las CTHs (HSC) desde la médula ósea. Modificado de Balligand y cols., 2007..... 12
- Figura 5. Proceso secuencial en el reclutamiento de las PVs.** La llegada de las PVs a su zona diana, requiere de una serie de pasos ordenados, desde su movilización desde la MO, el reclutamiento, colonización y diferenciación para la formación y remodelación del endotelio vascular. Modificado de Fusenig y cols., 2008..... 14
- Figura 6. Transducción de señales inducidas por *shear stress*.** Moléculas de la membrana celular que funcionan como mecanorreceptores, que, en respuesta al esfuerzo de corte, desencadenarán una vía de señalización, que controla distintos procesos, como proliferación, angiogénesis y diferenciación de las EPCs y CEs. Modificado de Stolberg & McCloskey., 2009..... 16
- Figura 7. Poblaciones de PVs derivadas de sangre periférica.** Microfotografías de EPCs tempranas (izquierda) y EPCs tardías (derecha) derivadas de sangre periférica humana. Tomado de Calzi y cols., 2010..... 18
- Figura 8. Origen y destino de las PVs.** Resumen esquemático del linaje de EPCs derivadas de sangre periférica, marcadores de superficie y su diferenciación. EPCs tempranas, se caracterizan por derivar de un linaje de células CD34<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> mientras que las EPCs tardías se caracterizan por derivar de un linaje CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>. Tomado de Krenning y cols., 2009..... 19
- Figura 9. Obtención de CMNs por grafiante de Ficoll.** Proceso esquemático del procedimiento de aislamiento de la fracción monoclear a partir de sangre periférica humana.....26
- Figura 10. Cultivo en agitación constante.** Fotografía que ilustra el cultivo de PVs en suspensión, en matraces Erlenmeyer de 25mL de capacidad.....31

- Figura 11. Proceso de Derivación de PVs.** Obtención de colonias de precursores endoteliales, a lo largo de 384h con medio de cultivo selectivo, encontrando un alto porcentaje de PVs a partir de las 264h. Escala representa 50  $\mu\text{m}$ .....36
- Figura 12. Micrografía de PVs en monocapa.** Representación de Progenitores Endoteliales en cultivo a 75% de confluencia. Las escalas representan 100  $\mu\text{m}$  (izquierda) y 50  $\mu\text{m}$  (derecha).....36
- Figura 13. Micrografías de la cinética de crecimiento de las PVs.** Se identifica una etapa de expansión celular o etapa de crecimiento exponencial (24h- 120/144h), y una etapa de decaimiento o muerte celular (144h/ 168h). Escala representa 100  $\mu\text{m}$  (4x) y 50  $\mu\text{m}$  (10x).....37
- Figura 14. Cinética de crecimiento de las PVs en monocapa.** Se indica el número de células·cm<sup>-2</sup> (eje vertical izquierdo) y la viabilidad celular (%) (eje vertical derecho).....38
- Figura 15. Citometría de flujo de las PVs cultivadas en monocapa.** Se representa el porcentaje de expresión para los marcadores CD133, KDR, CD31/PECAM-1 y VE-Cadherina, en comparación con el control.....39
- Figura 16. Micrografías de las PVs cultivadas en monocapa, identificadas por inmunocitoquímica.** Co-expresión de CD133-Alexa Flúor 488 (verde), como marcador de troncalidad y marcadores de linaje endotelial como PECAM-1, KDR, VE-CAD y Vwf TRITC-TRICT (rojo). Escala representa 50  $\mu\text{m}$ .....40
- Figura 17. Formación de microvasculatura a partir de PVs cultivadas en monocapa.** Proceso de generación de estructuras microvasculares a partir de PVs cultivadas en monocapa, durante 30 días, realizando cambio de medio cada 3 días (A) y cada 6 días (B), escala representa 100  $\mu\text{m}$  (4X) y 50  $\mu\text{m}$  (10X).....41
- Figura 18. Microvasculatura *in vitro* generada a partir de CPEs cultivadas en monocapa.** Inmunocitoquímica de estructura microvascular capturada en dos micrografías, se presenta la co-expresión de Faloidina-FITC (verde) y el factor de Von Willebrand- TRITC (rojo), en contratincion con DAPI para resaltar el núcleo celular (azul). Escala representa 50  $\mu\text{m}$ ....42
- Figura 19. Micrografías PVs diferenciadas en monocapa, y microvasculatura, identificadas por inmunocitoquímica.** Co-expresión de Faloidina-FITC (verde) y el factor de Von Willebrand- TRITC (rojo), en estructuras microvasculares, posterior a un proceso de diferenciación por 30 días realizando cambio de medio cada 3 y 6 días. Escala representa 50  $\mu\text{m}$ .....43
- Figura 20. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores y su cinética de crecimiento, en la condición de  $1.5 \times 10^5$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 5.4, 6.09 y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores y 50rpm de agitación inicial. A)** Representación del crecimiento de las PVs en la superficie de microacarreadores, evaluando distintas densidades de estos. **B)** Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 168h de cultivo, con relación a distintas densidades de microacarreadores en cm<sup>2</sup>.....45

**Figura 21. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores y su cinética de crecimiento, en la condición de  $1.5 \times 10^5$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 5.4, 6.09 y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores y 60rpm de agitación inicial. A)** Representación del crecimiento de las PVs en la superficie de microacarreadores, evaluando distintas densidades de estos. **B)** Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 168h de cultivo, con relación a distintas densidades de microacarreadores en cm<sup>2</sup>.....46

**Figura 22. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores y su cinética de crecimiento, en la condición de  $1.1 \times 10^5$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 6.09 y 6,75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores y 50rpm de agitación inicial. A)** Representación del crecimiento de las PVs en la superficie de microacarreadores, evaluando distintas densidades de estos. **B)** Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 144h de cultivo, con relación a distintas densidades de microacarreadores en cm<sup>2</sup>.....48

**Figura 23. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores y su cinética de crecimiento, en la condición de  $9 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 6.09 y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores y 50rpm de agitación inicial. A)** Representación del crecimiento de las PVs en la superficie de microacarreadores, evaluando distintas densidades de estos. **B)** Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 192h de cultivo, con relación a distintas densidades de microacarreadores en cm<sup>2</sup>.....49

**Figura 24. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores y su cinética de crecimiento, en la condición de  $7 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 6.09 y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores y 50rpm de agitación inicial. A)** Representación del crecimiento de las PVs en la superficie de microacarreadores, evaluando distintas densidades de estos. **B)** Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 192h de cultivo, con relación a distintas densidades de microacarreadores en cm<sup>2</sup>.....50

**Figura 25. Micrografías de CPEs unidas a microacarreadores y su cinética de crecimiento, en la condición de  $5 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 6.09 y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores y 50 rpm de agitación inicial. A)** Representación del crecimiento de las PVs en la superficie de microacarreadores, evaluando distintas densidades de estos. **B)** Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 192h de cultivo, con relación a distintas densidades de microacarreadore en cm<sup>2</sup>.....52

**Figura 26. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores y su cinética de crecimiento, en la condición de  $4 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 6.09 y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores y 50rpm de agitación inicial. A)** Representación del crecimiento de las PVs en la superficie de microacarreadores, evaluando distintas densidades de estos. **B)** Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 192h de cultivo, con relación a distintas densidades de microacarreadores en cm<sup>2</sup>.....53

**Figura 27. Micrografías de CPEs unidas a microacarreadores y su cinética de crecimiento, en la condición de  $3 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 6.09 y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores y 50rpm de agitación inicial. A)** Representación del crecimiento de las PVs en la superficie de microacarreadores, evaluando distintas densidades de estos. **B)** Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 192h de cultivo, con relación a distintas densidades de microacarreadores en cm<sup>2</sup>.....54

**Figura 28. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores y su cinética de crecimiento, en la condición de  $1 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 6.09 y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores y 50rpm de agitación inicial. A)** Representación del crecimiento de las PVs en la superficie de microacarreadores, evaluando distintas densidades de estos. **B)** Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 192h de cultivo, con relación a distintas densidades de microacarreadores en cm<sup>2</sup>.....56

**Figura 29. Porcentaje de microacarreadores con células y número de células en fase de crecimiento máximo. A)** Cantidad de microacarreadores en porcentaje (%), que presentaron al menos una célula adherida a su superficie, posterior a la etapa de adhesión inicial; **B)** Número de células totales en fase estacionaria de la cinética de crecimiento, con relación a las distintas densidades celulares empleadas.....57

**Figura 30. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores en agitación constante y su cinética de proliferación, en la condición de  $5 \times 10^4$  células·6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores·mililitro<sup>-1</sup>, a 120 rpm. A)** Representación del crecimiento de los PVs en la superficie de microacarreadores, en cultivo en suspensión a 120 RPM. **B)** Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 168h de cultivo, con relación a la condición de agitación...59

**Figura 31. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores en agitación constante y su cinética de crecimiento, en la condición de  $5 \times 10^4$  células·6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores·mililitro<sup>-1</sup>, a 100 rpm. A)** Representación del crecimiento de PVs en la superficie de microacarreadores, en cultivo en suspensión a 100 RPM. **B)** Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 168h de cultivo, con relación a la condición de agitación...60

**Figura 32. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores en agitación constante y su cinética de crecimiento, en la condición de  $7 \times 10^4$  células·6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores·mililitro<sup>-1</sup>, a 100 rpm A)** Representación del crecimiento de PVs en la superficie de microacarreadores, en cultivo en suspensión a 100 RPM. **B)** Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 168h de cultivo, con relación a la condición de agitación...61

**Figura 33. Micrografías de las PVs recuperadas del cultivo en suspensión a 100 rpm, identificadas por inmunocitoquímica.** Co-expresión de CD133-Alexa Fluor 488 (verde), como marcador de troncalidad y marcadores de linaje endotelial como PECAM-1, KDR, VE-CAD y Vwf TRITC- TRICT (rojo). Escala representa 50 μm.....62

**Figura 34. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores en agitación constante, su cinética de proliferación, en la condición de  $7 \times 10^4$  células  $\cdot 6.75 \text{ cm}^2$  de microacarreadores  $\cdot \text{mililitro}^{-1}$ , a 80 rpm, y células recuperadas post agitación** **A)** Representación de la proliferación de PVs en la superficie de microacarreadores, en cultivo en suspensión a 80 RPM. **B)** Micrografías de células re-cultivadas en monocapa posterior al cultivo en suspensión, escala representa 100  $\mu\text{m}$  (4x) y 50  $\mu\text{m}$  (10x). **C)** Se representa la proliferación de células  $\cdot \text{microacarreador}^{-1}$  (eje vertical izquierdo  $\leftarrow$ ) y células  $\cdot \text{cm}^2$  de microacarreadores  $^{-1}$  (eje vertical derecho  $\rightarrow$ ), a lo largo de 168h de cultivo, con relación a la condición de agitación...64

**Figura 35. Micrografías de las PVs recuperadas del cultivo en suspensión a 80 rpm, identificadas por inmunocitoquímica.** Co-expresión de CD133-Alexa Flúor 488 (verde), como marcador de troncalidad y marcadores de linaje endotelial como PECAM-1, KDR, VE-CAD y VWf TRITC- TRICT (rojo). Escala representa 50  $\mu\text{m}$ .....65

**Figura 36. Citometría de flujo de las PVs cultivadas en suspensión a 80 RPM.** Se representa el porcentaje de expresión para los marcadores CD133, KDR, CD31/PECAM-1 y VE-Cadherina, en comparación con el control.....66

**Figura 37. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores en agitación constante, cinética de crecimiento, en la condición de  $7 \times 10^4$  células  $\cdot 6.75 \text{ cm}^2$  de microacarreadores  $\cdot \text{mililitro}^{-1}$ , a 60 rpm, y células recuperadas post agitación.** **A)** Representación del crecimiento de PVs en la superficie de microacarreadores, sin cambio (SC) y con cambio de medio (CC). **B)** Número de células  $\cdot \text{microacarreador}^{-1}$  (eje vertical izquierdo  $\leftarrow$ ) y células  $\cdot \text{cm}^2$  de microacarreadores  $^{-1}$  (eje vertical derecho  $\rightarrow$ ), sin cambio (SC) y con cambio de medio (CC) a lo largo de 168h de cultivo. **C)** Células re-cultivadas en monocapa, escala representa 100  $\mu\text{m}$  (4X) y 50  $\mu\text{m}$  (10X).....68

**Figura 38. Citometría de flujo de las PVs cultivadas en suspensión a 60 RPM.** Se representa el porcentaje de expresión para los marcadores CD133, KDR, CD31/PECAM-1 y VE-Cadherina, en comparación con el control.....69

**Figura 39. Micrografías de las PVs recuperadas del cultivo en suspensión a 60 rpm, identificadas por inmunocitoquímica.** Co-expresión de CD133-Alexa Flúor 488 (verde), como marcador de troncalidad y marcadores de linaje endotelial como PECAM-1, KDR, VE-CAD y VWf TRITC- TRICT (rojo). Escala representa 50  $\mu\text{m}$ .....70

**Figura 40. Formación de microvasculatura a partir de PVs recuperadas del cultivo en suspensión a 60 RPM.** Proceso de generación de estructuras microvasculares a partir de PVs re-cultivadas en monocapa, durante 30 días, escala representa 100  $\mu\text{m}$  (4X) y 50  $\mu\text{m}$  (10X)....71

**Figura 41. Micrografías PVs diferenciadas en monocapa, recuperadas del cultivo en suspensión a 60 RPM, identificadas por inmunocitoquímica.** Co-expresión de Faloidina-FITC (verde) y el factor de Von Willebrand- TRITC (rojo), resaltando los núcleos celulares con DAPI (azul) en estructuras microvasculares, posterior a un proceso de diferenciación por 30 días.....72



## Resumen

**Introducción:** Las Células Progenitoras Vasculares (PVs), derivadas de médula ósea, se encuentran en baja proporción en sangre periférica (SP) (0.001-2%). Algunas moléculas de superficie identificación son: CD133, VEGF-R2, PECAM-1 y VE- Caderina principalmente. Las PVs de SP, pueden ser empleadas en protocolos de terapia celular y medicina regenerativa, para reparación tisular, por lo que es necesario encontrar un método de expansión óptimo. El objetivo de este trabajo fue demostrar la factibilidad de expandir las PVs de SP humana, en un sistema de cultivo en suspensión.

**Materiales y métodos:** Posterior al aislamiento de células mononucleares y generación de progenitores endoteliales (adaptado de Fuschs y cols., 2006), se realizó una expansión en monocapa, para su posterior cultivo en suspensión. Se evaluaron distintas densidades celulares, en agitación: 120 RPM ( $5 \times 10^4$  células·mL<sup>-1</sup> y  $7 \times 10^4$  células·mL<sup>-1</sup>), 100, 80 y 60 RPM ( $7 \times 10^4$  células·mL<sup>-1</sup>).

**Resultados:** La condición de agitación a 60 RPM, resultó la condición óptima, obteniendo desde 322,717 células·mL<sup>-1</sup>, hasta 403,204 células·mL<sup>-1</sup>, con renovación parcial de medio, representando un total de  $2.016 \times 10^6$  células por matraz Erlenmeyer de 25mL, a 10% de su capacidad.

Las PVs recuperadas se caracterizaron por citometría de flujo e inmunocitoquímica, células CD133<sup>+</sup>(80.37%), VEGF-R2<sup>+</sup>(80.77%), PECAM-1<sup>+</sup>(80.02%) y VE- CADERINA<sup>+</sup>(78.30%), que lograron formar estructuras microvasculares, posterior a 30 días de cultivo en monocapa, positivas para el marcador del Vwf.

**Conclusión:** Fue posible realizar un cultivo de PVs en suspensión, conservando su estado progenitor, con alta capacidad de proliferación, resultando este sistema más factible y eficiente que el cultivo en monocapa, preservando su capacidad de formación de microvasculatura *in vitro*.

## Abstract

**Introduction:** The Vascular Progenitor Cells (VPCs), bone marrow derived, are found in a low proportion in peripheral blood (PB) (0.001-2%) (Flamme *et al.*, 1997). Some proteins used for their detection are: CD133, VEGF-R2, PECAM-1 y VE- Cadherin principally (Asahara *et al.*, 1997; Peichev *et al.*, 2000; Reyes *et al.*, 2002).

The VPCs, could be employed in cell therapy and regenerative medicine protocols, for the tissue reparation, for that is very important find to optimal expansion method (Asahara *et al.*, 1997; Drake., 2003). The objective of this work was expanding the VPCs of human PB, in a culture system of suspension. **Materials and methods:** After the isolation of mononuclear cells and the vascular progenitors generation (Fuschs *et al.*, 2006), it was made a monolayer expansion, for the suspension culture. Were evaluated different cell densities in agitation: 120 RPM ( $5 \times 10^4$  células·mL<sup>-1</sup> y  $7 \times 10^4$  células·mL<sup>-1</sup>), 100, 80 y 60 RPM ( $7 \times 10^4$  células·mL<sup>-1</sup>). **Results:** The agitation condition of 60RPM, resulted the optimal condition, getting since 322, 717 células·mL<sup>-1</sup>, to 403,204 células·mL<sup>-1</sup>, with partial renovation of culture medium, representing an amount of 2,016,020 cells by 25ml Erlenmeyer, at 10% of its capacity.

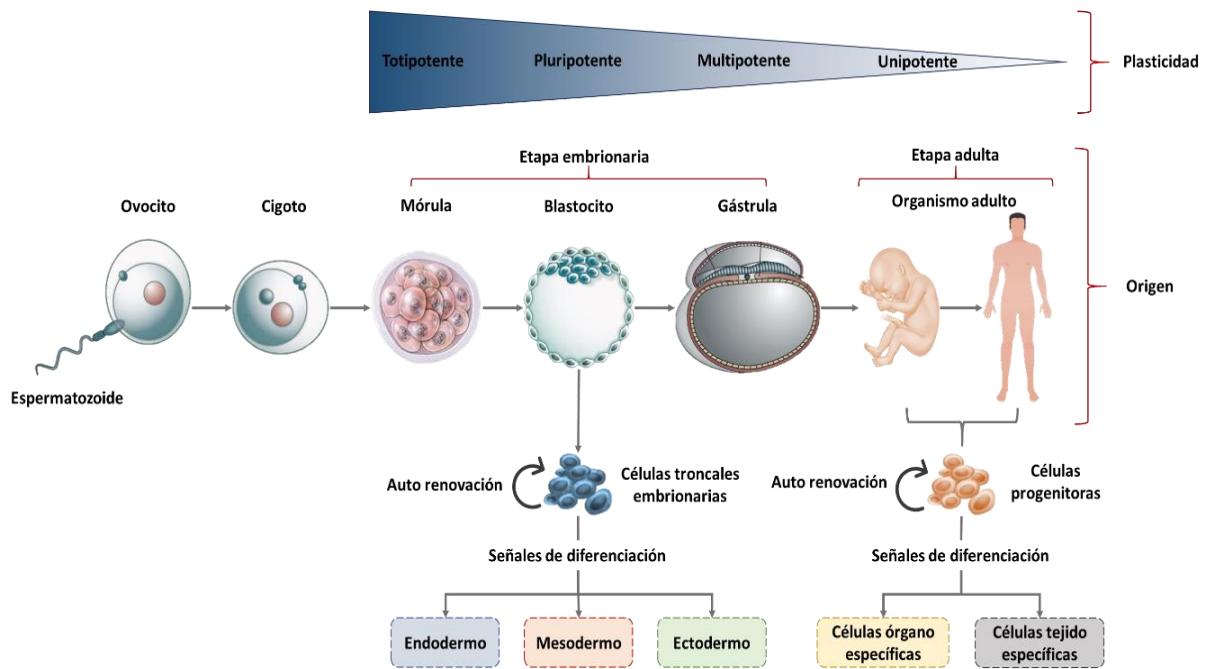
The obtained cells, were characterized by flow cytometry and immunocytochemistry, finding CD133<sup>+</sup> cells (80.37%), VEGF-R2<sup>+</sup> cells (80.77%), PECAM-1<sup>+</sup> cells (80.02%) and VE-CADHERIN<sup>+</sup> cells (78.30%), which former microvascular structures, after the 30 days of culture in monolayer, and were vWF<sup>+</sup>. **Conclusion:** It is possible perform a PVs suspension culture, conserving its progenitor state, with high proliferation capacity, resulting this system more feasible and efficient than the monolayer culture.

# 1. Introducción

## 1.1 Células troncales y células progenitoras

Se puede definir como una célula troncal o *stem cell*, a una célula que tiene la capacidad de auto renovarse por mitosis, además de diferenciarse en uno o diversos tipos de células especializadas, que constituirán o formarán distintos órganos y tejidos.

Las células troncales se pueden clasificar de acuerdo con su plasticidad (capacidad de diferenciación) y su origen, como se muestra en la Figura 1.



**Figura 1. Clasificación de las células troncales de acuerdo con su origen y plasticidad o potencial de diferenciación.** En la etapa embrionaria, las células totipotentes, formarán un individuo completo, mientras que las células pluripotentes y multipotentes formarán cualquier tejido de las tres capas embrionarias; en etapa adulta, las células unipotentes o progenitoras, darán lugar a células órgano y tejido específicas. Modificado de Ho, L. &

En el embrión, la formación de vasos sanguíneos comienza con la agrupación de progenitores mesodermales, también llamados hemangioblastos, seguido de la diferenciación en angioblastos y células troncales hematopoyéticas (CTHs); éstos conglomerados celulares son denominados islotes sanguíneos, conteniendo CTHs en el centro y rodeadas de angioblastos en la periferia. En éste punto del desarrollo embrionario, así como durante toda la vida es importante que estén presentes distintos tipos de factores de crecimiento, como el Factor de Crecimiento Vascular Endotelial-2 o VEGF-2 (VEGF-2 del inglés "*Vascular Endothelial Growth Factor*"), el Factor de Crecimiento Fibroblástico o FGF (Del inglés "*Fibroblastic Growth Factor*") y angiopoyetinas, que son liberados por angioblastos y las CTHs, que son esenciales para el desarrollo vascular (Lyden y cols., 2001; Sakurai y cols., 2006). En el embrión, la fusión y conexión de múltiples islotes sanguíneos generará el plexo capilar primario o redes de vasos sanguíneos primarios, el proceso consecuente se encargará de remodelar el plexo vascular y la generación del lecho arterial y venoso, denominando a estos procesos vasculogénesis y angiogénesis embrionarias (Patel- Het y D'Amore., 2011). Inicialmente se consideraba que el proceso de generación de un precursor endotelial a partir de una célula troncal sólo ocurría durante la embriogénesis, a través de la diferenciación del mesodermo, sin embargo, actualmente se sabe que un proceso muy similar ocurre en el organismo adulto, a partir de progenitores residentes en médula ósea, los cuales son reclutados en sangre periférica y que en respuesta a alguna enfermedad o patología, su proporción en SP, se puede ver aumentada (Drake., 2003)

En el organismo adulto, además de la médula ósea, ya se han encontrado otros tejidos con PVs residentes, como el músculo esquelético, el parénquima vascular y en menor proporción en la sangre del cordón umbilical (originarios del hígado fetal) y en sangre periférica adulta (originarias de la médula ósea) (Asahara y cols., 1997; Murohara y cols., 2000), sin embargo se ha descrito que estas células progenitoras derivan de otro tipo de célula troncal, denominada célula troncal hematopoyética (CTH) o hemangioblasto.

## **1.2 Nicho de las células troncales hematopoyéticas en la médula ósea**

Se ha hipotetizado que los distintos microambientes existentes en la médula ósea (MO) se encargan de mantener una organización y regionalización celular bien definida, por lo que las interacciones entre los distintos tipos celulares, como los hemangioblastos o CTHs (células troncales hematopoyéticas) y otras células de soporte, se encargan de regular de forma paracrina su supervivencia, auto-renovación y diferenciación (Kiel & Morrison., 2006; Wang y cols., 2013). La MO posee una arquitectura homogénea, rica en fibronectina, distintos tipos de colágenos y proteoglicanos, sin embargo, la MO se encuentra desprovista de particiones con estructura específica, por lo que la ésta organiza en microambientes regionalizados, denominados nichos endosteal y vascular (Askmyr y cols., 2009; Mikkola., 2006). Ambos representan una fuente fundamental de señales que mantienen y regulan la actividad de las CTHs a lo largo de toda la vida, por lo que mientras que éstas se mantienen quiescentes en el nicho endosteal, el nicho vascular puede regular su proliferación, diferenciación y movilización; sin embargo otros factores externos como distintos mediadores químicos y la matriz extracelular juegan un papel muy importante en el destino de éstas células troncales (Lin., 2002; Li & Xie., 2005; Morrison & Spranding., 2008; Yoon y cols., 2012).

### **1.2.1 Nicho Endostial**

El nicho endostial se localiza en la superficie interna de la cubierta ósea, en particular cerca de la superficie endocortical y trabecular (Lord y cols., 1975 Askmyr y cols., 2009) (Figura 2). El endosteo es una estructura que se interpone entre el hueso la medula ósea; está compuesto principalmente por osteoblastos, osteoclastos y otras células incluidos los fibroblastos, macrófagos, células endoteliales y adipocitos; todos estos tipos celulares, se encargan de conformar el nicho en donde se encuentran las CTHs, sin embargo, las células osteoblásticas, juegan un papel mucho más importante (Calvi y cols., 2003).

Dos tipos de células osteoblásticas componen el endostio, los osteoblastos productores de hueso y un tipo de osteoblastos tempranos, con morfología alargada, que se caracterizan por expresar N-caderina y ser CD45<sup>+</sup>, denominados SNO (*Del inglés spindle-shaped N-*

*cadherin<sup>+</sup>CD45<sup>-</sup> osteoblastic cells*) (Hauge y cols., 2001). Las interacciones entre las SNO y las CTHs son críticas para el mantenimiento de la troncalidad de estas últimas. La expresión de N-caderina en las CTHs contribuye al mantenimiento de su estado quiescente, principalmente por que controla su unión a la superficie endosteal (Arai y cols., 2012; Hosokawa y cols., 2010); sin embargo, se sabe que N-caderina en SNO no es requerida para el mantenimiento de las CTHs (Greenbaum y cols., 2012).

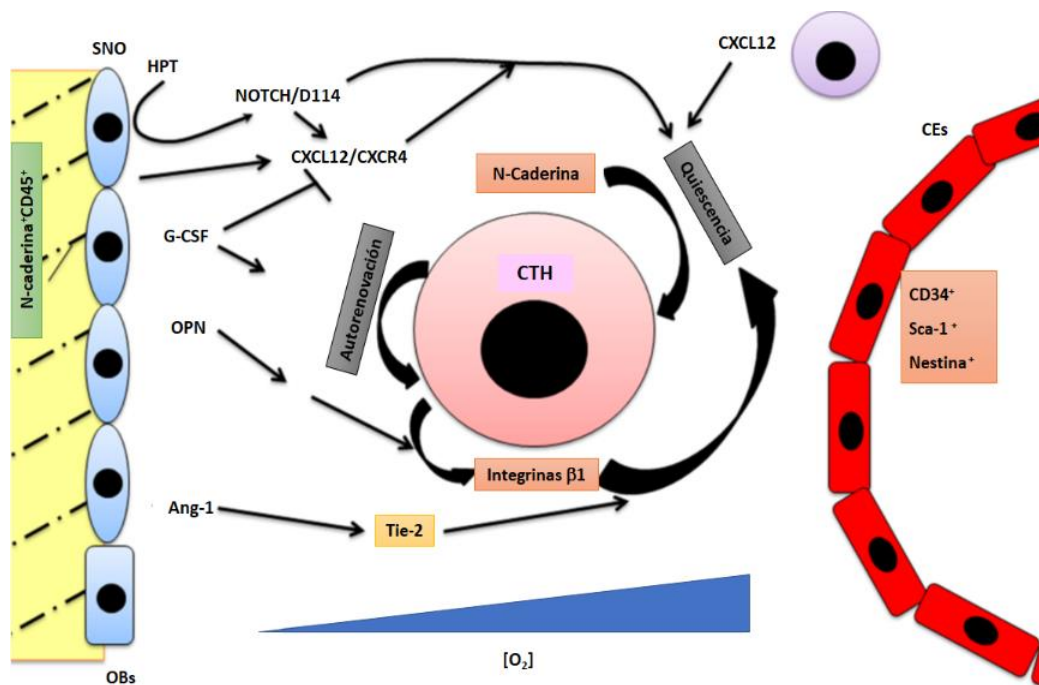
Otras moléculas de superficie de osteoblastos y hemangioblastos están involucradas en la regulación de estos últimos, como el receptor de la angiopoyetina-2 (Tie-2), mientras que la propia angiopoyetina-1 es producida en la misma MO por otras células de soporte, e induce la adhesión de los hemangioblastos al endostio, preservando su fenotipo inmaduro, además de promover su supervivencia y funcionar como antioxidante (Suda y cols., 2005; Arai y cols., 2005).

Otro aspecto que refleja la gran importancia de las células osteoblásticas en el mantenimiento de las CTHs, es que cuando estas células mueren la MO pierde su capacidad de hematopoyesis, por lo que este evento aumenta en otros sitios extramedulares, como el hígado y el bazo (Zhang y cols., 2003). El oxígeno juega un papel importante en la localización, así como en la función de las CTHs a lo largo de la región endostial, pues se ha observado que éstas se encuentran de manera predominante en zonas hipóxicas (Parmar y cols., 2007).

Existe una relación entre la vía Notch y el factor derivado de células estromales-1 o CXCL12, una citocina de bajo peso molecular, con una alta capacidad quimio atrayente y que se une al receptor de citocinas CXC tipo 4 (CXCR4). CXCL12 o SDF-1 (Del inglés "*The stromal cell derived factor 1*") es producido constitutivamente por células estromales y de soporte, (que se describirán adelante) y en su unión a CXCR4, SDF-1 regula la movilización de las CTHs en la MO así como su adhesión, supervivencia y ciclo celular (Pelus y cols., 2002; Nervi y cols., 2006; Xie y cols., 2013). Finalmente, la expresión de CXCL12 es regulada negativamente por el factor estimulante de colonias de granulocitos o G-CSF (Del inglés "*Granulocyte- colony stimulating factor*") y por lo tanto la función de CXCR4 en las CTHs se inactiva (Ogawa., 1993). El factor de células troncales o SCF (Del inglés "*Stem cell factor*") en su unión a c-kit estimula la proliferación y diferenciación de las CTHs, el cuál es altamente expresado en CTHs quiescentes en la MO adulta; por lo que se ha demostrado

que si la expresión del SCF disminuye el número de CTHs también (Ogawa., 1993; Ikuta & Weissman., 1992).

Por otra parte, distintas moléculas de la matriz extracelular se relacionan con la regulación de las CTHs, tal es el caso de la osteopontina, la cual es producida en el hueso y otros sitios extraóseos, esta promueve la quiescencia y funciona como una molécula quimio atrayente para las CTHs a lo largo de toda la región endostial (Standal y cols., 2004; Nilsson., 2005). El proceso anterior está relacionado con las integrinas  $\beta 1$  expresadas en las CTHs, más específicamente las integrinas  $\alpha 4\beta 1$  y  $\alpha 9\beta 1$ , que están asociadas con la retención de estas células troncales en regiones específicas del nicho endosteal, lo anterior se sabe de acuerdo a que al emplear antagonistas de éstas moléculas, ocurre una rápida movilización de las CTHs hacia sangre periférica, (Papayannopoulou y cols., 1995; Vermeulen y cols., 1998; Nilsson., 2005; Cao y cols., 2016).



**Figura 2. El nicho endosteal como una estructura compleja.** El nicho endosteal se encuentra compuesto por células troncales, células progenitoras, factores de crecimiento y una matriz extracelular, todos estos elementos participan en la hematopoyesis y el mantenimiento de las CTHs. Modificado de Tmma & Ribatti., 2017.

Se encuentra claro que la regulación endosteal de las CTHs, está liderada por distintas moléculas secretadas por células adyacentes, la matriz extracelular y la tensión de oxígeno, sin embargo, las señales provenientes del nicho vascular son de vital importancia para la auto-renovación, mantenimiento y reclutamiento o movilización de las CTHs.

### **1.2.2 Nicho Vascular**

Los vasos sanguíneos en la MO no sólo constituyen la pared que separa el compartimiento hematopoyético de la circulación periférica, estos tienen la función de regular la hematopoyesis, así como la movilización de las células troncales y el reclutamiento de las CTHs, como se mencionó anteriormente (Figura 3). La MO se puede dividir en los compartimentos parenquimal y estromal de manera hipotética. El parenquimal incluye distintas células inmaduras y precursores sanguíneos, en contacto directo con capilares sinusoides CD34<sup>+</sup>, Nestin<sup>-</sup> y Sca<sup>-</sup> (Fliedner y cols., 2002; Kusumbe y cols., 2016).

Los sinusoides, se encuentran distribuidos de forma radial a lo largo de toda la MO, y la hematopoyesis ocurre en los espacios entre éstos sinusoides (Kopp y cols., 2009; Nagasawa., 2006). Los senos del sinusoide en la región medular, están forrados con células endoteliales y rodeados por pequeña población de células adventicias, las cuáles se caracterizan por poseer una alta expresión de CXCL12, denominadas células reticulares con CXCL12 abundante o CAR (Del inglés "*CXCL12- abundant reticular cell*") (Sugiyama y cols., 2006). Las células CAR son un componente crucial para el nicho vascular de las CTHs, además de otro tipo de células estromales, incluyendo las células troncales mesenquimales y en conjunto forman una red reticular que le da soporte a la formación y mantenimiento de las CTHs (Benayahu y cols., 2007). Es importante que las CTHs se encuentren cerca de las células endoteliales sinusoidales, pues están involucradas en su maduración, además de la de otros tipos celulares, como los megacariocitos (Avecilla y cols., 2003; Hur y cols., 2004). El factor de crecimiento de fibroblastos o FGF (Del inglés "*Fibroblastic growth factor*") es considerado uno de los factores más importantes en la MO, pues éste actúa como mediador de la comunicación entre el nicho vascular y el endostial. Se piensa que el FGF forma un gradiente entre ambos nichos de la MO y por lo tanto es de suma importancia



para el reclutamiento de las CTHs y otros progenitores, gracias a que poseen una alta expresión de distintos receptores de el FGF (DeHaan y cols., 2003; Wright., 2001).

El factor de crecimiento transformante- $\beta$  o TGF- $\beta$  (Del inglés "*Transforming growth factor- $\beta$* "), regula la expresión de distintos receptores de citocinas como c-kit, FLT-3 y IL6R, todos implicados en el control y mantenimiento de las CTHs, además este factor está relacionado en la sobre regulación de inhibidores de ciclinas dependientes de cinasas o CDKs (Del inglés "*Cycline-dependent kinase*"), como p21 y p57, por lo que el TGF- $\beta$  regula negativamente el ciclo celular de las CTHs (Jacobsen y cols., 1992; Batard y cols., 2000; Scandura y cols., 2004). La proteína morfogenética de hueso o BMP (Del inglés "*Bone morphogenetic protein*") es un factor de crecimiento perteneciente a la superfamilia del TGF- $\beta$  (Chen y cols., 2004). Altas concentraciones de BMP-2 y 7 inhiben la proliferación, sin embargo, se ha encontrado que el BMP-4 en altas concentraciones tiene un efecto en la supervivencia y diferenciación celular (Bhatia y cols., 1999).

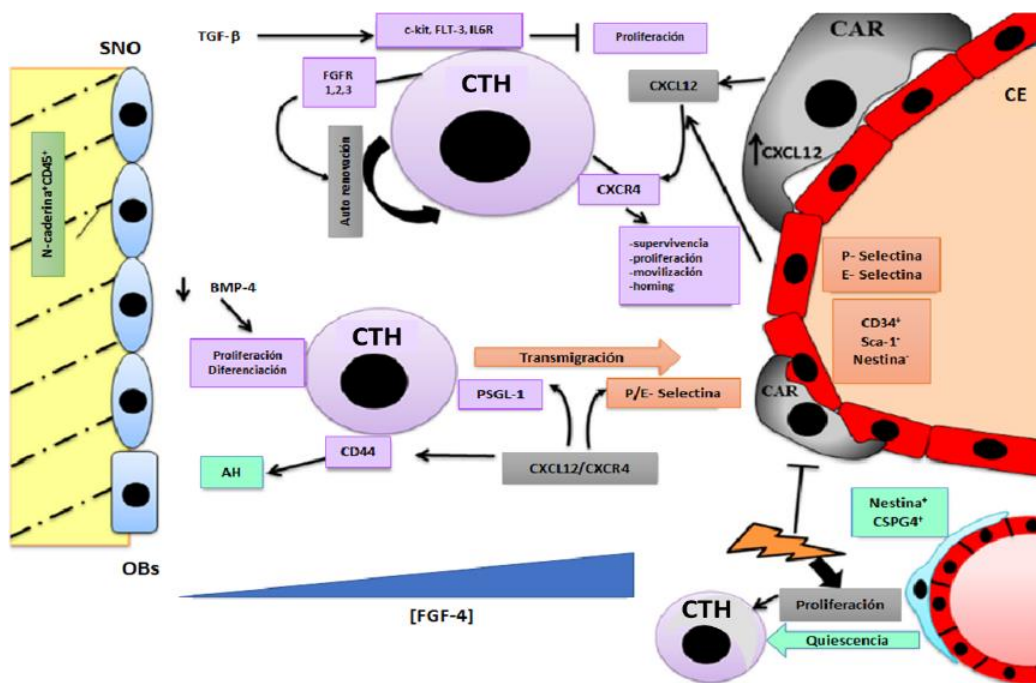
Al igual de las células CAR, las células endoteliales y estromales expresan CXCL12, por lo que las CTHs expresan su receptor CXCR4; es bien conocido que la unión ligando-receptor (CXCL12-CXCR4) es crucial para la supervivencia, proliferación y la regulación de la movilización y el homing de las CTHs. En respuesta a la señalización de CXCL12-CXCR4, las células endoteliales expresan P-selectina y E-selectina y las CTHs expresan el receptor PSGL-1 el cual interactúa con las selectinas endoteliales, regulando la trans migración de las CTHs (Katayama., 2003). Sin embargo, las CTHs y las células progenitoras expresan una isoforma pequeña de CD44, la cual está involucrada con la migración celular de una gran variedad de células normales y malignas (Naor y cols., 2002). Se ha demostrado que al inhibir la expresión de esta proteína, la migración celular desde la MO hacia la sangre periférica disminuye, sin embargo la hematopoyesis no siempre es inhibida (Charrad y cols., 1999; Gadhoom y cols., 2004).

El ácido hialurónico (AH) es sintetizado por CTHs y participa en su migración al nicho endostial en un trasplante; él AH es expresado en la MO, en el endotelio sinusoidal y en endostio, donde CXCL12 es altamente expresado y estimula la adhesión de los progenitores al AH (Nilsson., 2002; Avigdor y cols., 2004); haciendo énfasis en los elementos mencionados anteriormente, CD44, HA y CXCL12 regulan la migración

transendotelial de las CTHs y los progenitores, en un proceso de movilización hacia SP (Willert y cols., 2003).

Otro tipo de vasos sanguíneos involucrados con el nicho de las CTHs, consiste en un tipo de arteriolas estructuralmente diferentes de la sinusoides, las cuales se encargan de mantener un balance entre la quiescencia y la proliferación de las células troncales y progenitores. En esta vasculatura se han encontrado poblaciones celulares individuales que expresan un perfil de Nestina<sup>+</sup> y condroitin sulfato-4<sup>+</sup>, distinto al de las células CAR (Kunisaki y cols., 2013).

Todo lo mencionado anteriormente muestra la importancia del nicho vascular en la regulación de la hematopoyesis y en el soporte de la auto-renovación de las CTHs así como de la comunicación entre ambos nichos de la MO, involucrados en el destino de las CTHs.



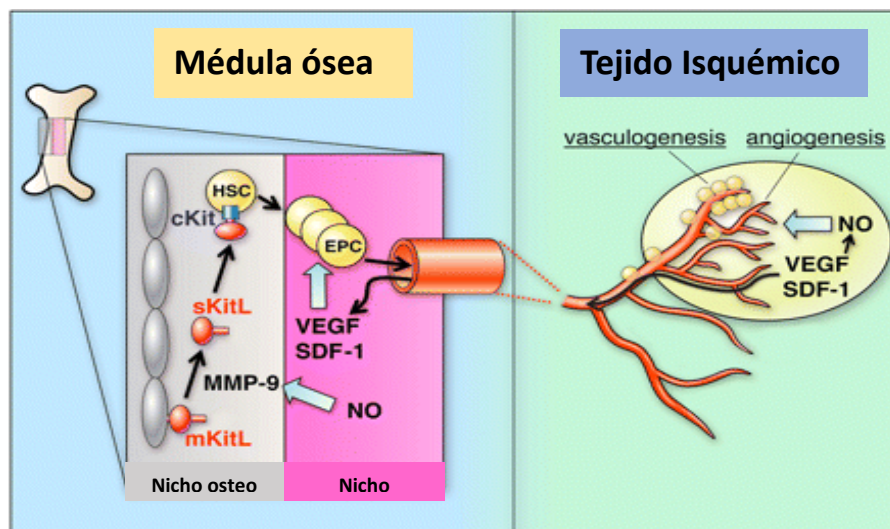
**Figura 3. Nicho vascular.** La hematopoyesis ocurre en los espacios inter sinusoidales y está mediada por distintas señales provenientes tanto del nicho endosteal y de los vasos sanguíneos, además de todos los tipos celulares adventiciales. Modificado de Tmma & Ribatti., 2017.

### **1.3 Movilización de las células troncales hematopoyéticas desde la médula ósea hacia sangre periférica**

La distribución de las CTHs en la MO es organizada, entre el endostio y las regiones en contacto directo con los vasos sanguíneos (nicho endostial y vascular). Esta localización responde a procesos dinámicos donde las células troncales pueden moverse del nicho endostial al nicho vascular en un evento de diferenciación y movilización a la sangre periférica (Nervi y cols., 2006) (Figura 4). La microvasculatura de la MO, funciona como una barrera entre el parénquima y la circulación periférica, por lo que en condiciones normales ésta regula el paso de un número pequeño de CTHs circulantes, sin embargo éste se puede ver aumentado en respuesta al daño físico de un tejido o una isquemia (Nervi y cols., 2006; Gill y cols., 2001). Los eventos anteriores, son regulados por un gradiente de citocinas, además de enzimas proteolíticas que participan en el corte de proteínas específicas que mantienen ancladas a las CTHs a la matriz estromal (Heissig y cols., 2002; Seandel y cols., 2008). Se reconocen distintas proteasas que influyen en la liberación de las CTHs de su nicho, como la neutrofil-elastasa, la catepsina G y distintas metaloproteinasas de matriz (MMPs) y su activación y síntesis está relacionada con el aumento en la concentración de distintos factores y citocinas como el óxido nítrico (ON), el VEGF y el G-CSF (McQuibban y cols., 2001; Heissig y cols., 2002; Lapidot & Petit., 2002). El VEGF es un factor de crecimiento específico, sintetizado principalmente por el endotelio vascular y está relacionado principalmente con eventos de formación de nuevos vasos sanguíneos en la reparación de tejidos dañados o incluso en presencia de cáncer (Ferrara., 2004). Se sabe que el VEGF es el principal mediador de la proliferación, diferenciación y la quimiotaxis de las células endoteliales, por lo que se ha reportado que un incremento en la concentración de VEGF circulante, aumenta el reclutamiento de las CTHs promoviendo la neovascularización (Asahara y cols., 1999; Kalka y cols., 2000; Ferrara., 2004). La manera en que el VEGF influye en la movilización de las CTHs es a través del óxido nítrico, esto mediante la vía de señalización PI3K/Akt/eNOS, la cual regula la producción de la óxido nítrico sintasa endotelial o eNOS (Del inglés "*Endothelial nitric oxide synthase*"), la cual se encarga de la síntesis el óxido nítrico en el endotelio (Aicher y cols., 2003; Karar & Maity., 2011). Se conoce que otros factores también regulan la producción de ON y la liberación de las CTHs desde la MO a través de la vía de señalización mencionada, como el G-CSF

(conocido como filgrastim) e incluso el EGF, IGF y FGF entre otros (Molineux y cols., 1999; Fontaine y cols., 2006; Karar & Maity., 2011).

Las MMPs o metaloproteinasas de matriz extracelular, más en específico la MMP9, MMP8 y MMP2 se encuentran ancladas a la matriz de la MO en una forma precursora inactiva (proMPPs), sin embargo, tanto su activación como su expresión es controlada por un gradiente de concentración de óxido nítrico (McQuibban y cols., 2001; Heissig y cols., 2002; Aicher y cols., 2003; Steinl y cols., 2013). El ON realiza una reacción de S-nitrosilación en las proMMPs, eventualmente estas proteasas pasan a su forma activa liberándose de la matriz, a consecuencia de esto, estas enzimas, realiza el corte de una proteína de membrana de las células estromales, m-kitL; eventualmente esta molecula pasa a una forma soluble denominada s-kit o el ya mencionado SCF (Heissig y cols., 2002; Aicher y cols., 2003; Fazel y cols., 2008; Sullivan y cols., 2014). S-kit o SCF se une a su receptor c-kit en las CTHs, ocurriendo un desacoplamiento de las integrinas que mantienen a estas células asociadas a las células estromales en el nicho vascular, eventualmente distintas señales parácrinas, lideradas por el propio VEGF y ON, dirigirán la translocación de las CTHs a la circulación periférica (Kalka y cols., 2000; Levesque y cols., 2003; Balligrand y cols., 2007; Fazel y cols., 2008).

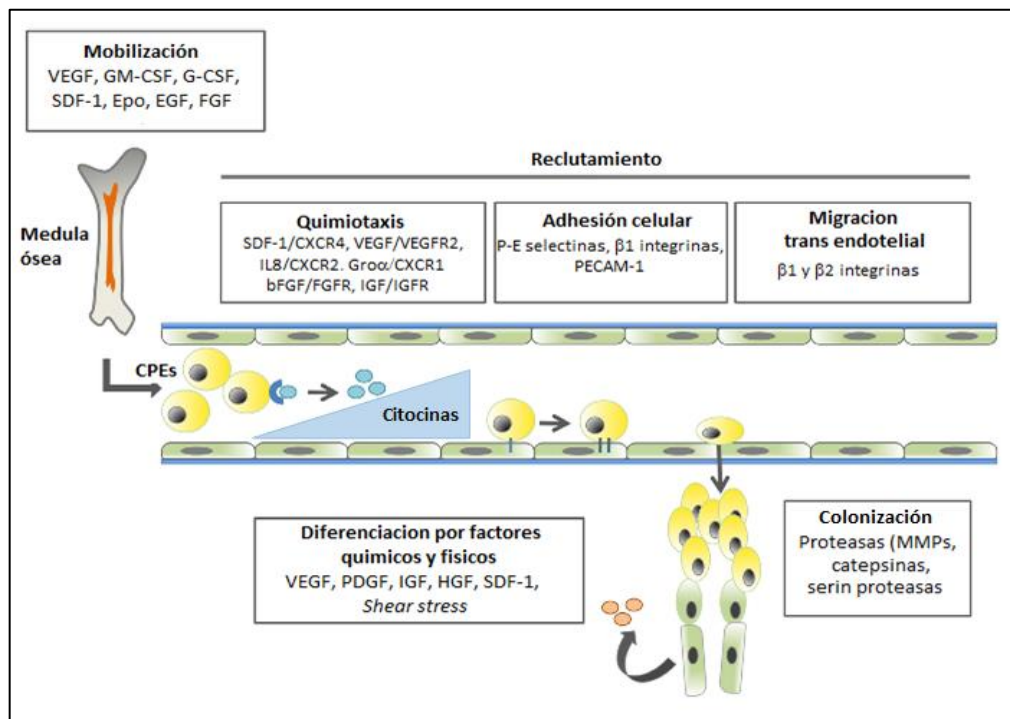


**Figura 4. Quimiotaxis para el reclutamiento de CTHs.** Modelo simplificado que esquematiza el proceso por el cual señales provenientes de la circulación periférica (lideradas principalmente por el VEGF y óxido nítrico), se encargan de movilizar a las CTHs (HSC) desde la médula ósea. Modificado de Balligrand y cols., 2007.

## 1.4 Migración y adhesión celular

Se reconoce que posterior al reclutamiento de las CTHs desde la médula ósea, como ya se describió anteriormente, distintas citocinas influyen en la migración celular a través de la circulación periférica, hasta la zona en donde se están produciendo estas citocinas en una alta concentración. Distintos estudios han demostrado que moléculas como SDF-1, VEGF, bFGF, IGF-1, IL6, IL8, Gro- $\alpha$  (Del inglés "*Growth regulated oncogene- $\alpha$* "), entre otras funcionan como agentes quimiotratayentes (Burger y cols., 2002; Yamaguchi y cols., 2003; Spring y cols., 2005; Kocher y cols., 2006; Flessner & Thum., 2008; Gowdak y cols., 2018) (Figura 5); y es que se considera que una vez que éstas moléculas se adhieren a los receptores de membrana de las CTHs, éstas se comprometen hacia un linaje endotelial, es decir como células progenitoras endoteliales o progenitoras vasculares, siendo este evento controlado por distintas vías de señalización como la vía del Akt, Notch y Wnt, que en eventos posteriores mediarán la expresión de distintas moléculas para la adhesión celular, la reorganización del esqueleto, la migración trans endotelial, la supervivencia celular, entre otras (Hur y cols., 2007; Takeshita y cols., 2007; Wallez y cols., 2007). Una vez en circulación, las ahora PVs deben de migrar a través de la membrana basal de los vasos sanguíneos y la matriz extracelular de las zonas intersticiales a través de un proceso denominado diapédesis, el cuál es un proceso que también realizan los leucocitos, por lo que se considera que el proceso de migración desde la MO de las PVs, es similar al de estos (Carman & Springer., 2004; Chavakis y cols., 2005). Se sabe que este proceso de trans migración endotelial está regulado por distintas moléculas de membrana, como la Glicoproteína ligando de P- selectina o PSGL.1 (Del ingles "*P-selectin glycoprotein lignd-1*") PECAM-1 (Del inglés "*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*") y V-CAM (Del inglés "*Vascular Cell Adhesion Molecule*"), las cuáles son expresadas en la superficie de las PVs e interactúan con P-selectina, E-selectina, la integrina  $\alpha 4\beta 1$  y la propia PECAM-1, estas últimas expresadas en el endotelio vascular (Berlin y cols., 1995; Henderson y cols., 2001; Luster y cols., 2005; Di Santo y cols., 2008). Posterior a la interacción inicial con las selectinas, integrinas de la familia  $\beta 1$  y  $\beta 2$ , se encargan de mediar la interacción de las PVs con las células endoteliales del endotelio vascular, pues estas integrinas son receptores de moléculas que componen la matriz extracelular, como fibronectina, fibrinógeno, laminina, osteopontina y vitronectina, entre otras (Chavakis y cols., 2007; Carmona y cols., 2008;

Bouvard y cols., 2010; Bauters y cols., 2018). Una vez que las PVs se han adherido a los sitios específicos a donde fueron reclutadas, estas necesitarán migrar a través de la monocapa endotelial, un siguiente paso es regulado por VEGF y el cual está controlado por la unión de integrinas  $\beta 2$  a ICAM-1 (Del inglés “*Intercellular Molecule Adhesión*”). El último paso posterior a la colonización de la zona blanco es la producción de distintas proteasas extracelulares, como metaloproteinasas, catepsinas, serin proteasas, uroquinasas entre otras (Huang y cols., 2009; Urbich y cols., 2005; Basire y cols., 2006); estas enzimas seran las encargadas de degradar y remodelar la matriz extracelular y que permitirá la re-endotelialización de los vasos sanguíneos. En la zona de re-endotelialización, distintos factores químicos (VEGF, SDF-1, HGF, PDGF-1, IGF-1, entre otros) y físicos (esfuerzo de corte o *shear stress*) influirán en la proliferación y maduración de las PVs, recién reclutadas (Urbich y cols., 2005; Obi y cols., 2012). Al proceso de invasión y generación de nuevos vasos sanguíneos a partir de células progenitoras endoteliales, se le ha denominado como vasculogénesis adulta, sin embargo, todo este mecanismo continúa en constante investigación.



**Figura 5. Proceso secuencial en el reclutamiento de las PVs.** La llegada de las PVs a su zona diana, requiere de una serie de pasos ordenados, desde su movilización desde la MO, el reclutamiento, colonización y diferenciación para la formación y remodelación del endotelio vascular. Modificado de Fusenig y cols., 2008.

## 1.5 Diferenciación de las progenitoras vasculares por *shear stress*

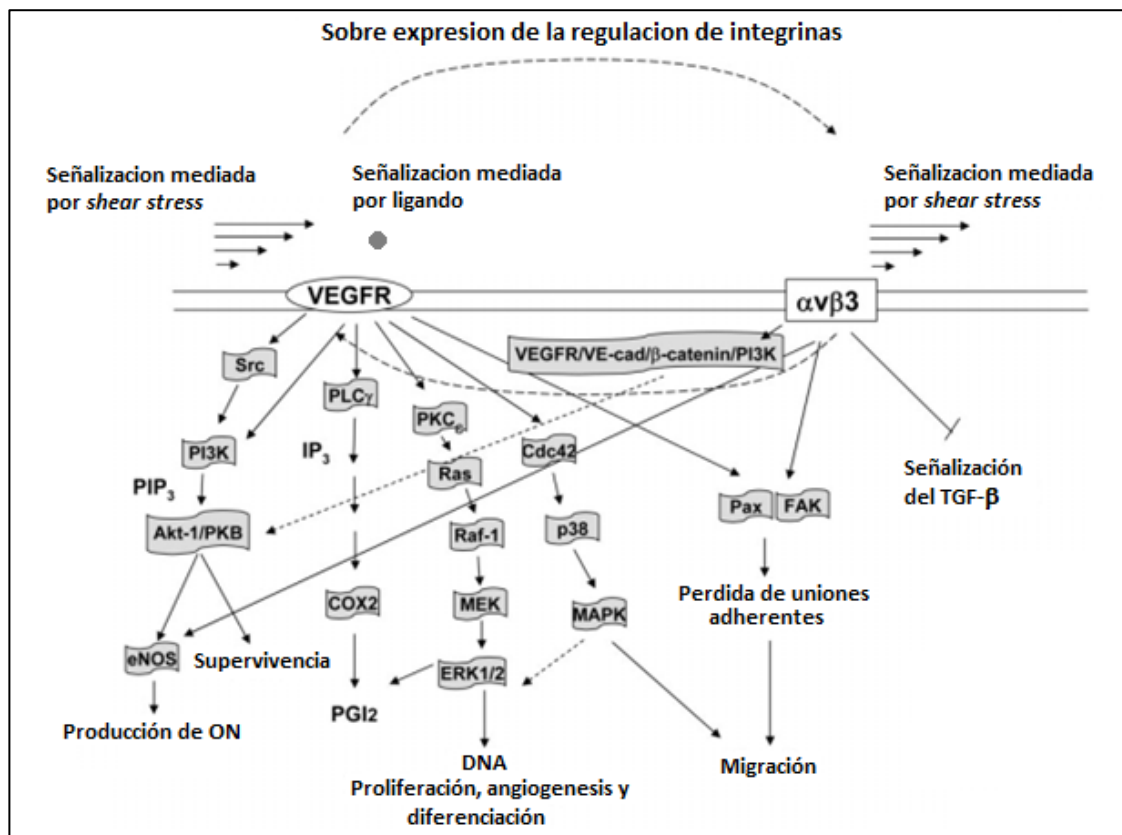
El esfuerzo de corte o *shear stress* es generado por el flujo constante de la sangre en los vasos sanguíneos y éste se encuentra en contacto directo con las células endoteliales, además de las células que se encuentran en la circulación sanguínea (Davis., 1995). La intensidad del esfuerzo de corte en los vasos sanguíneos se calcula con la siguiente fórmula  $\tau=4\mu Q/\pi r^3$ , en donde  $\tau$  representa el *shear stress*,  $\mu$  es la viscosidad de la sangre, Q es volumen del flujo sanguíneo,  $\pi$  es la relación entre la circunferencia de un círculo y su diámetro (el cuál es un valor constante 3.1416) y  $r$  es el radio del haz de la estructura vascular. Bajo condiciones fisiológicas el *shear stress* al que están sometidas las células endoteliales en distintos vasos sanguíneos, depende principalmente del diámetro de estos, por ejemplo, en una aorta humana los valores de *shear stress* son de 10-20 dinas·cm<sup>-1</sup>, mientras que en venas es de 1-6 dinas·cm<sup>-1</sup> (Kamira y cols., 1984). Este *shear stress* no solo actúa sobre las CEs de los vasos sanguíneos como ya se mencionó, sino que actúa también sobre las células que se encuentran en circulación, y aunque la intensidad de *shear stress* a la que están expuestas las PVs circulantes no es del todo conocida, sin embargo se asume que el nivel al que están sometidas es de aproximadamente 1 dinas·cm<sup>-1</sup>, en el momento que se encuentran migrando desde la MO hasta la zona diana, un *shear stress* bajo lo que permitiría que estas se encuentren en estado progenitor en la circulación sanguínea (Wang & Tarbell., 1995; Kroll y cols., 1996).

En distintos modelos *in vitro*, se ha demostrado que el *shear stress*, por si solo tiene un efecto en las PVs, tanto en su morfología, su capacidad de proliferación, la formación de estructuras vasculares, diferenciación y apoptosis (Yamamoto y cols., 2003; Ahman y cols., 2011; Obi y cols., 2012).

El hecho de que las PVs y CEs presenten cambios funcionales y morfológicos, regulados por la expresión de distintos genes, en respuesta al esfuerzo de corte, indica un mecanismo de transducción de señales intracelulares, liderado por un efecto físico (Figura 6). Se ha reportado que distintos receptores con actividad de tirosina cinasa, como el VEGFR2, Tie2 y  $\beta$ 1 integrinas se encargan de desencadenar diferentes vías de mecano transducción de señales en las PVs, activando distintos factores de señalización intracelular, incluyendo

PI3K/Akt, ERK1/2, JNK, JAK2, entre otras (Obi y cols., 2012; Yang y cols., 2012; Cheng y cols., 2013).

Estos factores al estar involucrados en vías de señalización, como VEGFR2/PI3K/Akt/Mtor, Tie2/PI3K/Akt/eNOS y la vía integrina b1/RAS/ERK12, influyen en mecanismos específicos que regulan la proliferación celular sin embargo dirigen principalmente la diferenciación de las PVs hacia CEs maduras o especializadas, reflejándose en el aumento de la expresión de distintos factores, una disminución en la proliferación y la formación de estructuras vasculares *in vitro* (Stolberg y McCloskey., 2009).



**Figura 6. Transducción de señales inducidas por *shear stress*.** Moléculas de la membrana celular que funcionan como mecanorreceptores, que, en respuesta al esfuerzo de corte, desencadenarán una vía de señalización, que controla distintos procesos, como proliferación, angiogénesis y diferenciación de las EPCs y CEs. Modificado de Stolberg & McCloskey., 2009.



## **1.6 Células progenitoras vasculares derivadas de sangre periférica humana**

Como ya se describió anteriormente, se le puede denominar Célula Progenitora Endotelial a células inmaduras presentes en sangre periférica y cordón umbilical y que derivan de la médula ósea (Burger & Touyz., 2012). Se ha identificado que la presencia de éstas en sangre periférica es muy extraña, representando del 0.01% al 0.0001%, de la porción mononuclear periférica, esto en condiciones normales, sin embargo, se ha observado que este porcentaje se ve aumentado en distintas patologías o enfermedades (Khan y cols., 2005).

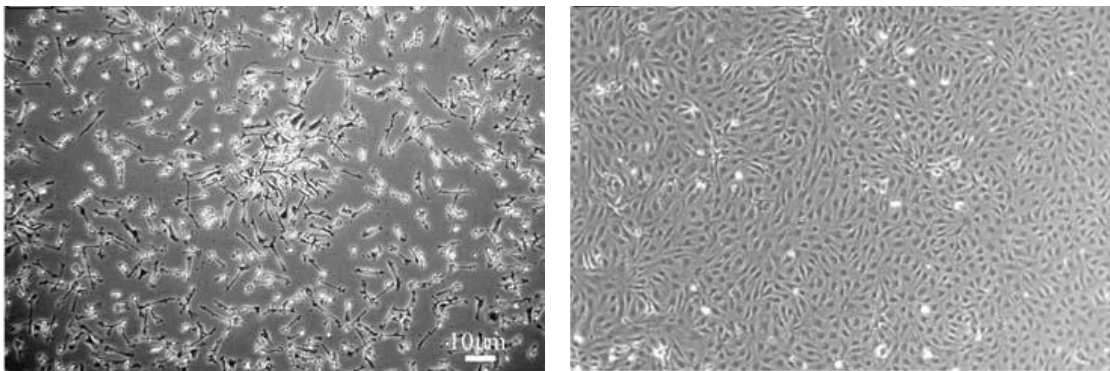
Asahara y colaboradores en 1997 fueron los primeros en clasificar como PVs a poblaciones de células adherentes CD34+, obtenidas de la fracción mononuclear de SP humana. En esos momentos se consideraba que la formación de angioblastos, es decir la formación de progenitores endoteliales o vasculares a partir de otro progenitor, ocurría exclusivamente en el desarrollo embrionario, sin embargo, este paradigma se modificó pues actualmente se sabe que las PVs de SP derivan de células residentes en médula ósea, de células troncales hematopoyéticas o hemangioblastos (Urbich & Dimmeler., 2004).

Actualmente se sabe que, a partir de la fracción mononuclear se pueden obtener dos tipos celulares distintos de linaje endotelial, las cuales aparecen en distintos tiempos de la derivación, las PVs tempranas, también conocidas como colonias formadoras de células endoteliales y las PVs tardías o células con crecimiento excrecente (Figura 7) (Calzi y cols., 2010). El método de derivación convencional consiste en que posterior a la obtención de la fracción mononuclear, estas células son cultivadas en un medio con factores de crecimiento específicos, como el factor de crecimiento vascular endotelial, factor de crecimiento epidermal, factor de crecimiento parecido a la insulina, ácido ascórbico, hidrocortisona, entre otros y una matriz extracelular específica como la fibronectina, colágeno tipo I, colágeno tipo IV, principalmente, lo cual facilita el crecimiento y la aparición de las células de linaje endotelial (Hristov y cols., 2003).

Las PVs tempranas, aparecen de entre los 3-6 días posterior al inicio del proceso de selección por medio de cultivo y se definen como células con morfología alargada en forma de huso, que se agrupan en colonias y una limitada capacidad de proliferación.

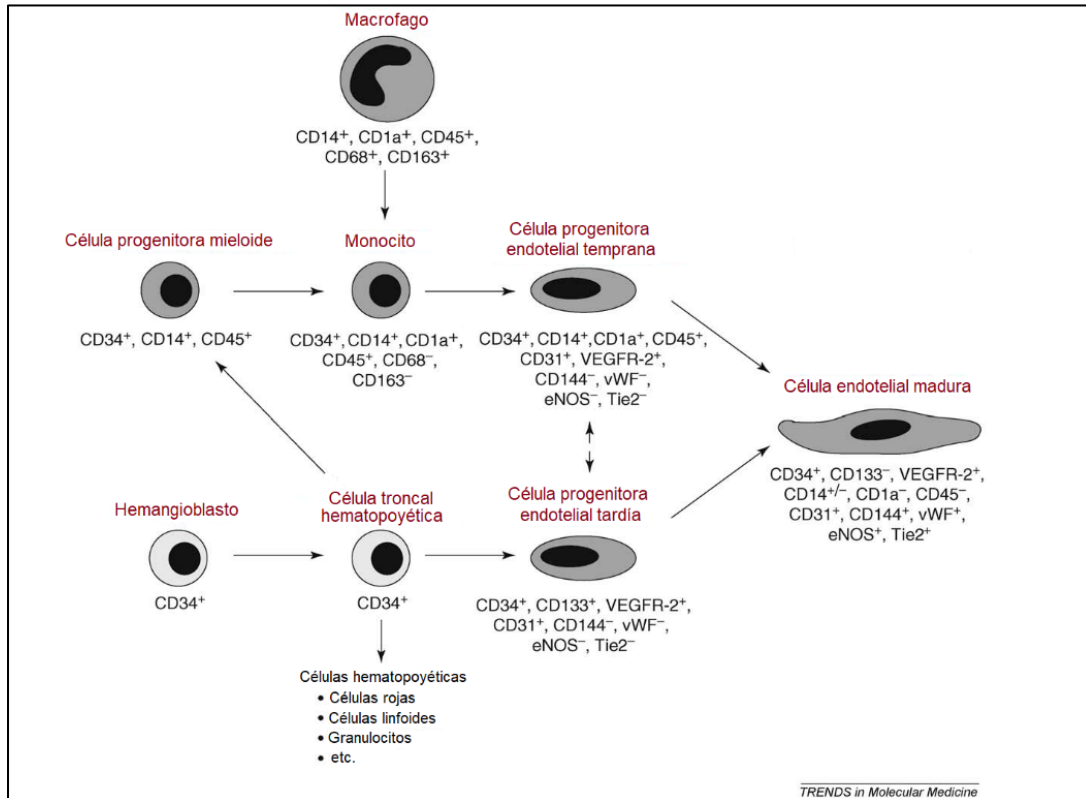
Las PVs tardías, aparecen de entre los 2-4 semanas posterior al inicio del proceso de selección por medio de cultivo y se definen como células con morfología en adoquín, que crecen en colonia y que poseen una robusta capacidad de proliferación, por lo que su cultivo puede durar de entre 8 y 13 pasajes (Fernandez y cols., 2000; Hur y cols., 2004; Calzi y cols., 2010;).

Aunque inicialmente las PVs se identificaron como células adherentes CD34+, eventualmente fue necesario buscar otros marcadores mucho más específicos, para delimitar molecularmente las diferencias entre los progenitores tempranos y tardíos. Ahora se sabe que las PVs tempranas, derivan de colonias monocíticas y expresan, como marcadores distintivos a CD14, CD1a y CD45, en contraste a las PVs tardías, las cuales expresan CD133 o Prominina-1, como marcador distintivo, el cual es expresado por otros tipos celulares también; se encuentra claro que la pérdida de la expresión de CD133 refleja la transformación de las PVs en células endoteliales maduras o especializadas. Los otros marcadores que comparten y que por supuesto les dan la clasificación de células endoteliales son el CD309 o VEGF-R2/KDR, CD31 o PECAM-1, CD144 o VE- Caderina (baja expresión) y vWF (baja expresión), la óxido nítrico sintasa (NO syntase), E- selectina (CD62E) entre otros (Figura 8) (Krenning y cols., 2009).



**Figura 7. Poblaciones de PVs derivadas de sangre periférica.** Microfotografías de EPCs tempranas (izquierda) y EPCs tardías (derecha) derivadas de sangre periférica humana. Tomado de Calzi y cols (2010).

Sin embargo, otro aspecto que se ha probado entre las PVs tempranas y tardías, es la capacidad de formar estructuras microvasculares *in vitro*, empleando distintas matrices extracelulares como matrigel, concluyendo que las PVs tardías son las que poseen especialmente esa capacidad, asemejándose mucho al tipo de estructuras que forman las células endoteliales de vena umbilical o HUVECs (Del inglés “*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*”) (Hur y cols., 2004).



**Figura 8. Origen y destino de las PVs.** Resumen esquemático del linaje de EPCs derivadas de sangre periférica, marcadores de superficie y su diferenciación. EPCs tempranas, se caracterizan por derivar de un linaje de células CD34<sup>+</sup>/CD14<sup>+</sup> mientras que las EPCs tardías se caracterizan por derivar de un linaje CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>. Tomado de Krenning y cols., 2009

## 1.7 Potencial terapéutico de las células progenitoras endoteliales

Distintos estudios, han sugerido que las PVs circulantes derivadas de medula ósea, juegan un papel de gran importancia en la regeneración de tejido vascular dañado (Shintani *y cols.*, 2001; Kong *y cols.*, 2004; Fujiyama *y cols.*, 2003; Werner *y cols.*, 2003). Se ha demostrado que el trasplante de PVs por si solo puede inducir a una formación de nuevas estructuras vasculares en miocardio y miembros posteriores isquémicos, gracias a que estas células pueden acelerar la re-endotelialización y la restauración de la homeostasis en vasos sanguíneos dañados (Kalka *y cols.*, 2000; Kawamoto *y cols.*, 2001; Kocher *y cols.*, 2001). Distintas matrices sintéticas y biológicas, se han utilizado en la búsqueda de la generación de vasos sanguíneos bio-artificiales, usando las PVs en combinación con stents y estructuras vasculares des-celularizadas, empleándolos en modelos clínico experimentales como injertos vasculares en humanos (Kaushal *y cols.*, 2001; Griese *y cols.*, 2003). Además, se ha demostrado que las PVs podrían someterse fácilmente a manipulación genética, lo cual conduciría a la producción de distintas moléculas terapéuticas a partir de la maquinaria de estas células, por ejemplo las PVs se podrían modificar genéticamente para sobre expresar distintas moléculas antitrombóticas, vasodilatadoras, angiogenicas y antiproliferativas, que pudieran mejorar la función de alguna región vascular o prevenir distintas patologías (Herder *y cols.*, 2003; Griese *y cols.*, 2003; Iwaguro., 2002; Kong *y cols.*, 2004). Sin embargo, a pesar del notable potencial de las PVs, estudios recientes han demostrado que la edad y otros factores de riesgo de enfermedades cardiovasculares, reducen su disponibilidad y su funcionalidad, lo que limita su utilidad terapéutica (Vasa *y cols.*, 2001; Rauscher *y cols.*, 2003); aunado a la escasez relativa de PVs en sangre periférica y su potencial proliferativo finito, que en conjunto representarían importantes limitantes para la una expansión de PVs suficientes para su aplicación terapéutica, todo lo anterior en un periodo relativamente corto (Murasawa *y cols.*, 2002).

## 2. Justificación

De acuerdo con la capacidad que poseen las PVs de sangre periférica humana, estas podrían importantemente conducir a una amplia variedad de aplicaciones experimentales y clínicas. Los PVs derivados de sangre periférica humana, resultan una fuente confiable, de obtención no invasiva, sin embargo, puesto que estas células se cultivan en monocapa actualmente, es imprescindible encontrar un método de expansión a corto plazo que permita el mantenimiento del estado progenitor de las PVs de sangre periférica, resultando el cultivo en suspensión un sistema muy viable.

El sistema de cultivo en suspensión es un sistema que permite la disponibilidad homogénea de nutrimentos y factores importantes para el crecimiento celular, además este permite implementar protocolos de producción-consumo (metabolitos primarios, metabolitos secundarios, proteínas, entre otras moléculas) debido a su capacidad de fácil escalamiento sin embargo distintos factores como el estrés hidrodinámico tienen que ser estudiados y controlados, pues estos ejercen un efecto en el crecimiento y la diferenciación celular (Ye y cols., 2008; Obi y cols., 2012).

De acuerdo con lo anterior, se considera, que es posible realizar una expansión de las células progenitoras vasculares derivadas de sangre periférica humana, mediante un sistema en suspensión con el cual se conserve su estado progenitor, a través del control estricto del esfuerzo de corte, generado por la agitación del medio de cultivo.

## 3. Objetivos

### 3.1 General

- Expandir los precursores vasculares derivados de sangre periférica humana en un sistema de cultivo en suspensión.

### 3.2 Particulares

- Aislar la porción de células mononucleares de sangre periférica humana
- Derivar a los PVs a partir de la fracción mononuclear, mediante un cultivo selectivo
- Identificar la densidad celular y de microacarreadores óptimos para el cultivo en suspensión
- Determinar la condición de agitación óptima para la adhesión celular a los microacarreadores.
- Identificar la condición de agitación constante optima, para mantener el estado unipotente de las PVs.
- Caracterizar la velocidad de crecimiento específica y tasa de duplicación de los PVs en el cultivo en monocapa y en suspensión (adheridos a microacarreadores).
- Identificar el perfil de expresión de los marcadores CD133, KDR, CD31, VE-Caderina y el VWF, por inmunocitoquímica y por citometría de flujo, en PVs en cultivo estático y posterior al cultivo en suspensión
- Realizar un modelo de formación de microvasculatura *in vitro* a partir de células en cultivo estático y cultivo en suspensión

## 4. Antecedentes

Actualmente en todos los antecedentes en donde se ha realizado una expansión de PVs, ha sido en monocapa, por lo que no existen antecedentes en los que se haya intentado o realizado un cultivo de PVs en suspensión, método que permitiría obtener una cantidad robusta de células en el mismo o menor tiempo, sin embargo es necesario considerar otros factores, como el shear stress, el cuál puede tener implicaciones muy importantes, tanto en la proliferación, como en la diferenciación de las progenitoras vasculares, semejantes a lo ocurrido en un vasos sanguíneos *in vivo*.

Kalka y colaboradores en el 2000, realizaron un aislamiento y expansión de PVs de sangre periférica humana en placas de cultivo, obteniendo  $5 \times 10^5$  células totales. Posteriormente compararon el efecto del trasplante de las PVs contra el trasplante de Células endoteliales microvasculares humanas comerciales. Ellos encontraron que posterior a 4 semanas de seguimiento, con el tratamiento con PVs de SP se producía una recuperación de la perfusión y la densidad capilar en el miembro isquémico de un modelo biológico, además de que el porcentaje de tejido necrótico fue muy bajo, por lo que se demostró el alto potencial regenerativo de las PVs.

Fuschs y colaboradores en el 2006, realizaron un aislamiento y cultivo de PVs de SP de 5 donadores, durante aproximadamente 3-4 meses (14 pasajes), obteniendo de entre  $5 \times 10^7$  y  $6.15 \times 10^8$  células totales. Determinaron que desde pasajes iniciales estas células expresan KDR, CD31, VE-Caderina y vWF por qPCR sin embargo, se observa un aumento de la expresión de las dos últimas proteínas posterior al pasaje 8. En un ensayo en matrigel Fuschs y su grupo de trabajo, inocularon  $2 \times 10^4$  células- $0.143 \text{cm}^2$  y encontraron que posterior a 20h de cultivo, estas PVs al igual que las HUVECs tuvieron la capacidad de formar estructuras microvasculares *in vitro*.

Reinisch y colaboradores en el 2009, aislaron PVs de SP de voluntarios sanos y de pacientes con alguna enfermedad cardiovascular. Cultivaron y expandieron estas células con medio EGM-2 suplementando con lisado de plaquetas humanas, en sustitución al FBS. Encontraron que el número de colonias generadas a partir de la SP de pacientes sanos no difería significativamente al de pacientes con enfermedad cardiovascular. Eventualmente expandieron el cultivo celular de ambos grupos de pacientes usando inicialmente 28-100

células·cm<sup>-2</sup> en un área de 2528 cm<sup>2</sup>, durante 11-25 días. Encontraron que posterior a la criopreservación estas células fueron PECAM<sup>+</sup>, KDR<sup>+</sup> y VE-Caderina<sup>+</sup>, siendo CD133<sup>-</sup>, con capacidad de formar una red vascular en matrigel, además de que no presentaron aneuploidías.

Hofmann y colaboradores en el 2012, generaron un método para la expansión de progenitores endoteliales derivados de sangre periférica, empleando un área aproximada de 2,500 cm<sup>2</sup>, a partir de 15 frascos T175, 11 frascos T225 y 1 unidad de cultivo múltiple CF-4. Como inóculo inicial de emplearon 2.5x10<sup>5</sup> células totales (100 células·cm<sup>-2</sup>), obteniendo un aproximado de 1x10<sup>8</sup> células totales, posterior a 14 días de cultivo, cuando éstas alcanzaron la confluencia, por lo que ellos concluyeron que preferían el emplear la unidad de cultivo múltiple CF-4 para la expansión de las PVs por su fácil manejo.

Gubar y colaboradoras en el 2018 derivaron colonias de PVs a partir de SP humana, determinando que, en el cultivo en monocapa, posterior a los pasajes 5 y 6 el cultivo de los progenitores vasculares comienza a decaer, reflejándose en la proliferación celular, sin embargo determinaron que, mediante la expansión en pasajes tempranos, empleando frascos de cultivo T75 es posible obtener de 2-8x10<sup>7</sup> células totales. Estas células obtenidas de la expansión fueron PECAM-1<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD105<sup>+</sup> y CD34<sup>+</sup>, además de que presentaron un cariotipo normal, con la capacidad de formar estructuras microvasculares en matrigel.



## 5. Metodología.

### 5.1 Obtención de muestras de sangre periférica humana

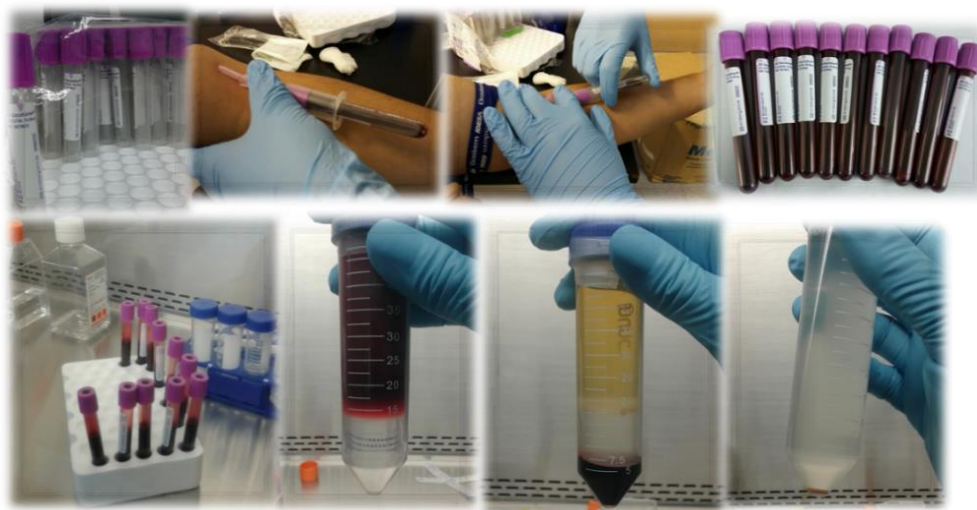
El proceso de obtención de las células mononucleares (CMNs), aislamiento, cultivo y expansión inicial de los progenitores endoteliales derivados de SP humana se realizó en el Laboratorio de Medicina Regenerativa e Ingeniería de Tejidos del “CMN 20 de Noviembre”-ISSSTE.

Se obtuvo un total de 50 mL de sangre periférica humana de voluntarios clínicamente sanos mediante punción venosa, empleando un sistema de recolección BD Vacutainer con Heparina de Sódica como anticoagulante.

#### 5.1.1 Aislamiento de por gradiente de Ficoll de células mononucleares de sangre periférica humana

La sangre colectada en los tubos vacutainer, se diluyó con 90 mL de PBS (sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ ) (Del inglés “*Phosphate Buffer Saline*”), obteniendo un total de 140 mL, posteriormente se vertieron 35 mL del homogeneizado de sangre-PBS en tubos con 15 mL de Ficoll-Histopaque, evitando su combinación. Al final de este procedimiento la mezcla de sangre diluida con el Ficoll- Histopaque®, se mantuvo en dos fases en cada uno de los tubos. Eventualmente la mezcla se centrifugó a 608g durante 30 min a 18°C (sin freno), por lo que se recuperaron las MNCs presentes en la interfase, conformada entre la fase de plasma (superior) y la fase del propio Ficoll- Histopaque, es decir entre la segunda y cuarta fase de forma ascendente. Consecuentemente la fracción de MNCs obtenida, se colectó en nuevos tubos de 50 mL por lo que se resuspendió con PBS y se centrifugó a 608g por 10 minutos a 18°C; una vez que el sobrenadante fue descartado, la fracción mononuclear se de nuevo se re suspendió en PBS y se centrifugó a 250g durante 15 minutos, la porción celular recuperada (Figura 9), fue re suspendida en medio de crecimiento endotelial 2 o EGM-2 Bullet kit (Del Inglés “*Endothelial Growth Medium-2 Bullet kit*”(Lonza), suplementado con 20% de FBS (Del inglés “*Fetal Bovine Serum*”), 0.2 mL de Hidrocortisona, 2 mL de hFGF- $\beta$  (Del inglés “*human Fibroblastic Growth Factor-  $\beta$* ”), 0.5 mL VEGF, 0.5 mL R3-IGF-1 (Del inglés “*Insulin Like Growth Factor-1*”), 0.5 mL de ácido ascórbico, 0.5 mL hEGF (Del inglés “*Human Epidermal Growth Factor*”), 0.5 mL Gentamicina/ Anfotericina-1000U, y 0.5 mL de

Heparina, cultivando aproximadamente  $1 \times 10^6$  células totales  $\cdot \text{cm}^{-2}$  en placas pre-tratadas con colágeno tipo I ( $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). A las 72h (día 3) se realizó un cambio parcial de medio de cultivo, posteriormente se realizó una renovación total de medio cada 48 horas, durante los siguientes 10 días aproximadamente. Una vez que aparecieron las primeras colonias de PVs en monocapa, se disminuyó la cantidad de FBS a 10% mL en el medio de cultivo, realizando el subcultivo de las PVs cuando estas alcanzaron el 70- 80% de confluencia, manteniéndolas a  $37^\circ\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$  con control de humedad relativa.



**Figura 9. Obtención de CMNs por gradiente de Ficoll.** Proceso esquemático del procedimiento de aislamiento de la fracción monoclear a partir de sangre periférica humana.

### 5.1.2 Cinética de proliferación de las PVs

Para obtener datos acerca de dinámica de crecimiento y viabilidad de las PVs, se realizó un cultivo en monocapa durante 192h (8 días) sin cambios de medio, por lo que se tomó un muestreo por triplicado cada 24h y empleando la cámara de Neubauer y azul de tripán se realizó el conteo de células totales, analizando su viabilidad celular. De acuerdo con los datos obtenidos, se realizó la cuantificación de la Velocidad Específica de Crecimiento ( $\mu$ ), así como el Tiempo de Duplicación Celular ( $T_d$ ), en la etapa de crecimiento exponencial.

Los parámetros se calcularon mediante las siguientes formulas:

Velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ):

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

Tasa de duplicación (Td):

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

Donde ln es el logaritmo natural.

### 5.1.3 Proceso de vasculogenesis *in vitro* de PVs en monocapa

Las PVs cultivadas en monocapa, se sometieron a un proceso de diferenciación, para la formación de estructuras microvasculares; empleando placas de cultivo de 6 pozos pre-tratadas con Colágeno I (50mg·mL<sup>-1</sup>), se inocularon 1x10<sup>4</sup> células·cm<sup>-2</sup> por pozo, estas se mantuvieron con medio EGM-2, suplementado con 10% de FBS, 0.2 mL de Hidrocortisona, 2 mL de hFGF- $\beta$ , 0.5 mL VEGF, 0.5 mL R3-IGF-1, 0.5 mL de ácido ascórbico, 0.5 mL hEGF, 0.5 mL Gentamicina/ Anfotericina-1000U, y 0.5 mL de Heparina, por lo que se evaluaron dos condiciones de mantenimiento del cultivo, renovando el medio cada 72h (3 días) para la primer condición y cada 144h (6 días); ambas condiciones se realizaron por triplicado. La prueba duró 30 días, manteniendo el cultivo a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> con control de humedad relativa.

### 5.1.4 Inmunocitoquímica de PVs en monocapa

Para identificar el linaje endotelial de las PVs, como prueba control, se realizó una inmunocitoquímica para distintos marcadores de membrana, antes de someterlas a un proceso de agitación.

Las PVs en monocapa, se lavaron con PBS sin Ca<sup>2+</sup> ni Mg<sup>2+</sup> por 2 min y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4%, a temperatura ambiente durante 15 min; consecutivamente se retiró el PFA y se realizaron un par de lavados más con PBS, como ya se describió. El siguiente paso fue el bloqueo de los sitios inespecíficos, empleando una solución

compuesta por 5% de FBS en PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{+2}$  durante 30 min y dos últimos lavados con PBS. Posteriormente los PVs fijadas, se incubaron con los anticuerpos primarios rabbit anti-CD133, mouse anti-KDR, rabbit anti-PECAM-1 y rabbit anti-VE- Caderina y Rabbit anti-vWF, durante 1 hora a temperatura ambiente. El marcador CD133 se empleó en contra tinción con cada uno de los otros marcadores, por lo que, para evaluar la expresión de este, se empleó mouse Alexa Flúor 488 anti rabbit como anticuerpo secundario, mientras que para los otros cinco marcadores se empleó mouse/rabbit TRITC anti-mouse/rabbit. Se realizó una tinción con DAPI, para identificar los núcleos celulares. La inmunocitoquímica de las PVs en monocapa se examinó mediante el microscopio de epifluorescencia Olympus 1X71.

### **5.1.5 Inmunocitoquímica de estructuras microvasculares *in vitro***

Posterior al proceso de formación de micro vasculatura *in vitro* a partir de las PVs cultivadas en monocapa, el cultivo fue lavado con PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  por 2 min y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4%, a temperatura ambiente durante 15 min; consecutivamente se retiró el PFA y se realizaron un par de lavados más con PBS, como ya se describió. El siguiente paso fue el bloqueo de los sitios inespecíficos, empleando una solución compuesta por 5% de FBS en PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{+2}$  durante 30 min y dos últimos lavados con PBS. Posteriormente las células fijadas, se incubaron el anticuerpo Rabbit anti- vWF, durante 1 hora a temperatura ambiente, el cual fue conjugado con un mouse TRITC anti rabbit como anticuerpo secundario. En contra tinción se empleó al marcador Faloidina-Alexa Fluor 488, para resaltar el citoesqueleto celular, además de DAPI para identificar los núcleos celulares. Se realizó una tinción con DAPI, para identificar los núcleos celulares. La inmunocitoquímica de las PVs en monocapa se examinó con el microscopio de epifluorescencia Olympus 1X71.

### **5.1.6 Citometría de flujo de PVs en monocapa**

Las PVs en monocapa, posterior a un lavado con PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ , fueron disgregadas con Tripsina-EDTA 1X (0.25%), durante 7 min a 37°C, recuperándolas como una suspensión unicelular, seguido de su inactivación con EBM-2 con 10% de FBS. Las PVs en suspensión, se centrifugaron a 480g por 4 minutos a 18 °C, realizando un lavado con PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  y centrifugando a la misma condición. Posterior a la obtención celular, se

realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos empleando una solución compuesta por 5% de FBS en DPBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  durante 30 min y dos últimos lavados con PBS. Las células obtenidas, se incubaron con los anticuerpos primarios rabbit anti-CD133, mouse anti-KDR, rabbit anti-PECAM-1 y rabbit anti-VE- Caderina, durante 1 hora a temperatura ambiente, realizando dos lavados finales con PBS. Las células con los anticuerpos primarios se incubaron con los anticuerpos secundarios mouse FITC anti rabbit y rabbit FITC anti-mouse, durante 1h a temperatura ambiente. Cada tinción se realizó de manera independiente, empleando una porción celular sin anticuerpo, como control negativo. Para evitar la pérdida de células en cada centrifugación, fue necesario fijarlas con PFA al 0.5% al final de la incubación con los anticuerpos. Para su análisis las muestras se examinaron en el Clitómetro de Flujo GUAVA Easy Cyte con el software INCYTE.

## **5.2 Adhesión de PVs a microacarreadores**

Una vez que se obtuvo una cantidad importante de PVs mediante su expansión inicial en monocapa, se inocularon distintas densidades celulares, evaluando distinto número de microacarreadores Cytodex 3 y distintas condiciones de agitación. Las primeras pruebas de adhesión se realizaron en placas de cultivo de 12 pozos, empleando 1mL de medio EGM-2 Bullet Kit, suplementado con 10 mL de FBS, 0.2 mL de Hidrocortisona, 2 mL de hFGF- $\beta$ , 0.5 mL VEGF, 0.5 mL R3-IGF-1, 0.5 mL de ácido ascórbico, 0.5 mL hEGF, 0.5 mL Gentamicina/ Anfotericina-1000U, y 0.5 mL de Heparina, para cada condición, por triplicado. Se emplearon inicialmente  $1.5 \times 10^5$ ,  $1.1 \times 10^5$ ,  $9 \times 10^4$ ,  $7 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $3 \times 10^4$  y  $1 \times 10^4$  células-mililitro<sup>-1</sup>; en cuanto al número de microacarreadores-mililitro<sup>-1</sup>, se emplearon tres densidades distintas,  $1.62 \times 10^7$  (5.4 cm<sup>2</sup>),  $1.83 \times 10^7$  (6.09cm<sup>2</sup>) y  $2.3 \times 10^7$  (6.75cm<sup>2</sup>), sin embargo, a partir de las pruebas iniciales, se seleccionaron las dos densidades más altas. Para inducir la adhesión celular a los microacarreadores, se empleó un agitador orbital y se encontró que, en condiciones de agitación menor a 50 RPM el medio de cultivo se encontraba visualmente estático, seleccionando 50 y 60 RPM para éste experimento preliminar.

El procedimiento para promover la adhesión celular a los microacarreadores fue el siguiente (adaptado de Duvar y cols., 1996; Muthing y cols., 1996): se realizaron agitaciones intermitentes de 2 minutos, cada 30 minutos, durante 6 horas, realizando un total de 12 agitaciones. Posterior a la adhesión celular a los microacarreadores, el cultivo se mantuvo

sin agitación, durante 5 días, con las condiciones descritas con anterioridad a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> con control de humedad relativa.

Para realizar el conteo del número de células adheridas a los microacarreadores, se tomó una muestra posterior a la agitación inicial, y empleando DAPI se contó el número de núcleos celulares por microacarreador, considerando al menos el análisis de 15 microacarreadores de estos por cada repetición. Esta misma dinámica se empleó para realizar el conteo celular a de las 24 a las 168h del cultivo.

### **5.3 Cultivo en agitación constante**

El proceso del cultivo en suspensión se realizó en el laboratorio de Bioquímica de la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, utilizando un agitador que permitiera mantener los cultivos en agitación constante, en condiciones fisiológicas.

Una vez identificadas las condiciones óptimas para la adhesión celular (densidad celular, densidad de microacarreadores y condición de agitación inicial), el modelo para la agitación constante, se llevó a cabo en a matraces Erlenmeyer de 25mL, con los que se probaron las dos densidades celulares seleccionadas a partir de las pruebas anteriores ( $5 \times 10^4$  células·mL<sup>-1</sup> y  $7 \times 10^4$  células·mL<sup>-1</sup>) y empleando una cantidad de  $2.3 \times 10^7$  microacarreadores·mL<sup>-1</sup> (que equivale a 6.75cm<sup>2</sup>), también pre-seleccionada; en cuanto a las distintas condiciones de agitación, se seleccionaron 120 RPM, 100 RPM, 80 RPM y 60 RPM, empleando un agitador orbital INFORS HT Celltron para este fin; se emplearon 5mL de medio EGM-2, suplementado con 10 mL de FBS, 0.2 mL de Hidrocortisona, 2 mL de hFGF-β, 0.5 mL VEGF, 0.5 mL R3-IGF-1, 0.5 mL de ácido ascórbico, 0.5 mL hEGF, 0.5 mL Gentamicina/ Anfotericina-1000U, y 0.5 mL de Heparina, que representa 20% de la capacidad de los matraces, para permitir el intercambio óptimo de gases y la difusión de oxígeno en cada condición, por lo que el medio de cultivo no se renovó durante 7 días de cultivo en las primeras pruebas de agitación (Figura 10). Posterior a seleccionar la condición de agitación constante optima, se realizó un procedimiento, con intercambio de medio cada 72h durante 240h; los cultivos en agitación constante se mantuvieron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> con control de humedad relativa. Las pruebas a 120 RPM

y 100 RPM se realizaron por triplicado; para las pruebas a 80 y 60 RPM se realizaron seis experimentos independientes.

Para realizar el conteo del número de células adheridas a los microacarreadores, se tomó una muestra posterior a la agitación inicial, y empleando DAPI se contó el número de núcleos celulares por microacarreador, considerando al menos el análisis de 15 microacarreadores por cada repetición. Esta misma dinámica se empleó para realizar el conteo celular de las 24 a las 168h del cultivo, lo cual nos permitió evaluar la proliferación celular, generando una cinética de crecimiento para cada condición.

Para cada condición de agitación constante, se calculó el *shear stress* o esfuerzo de corte al que se encontraron sometidas las PVs en suspensión, este parámetro es representado con el símbolo de  $\tau$  y se calcula mediante la siguiente fórmula (Kim y cols., 2015):

$$\tau = \alpha \sqrt{\eta \rho (2\pi f)^3}$$

En donde los parámetros son:

$\tau$  = *Shear stress*

$\alpha$  = Radio de orbital del agitador (1.25 cm)

$\eta$  = Viscosidad del medio de cultivo ( $7.5 \times 10^{-3}$  dinas·s<sup>-1</sup>·cm<sup>-2</sup>)

$\rho$  = Densidad del medio de cultivo 1g·mL<sup>-1</sup>)

$f$  = Frecuencia de rotación (revoluciones·segundo<sup>-1</sup>) (2 [120 RPM], 1.6 [100 RPM], 1.3 [80 RPM] y 1 [60 RPM])



**Figura 10. Cultivo en agitación constante.** Fotografía que ilustra el cultivo de PVs en suspensión, en matraces Erlenmeyer de 25mL de capacidad.

### **5.3.1 Obtención celular del cultivo en agitación**

Para realizar la inmunocitoquímica y citometría de flujo de células sometidas a las distintas condiciones de agitación, fue necesario recuperarlas como suspensión unicelular en su etapa de crecimiento máximo (120h); para este fin se disminuyó a 0 RPM la agitación de los matraces, por lo que los microacarreadores con células se sedimentaron en el fondo, posteriormente estos se recuperaron en tubos de 50mLy se lavaron dos veces con PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ , centrifugando a 250g por 2 min a 18 °C. Las PVs adheridas a la superficie de los microacarreadores, fueron disgregadas con Tripsina-EDTA 1x (0.25%) durante 8 min en agitación mínima, seguido de su inactivación con EBM-2 con 10% de FBS. Una vez que las células fueron separadas de los microacarreadores, estas se recuperaron haciéndolas pasar a través de una malla de 100  $\mu\text{m}$ , quedando atrapados en esta los microacarreadores.

### **5.3.2 Proceso de vasculogenesis *in vitro* posterior al proceso de agitación constante**

Las PVs obtenidas de la condición de 60 RPM, se sometieron a un proceso de diferenciación, para la formación de estructuras microvasculares; empleando placas de cultivo de 6 pozos pre-tratadas con Colágeno I ( $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), se inocularon  $1\times 10^4$  células· $\text{cm}^{-2}$  por pozo, estas se mantuvieron con medio EGM-2, suplementado con 10% de FBS, 0.2 mL de Hidrocortisona, 2 mL de hFGF- $\beta$ , 0.5 mL VEGF, 0.5 mL R3-IGF-1, 0.5 mL de ácido ascórbico, 0.5 mL hEGF, 0.5 mL Gentamicina/ Anfotericina-1000U, y 0.5 mL de Heparina, realizando un cambio de medio cada 144h (6 días) durante 30 días, manteniendo el cultivo a 37°C, 5% de  $\text{CO}_2$  con control de humedad relativa. La prueba se realizó por triplicado.

### **5.3.3 Inmunocitoquímica de PVs posterior al proceso de agitación**

Una vez recuperadas las PVs de la superficie de los microacarreadores (100, 80 y 60 RPMs), estas se cultivaron en una placa de 12 pozos, pretratadas con Colágeno I ( $50\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), en una densidad de  $1\times 10^4$  células· $\text{cm}^{-2}$ . Posterior a 24h del inóculo se les retiró el medio y se lavaron con PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  por 2 min y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4%, a temperatura ambiente durante 15 min; consecutivamente se retiró el PFA y se realizaron un par de lavados más con PBS, como ya se describió. El siguiente paso fue el



bloqueo de los sitios inespecíficos, empleando una solución compuesta por 5% de FBS en PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  durante 30 min y dos últimos lavados con PBS. Posteriormente las PVs fijadas, se incubaron con los anticuerpos primarios rabbit anti-CD133, mouse anti-KDR, rabbit anti-PECAM-1 y rabbit anti-VE- Caderina y Rabbit ant- vWF, durante 1 hora a temperatura ambiente. El marcador CD133 se empleó en contra tinción con cada uno de los otros marcadores, por lo que, para evaluar la expresión de este, se empleó FITC como anticuerpo secundario, mientras que para los otros cinco marcadores se empleó TRITC. Se realizó una tinción con DAPI, para identificar los núcleos celulares. La inmunocitoquímica de las PVs obtenidas de los procesos de agitación, se examinaron mediante el microscopio de epifluorescencia Olympus 1X71.

#### **5.3.4 Inmunocitoquímica de estructuras microvasculares *in vitro* posterior al proceso de agitación**

Posterior al proceso de formación de micro vasculatura *in vitro* a partir de PVs sometidas a 60 RPM, el cultivo fue lavado con PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  por 2 min y se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4%, a temperatura ambiente durante 15 min; consecutivamente se retiró el PFA y se realizaron un par de lavados más con PBS, como ya se describió. El siguiente paso fue el bloqueo de los sitios inespecíficos, empleando una solución compuesta por 5% de FBS en PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  durante 30 min y dos últimos lavados con PBS. Posteriormente las células fijadas, se incubaron el anticuerpo Rabbit ant- vWF, durante 1 hora a temperatura ambiente, el cual fue conjugado con un mouse TRITC anti rabbit como anticuerpo secundario. En contra tinción se empleó al marcador Faloidina-Alexa Fluor 488, para resaltar el citoesqueleto celular, además de DAPI para identificar los núcleos celulares. Se realizó una tinción con DAPI, para identificar los núcleos celulares. La inmunocitoquímica de las PVs en monocapa se examinó mediante el microscopio de epifluorescencia Olympus 1X71.

### **5.3.5 Citometría de Flujo de las PVs posterior al proceso de agitación**

Una vez recuperadas las PVs de la superficie de los microacarreadores (100, 80 y 60 RPMs), como una suspensión unicelular, se realizó el bloqueo de los sitios inespecíficos de estas empleando una solución compuesta por 5% de FBS en PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$  durante 30 min y dos últimos lavados con PBS. Posteriormente las PVs obtenidas de la centrifugación, se incubaron con los anticuerpos primarios rabbit anti-CD133, mouse anti-KDR, rabbit anti-PECAM-1 y rabbit anti-VE- Caderina, durante 1 hora a temperatura ambiente, realizando dos lavados finales con PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  ni  $\text{Mg}^{2+}$ . Las células recién incubadas con los anticuerpos primarios se incubaron con los anticuerpos secundarios mouse FITC anti-rabbit y rabbit FITC anti-mouse, durante 1h a temperatura ambiente. Cada tinción se realizó de manera independiente, empleando una porción celular sin anticuerpo, como control negativo. Para evitar la pérdida de células en cada centrifugación, fue necesario fijarlas con PFA al 0.5% al final de la incubación con los anticuerpos. Para su análisis las muestras se examinaron en el Clitómetro de Flujo GUAVA Easy Cyte con el software INCYTE.

### **5.4 Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos de la evaluación de la condición óptima, con relación al número de células totales obtenidas en fase estacionaria de crecimiento, posterior a someter las distintas densidades de PVs a las diferentes condiciones de agitación inicial, se presentan como un promedio de al menos tres experimentos con desviaciones estándar. Las diferencias significativas fueron calculadas utilizando una prueba *t* de *student*, considerando un valor de  $p < 0.05$  como significativo.

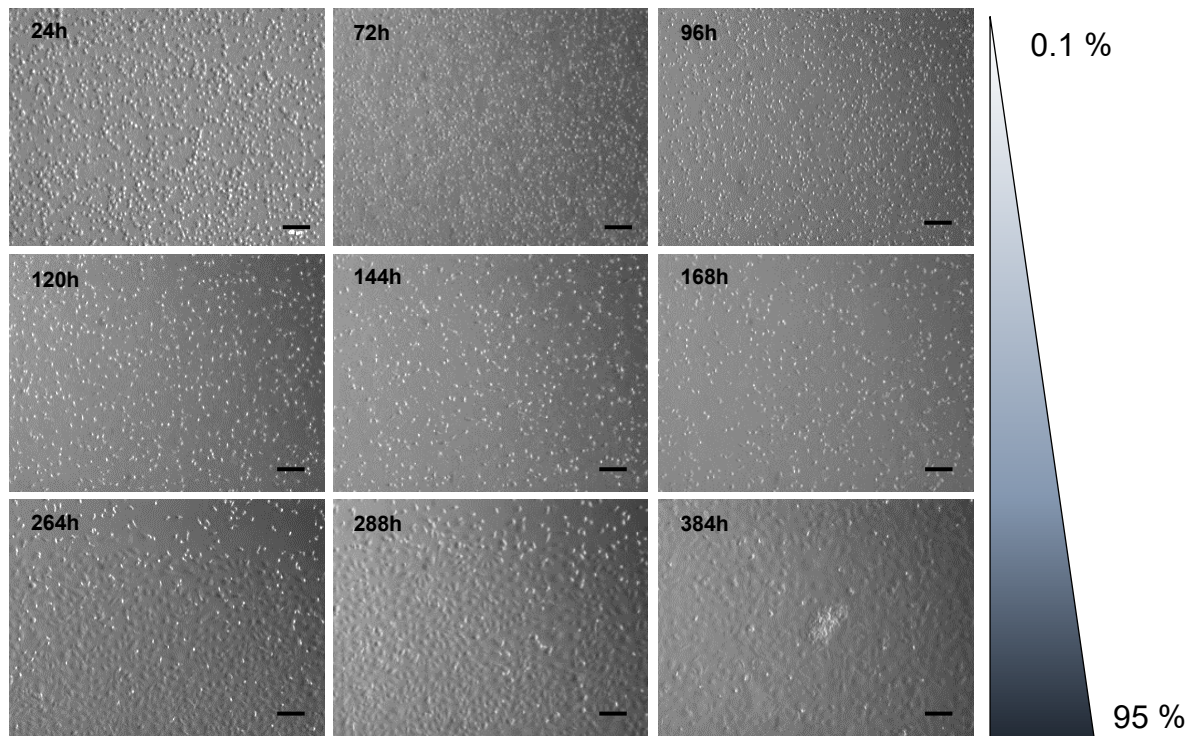
## **6. Resultados**

### **6.1 Caracterización fenotípica de células progenitoras endoteliales derivadas de sangre periférica humana**

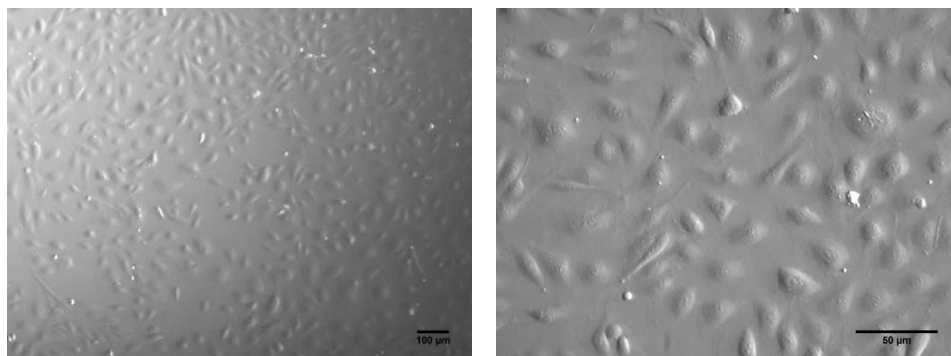
#### **6.1.1 Proceso de derivación de las PVs**

Posterior a la obtención de la fracción mononuclear de SP humana, ésta se cultivó en medio EGM-2 el cual funcionó como un medio selectivo para células de linaje endotelial. Es claro que no se realizó sólo una derivación, por lo que, de manera general, se encontró que en la etapa inicial de estas, se observó una gran cantidad de eritrocitos y otros tipos celulares (Figura 11; 24h - 96h), por lo que, con los cambios de medio consecuentes, se logró observar una fracción celular homogénea, lo que fue considerado como la fracción mononuclear, la cual se encontraba adherida a la base del frasco de cultivo (Figura 11; 120h – 168h). Dando seguimiento al proceso de derivación, en los días consecuentes del cultivo, se observó que colonias de células más grandes a las anteriormente encontradas, aparecieron generalmente de entre los 8- 15 días, representándose en las microfotografías a los 11 días (Figura 11; 264h). En primera instancia se podría mencionar que estas células de mayor tamaño, con morfología de tipo adoquín y crecimiento en colonias, como se han descrito, nos permitieron identificar la población endotelial en el proceso de derivación y eventualmente expandirla, pues, aunque constantemente se obtuvieron fracciones PVs puras, algunas veces fue necesario realizar un aislamiento manual.

Una vez que se aisló la fracción endotelial, esta se expandió en monocapa realizando el subcultivo cada 120h aproximadamente, cuando la monocapa celular alcanzó una confluencia del 90% en los frascos de cultivo (Figura 12). En la búsqueda de saber más acerca del comportamiento de las PVs derivadas de SP, el cultivo en monocapa se llevó a pasajes extendidos, por lo que se determinó en el intervalo de expansión óptimo de estas células es del pasaje 1 al pasaje 8, ya que posterior a este las células dejaron de proliferar y adquirieron un fenotipo alargado.

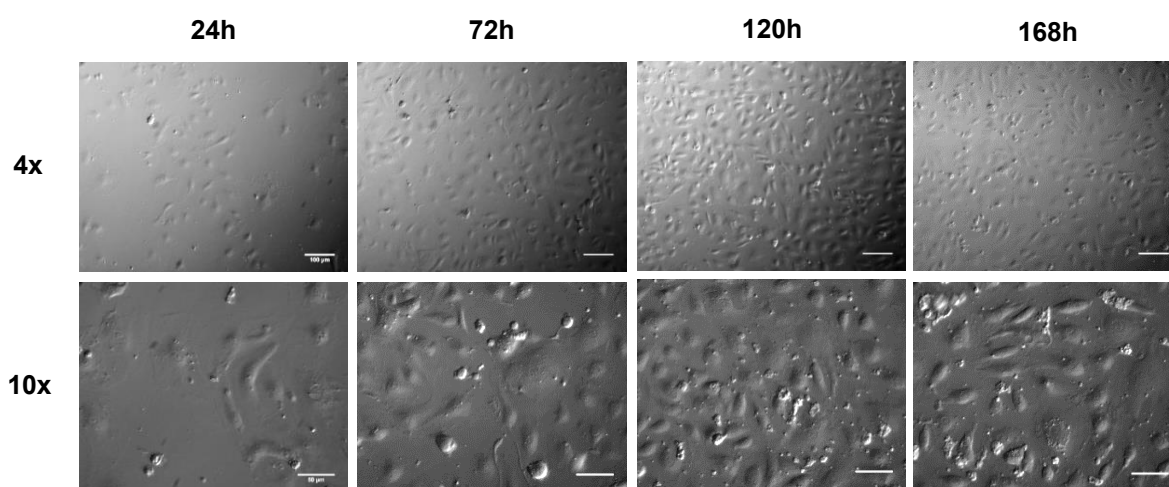


**Figura 11. Proceso de Derivación de PVs.** Obtención de colonias de precursores endoteliales, a lo largo de 384h con medio de cultivo selectivo, encontrando un alto porcentaje de PVs a partir de las 264h. Escala representa 50  $\mu\text{m}$ .

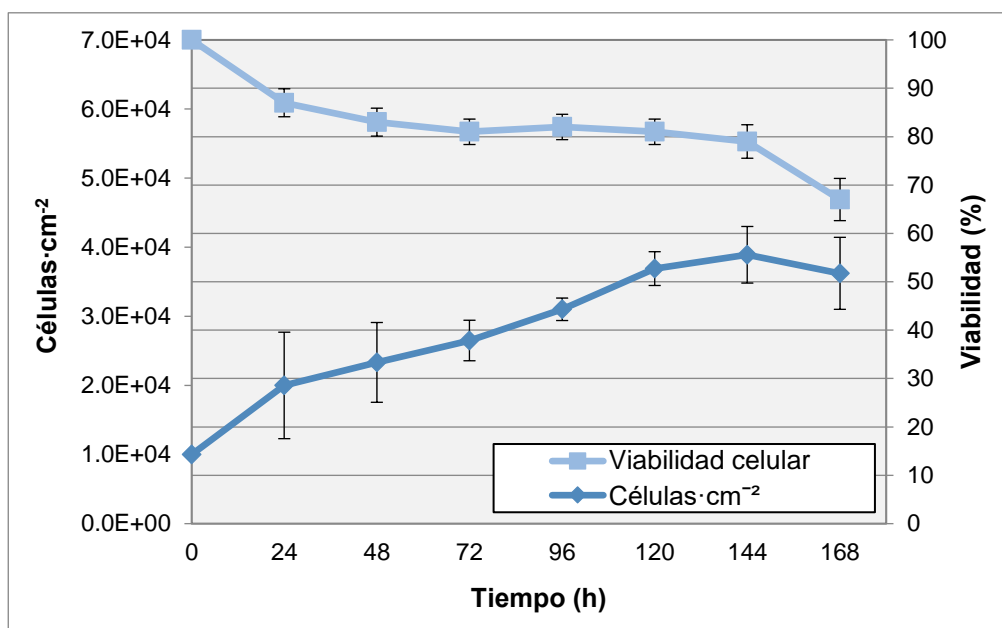


**Figura 12. Micrografía de PVs en monocapa.** Representación de Progenitores Endoteliales en cultivo a 75% de confluencia. Las escalas representan 100  $\mu\text{m}$  (izquierda) y 50  $\mu\text{m}$  (derecha).

Mediante la cinética de proliferación (Figura 13-14), se determinó que tiempo óptimo de cultivo de las PVs en monocapa se encuentra de entre las 120 a las 144h de cultivo, intervalo en donde se observó el punto máximo del desarrollo exponencial. Posterior a este intervalo de tiempo, se observó el comienzo de la etapa de decaimiento o muerte celular, a las 168h. La viabilidad inicial fue del 100% en los tiempos iniciales de la cinética de proliferación, sin embargo, en tiempo posteriores esta disminuyó, manteniéndose entre un 90-80% de las 24h a las 120h, disminuyendo a partir de las 144h, lo cual nos podrían indicar que el tiempo adecuado para el subcultivo es a las 120h, sin cambio de medio de cultivo.



**Figura 13. Micrografías de la cinética de crecimiento de las PVs.** Se identifica una etapa de expansión celular o etapa de crecimiento exponencial (24h- 120/144h), y una etapa de decaimiento o muerte celular (144h/ 168h). Escala representa 100 μm (4x) y 50 μm (10x).

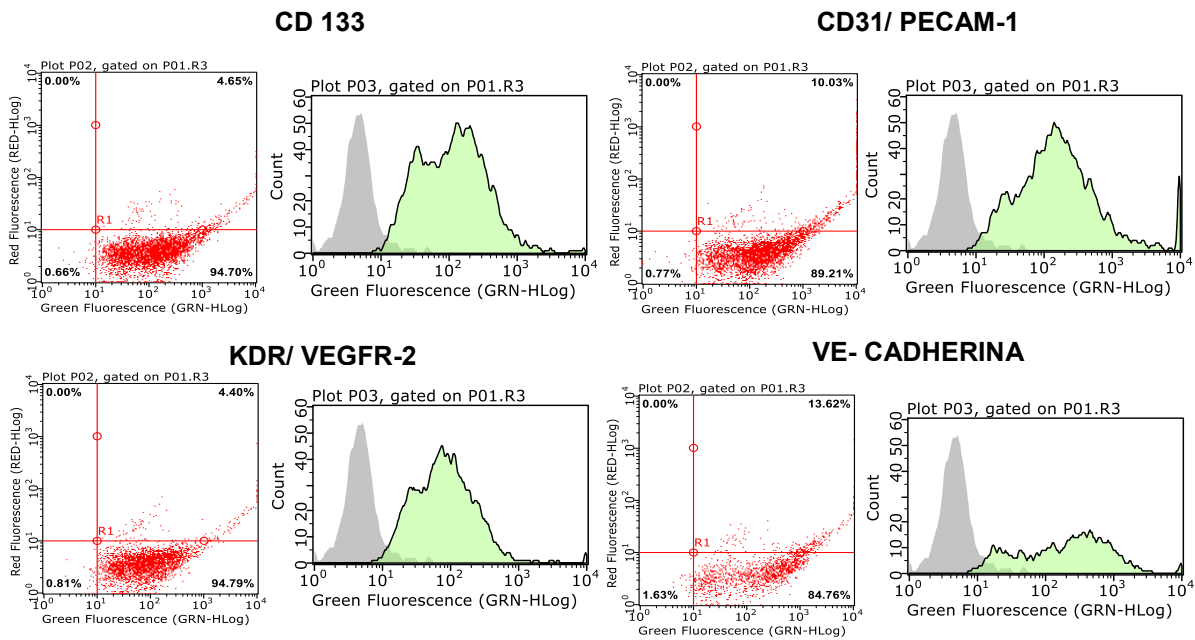


**Figura 14. Cinética de crecimiento de las PVs en monocapa.** Se indica el número de células·cm<sup>-2</sup> (eje vertical izquierdo) y la viabilidad celular (%) (eje vertical derecho).

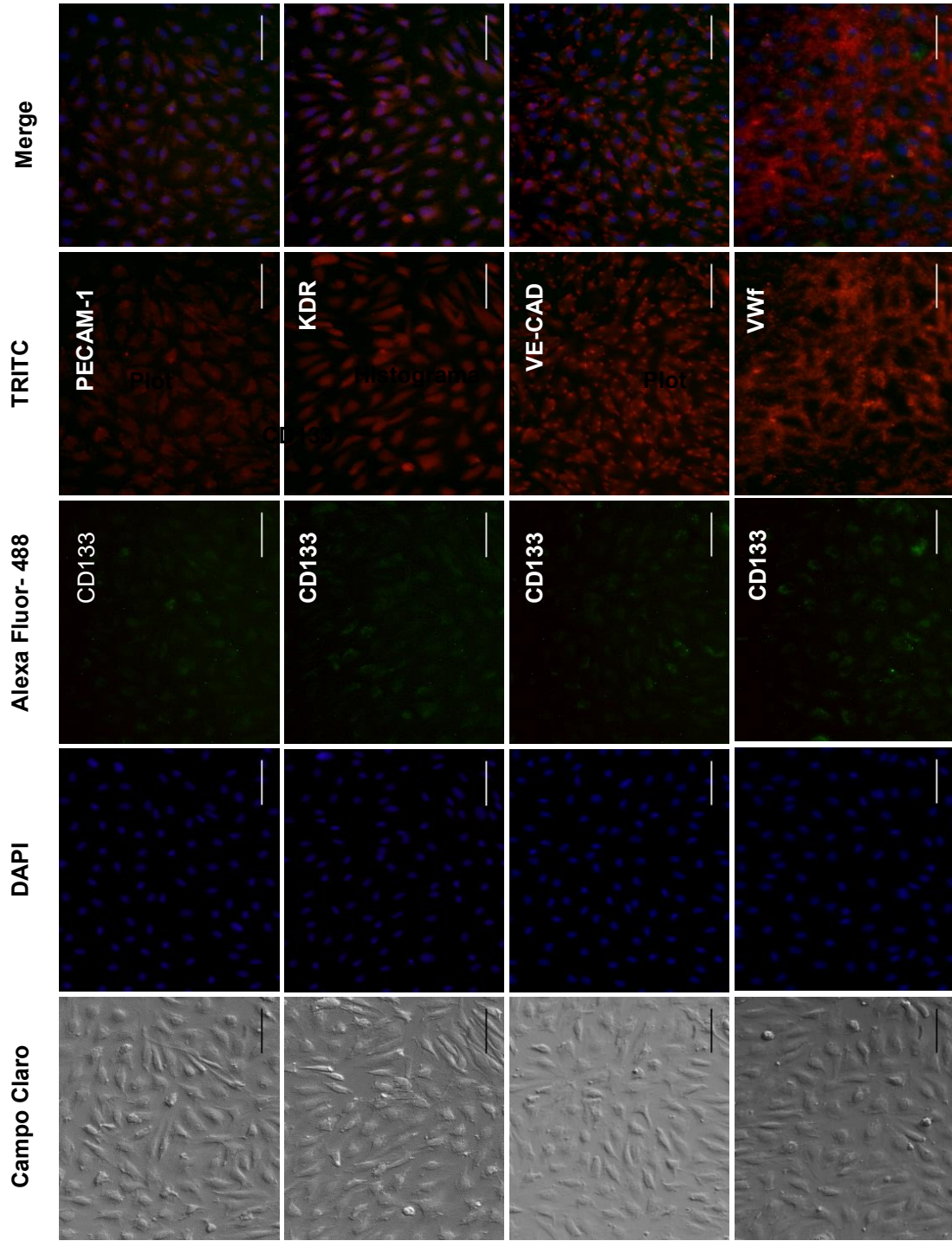
Con los datos obtenidos en la fase de crecimiento exponencial de la cinética de crecimiento, se realizó la estimación de la velocidad de crecimiento específico ( $\mu$ ), representada con un valor de 0.022 células·h<sup>-1</sup>, así como el tiempo de duplicación celular, con un valor de 31.44h, lo anterior estimado entre el intervalo de entre las 0h-144h.

### 6.1.2 Caracterización del inmunofenotipo de los PVs en cultivo en monocapa

Posterior al proceso de derivación, se obtuvieron colonias celulares con morfología en adoquín como ya se mencionó anteriormente, sin embargo, fue necesario emplear distintos anticuerpos que nos permitieran identificar las proteínas de superficie para caracterizar el linaje de precursor endotelial de estas células. Por citometría de flujo se determinó que el porcentaje de expresión de al menos 50,000 eventos adquiridos para cada marcador fue muy distinto entre cada uno de estos en comparación al control, encontrando un 94.7% para CD133, 94.7% para KDR, 89.21% para PECAM-1 y un 84.76% para VE- Cadherina, confirmando una alta expresión de los marcadores de precursores en células cultivadas en monocapa en pasajes tempranos (Figura 15). Por inmunocitoquímica, se identificó visualmente que la co-expresión del marcador CD133 (verde) con KDR, PECAM-1, VE- Cadherina, y el factor de Von Willebrand (rojo) fue definitiva en estas células, corroborando su capacidad troncal y su linaje endotelial (Figura 16).



**Figura 15. Citometría de flujo de las PVs cultivadas en monocapa.** Se representa el porcentaje de expresión para los marcadores CD133, KDR, CD31/PECAM-1 y VE-Cadherina, en comparación con el control (histograma gris).

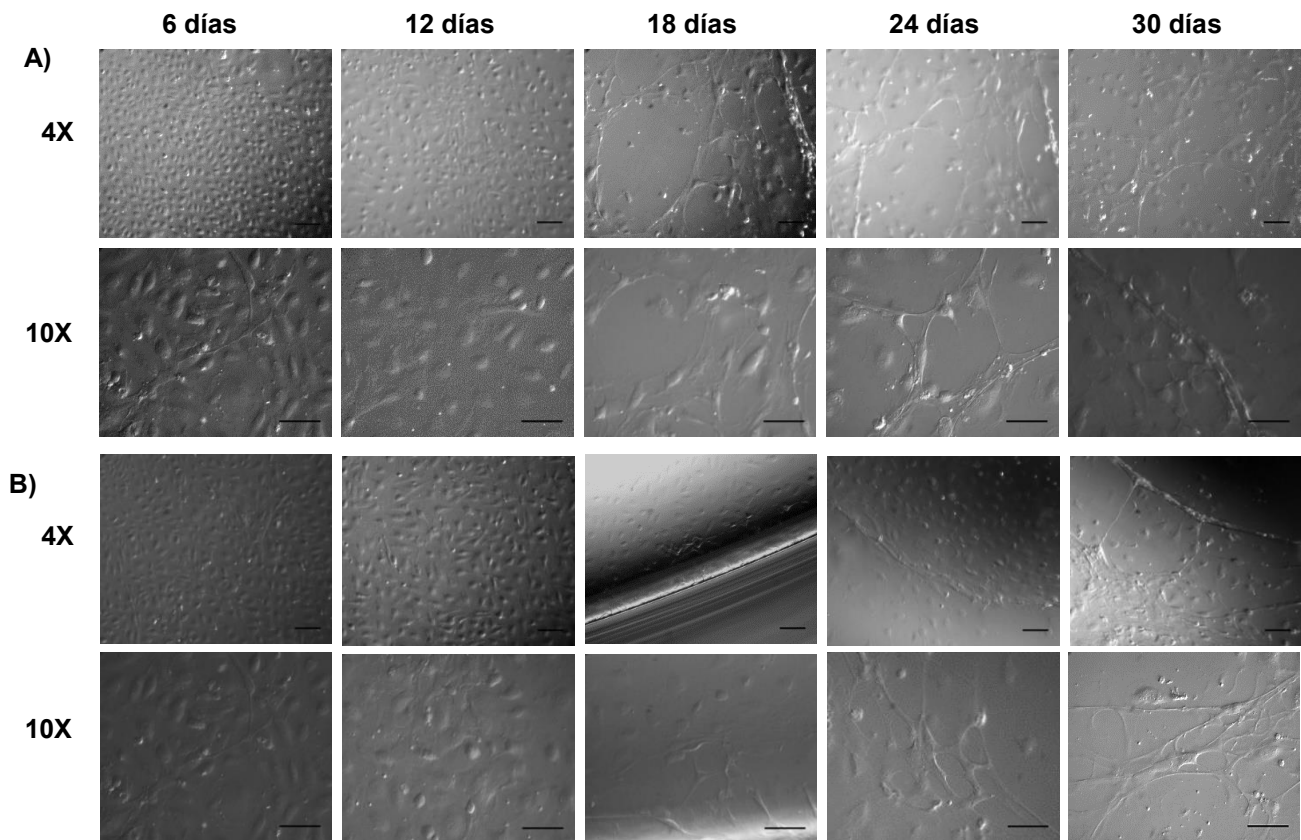


**Figura 16. Micrografías de las PVs cultivadas en monocapa, identificadas por inmunocitoquímica. Co-expresión de CD133-Alexa Fluor 488 (verde), como marcador de troncalidad y marcadores de linaje endotelial como PECAM-1, KDR, VE-CAD y Vwf TRITC- TRICT (rojo). Escala representa 50  $\mu$ m.**



### 6.1.3 Prueba de formación de microvasculatura a partir de PVs en cultivo estático

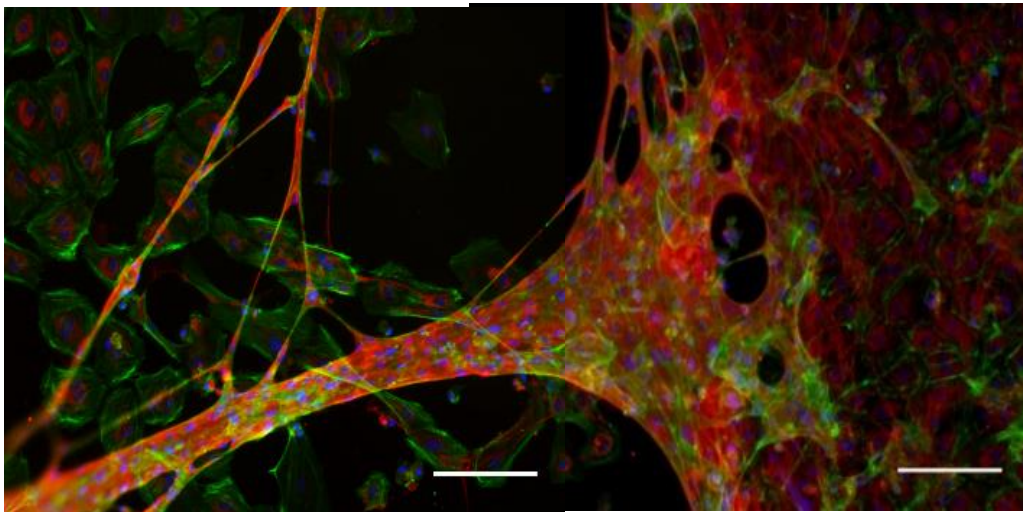
Los PVs en cultivo estático se sometieron a un proceso de diferenciación para la generación de estructuras microvasculares, a partir de un inóculo de  $1 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>, esto para confirmar el linaje endotelial-vascular de estas células (Figura 17). La monocapa celular sometida a dos condiciones de recambio de medio (3 y 6 días), se encontró confluyente posterior a 6 días de cultivo y se mantuvo así hasta aproximadamente 12 días, en ambas condiciones. A los 18 días del inicio de la prueba, se observó la formación de células alargadas que comenzaron a interconectarse con otras células con morfología semejante, por lo que, a los 24 días, estas células se encontraban formando una red. A los 30 días en cada cultivo de cada condición, se encontraron estructuras alargadas más robustas, que, en los tiempos anteriores, formadas por varias células, además de seguir agrupándose en una red celular interconectada.



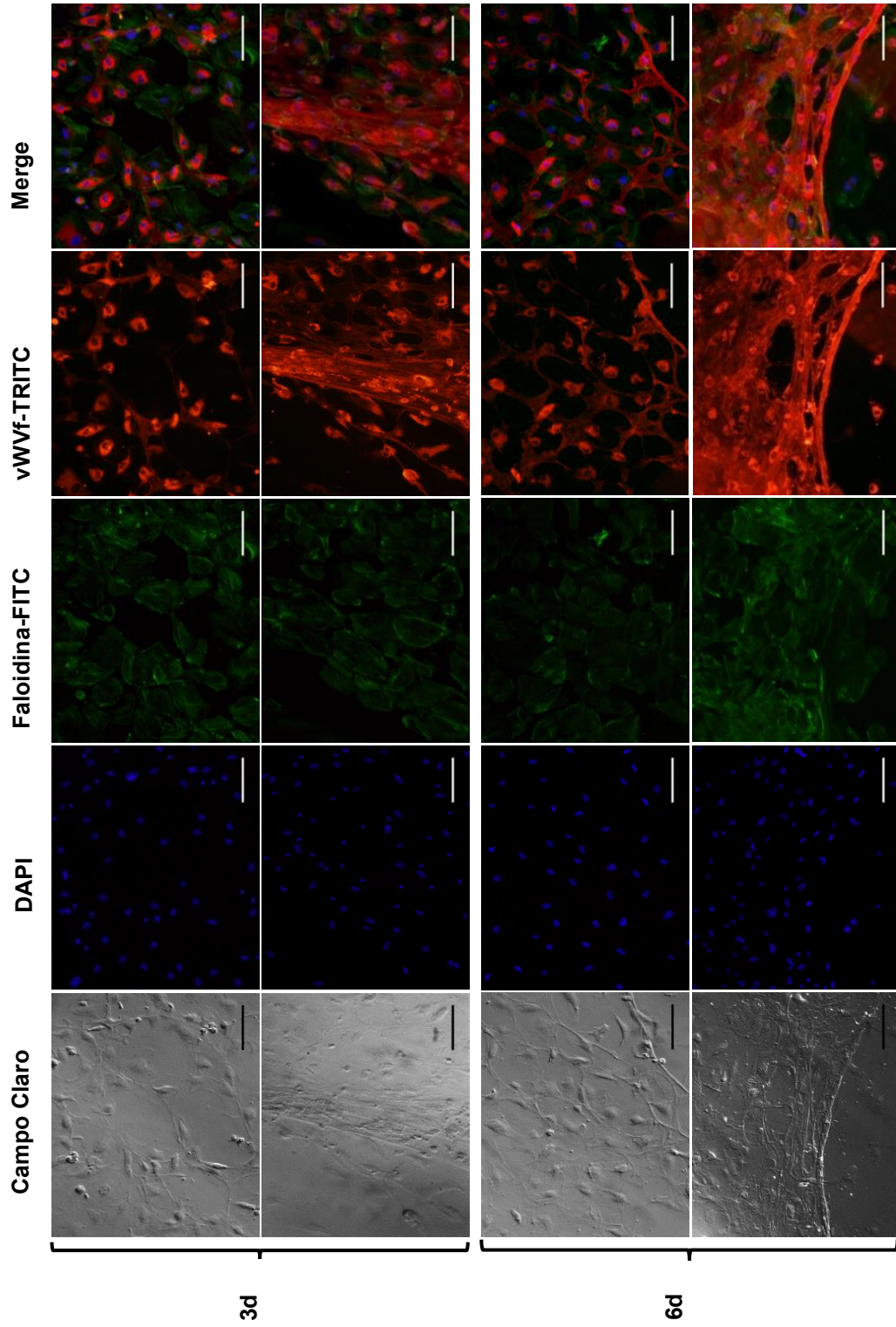
**Figura 17. Formación de microvasculatura a partir de PVs en monocapa.** Proceso de generación de estructuras microvasculares a partir de PVs cultivadas en monocapa, durante 30 días, realizando cambio de medio cada 3 días (A) y cada 6 días (B), escala representa 100  $\mu$ m (4X) y 50  $\mu$ m (10X).

#### 6.1.4 Inmunocitoquímica de prueba de microvasculatura

Posterior a la obtención de estructuras microvasculares *in vitro*, se detectó mediante inmunocitoquímica, una alta expresión del factor de Von Willebrand, empleando Faloidina para distinguir filamentos de actina del citoesqueleto celular, lo anterior en ambas condiciones de cultivo. Se observó que el factor de von Willebrand además de expresarse en la membrana celular, también se expresó ampliamente en la matriz extracelular, lo cual nos permitió identificar cual es la distribución celular en las redes formadas y las estructuras alargadas más robustas, encontrando que las redes fueron formadas por proyecciones celulares, que se interconectaron entre sí, mientras que las estructuras alargadas más robustas, se componían de muchas células, lo que nos hizo pensar que este tipo de estructuras se asemejan mucho a un vaso sanguíneo (Figura 18-19).



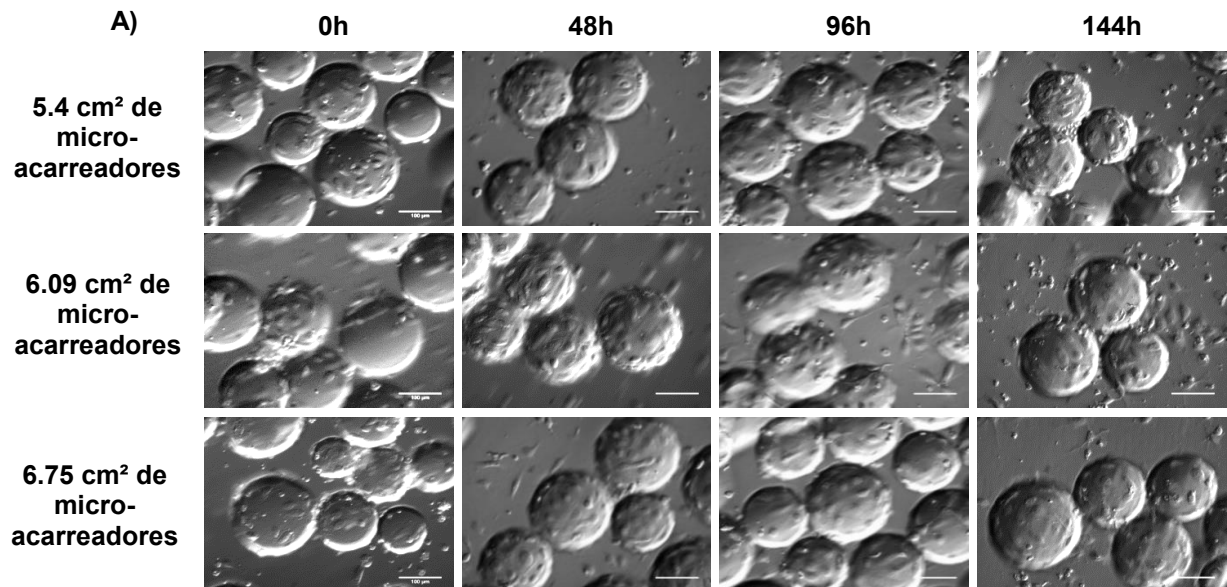
**Figura 18. Microvasculatura *in vitro* generada a partir de CPEs cultivadas en monocapa.** Inmunocitoquímica de estructura microvascular capturada en dos micrografías, se presenta la co-expresión de Faloidina-FITC (verde) y el factor de Von Willebrand- TRITC (rojo), en contratención con DAPI para resaltar el núcleo celular (azul). Escala representa 50  $\mu\text{m}$ .

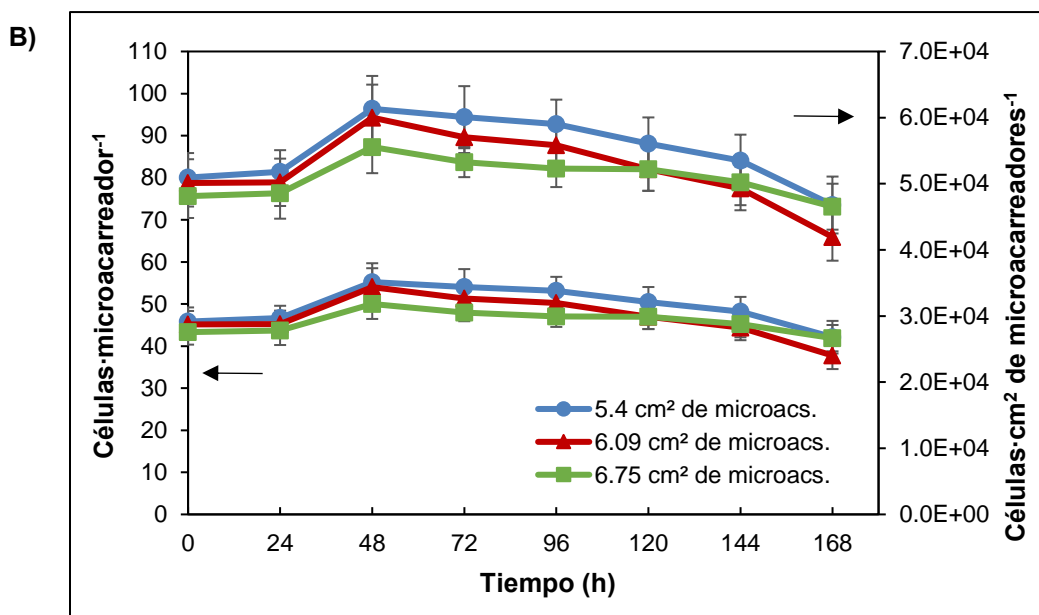


**Figura 19. Micrografías PVs diferenciadas en monocapa, y microvasculatura, identificadas por inmunocitoquímica.** Co-expresión de Faloidina-FITC (verde) y el factor de Von Willebrand- TRITC (rojo), en estructuras microvasculares, posterior a un proceso de diferenciación por 30 días realizando cambio de medio cada 3 y 6 días. Escala representa 50 µm.

### 6.1.5 Prueba de adhesión inicial de PVs a microacarreadores

Una vez que las células derivadas de sangre periférica fueron caracterizadas por inmunofenotipo y capacidad de vasculogénesis, estas se emplearon en las pruebas preliminares para su adhesión a los microacarreadores. Como se indicó anteriormente, en esta etapa se evaluó la adhesión celular a la superficie de los microacarreadores, empleando distintas densidades celulares, tres distintas áreas de microacarreadores y dos condiciones de agitación inicial (50 y 60 rpm). En la condición de  $1.5 \times 10^5$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 5.4 cm<sup>2</sup> de microacarreadores a 50 rpm, se adhirieron 40,396 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores (45 células·microacarreador<sup>-1</sup>); empleando  $1.5 \times 10^5$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 6.09 cm<sup>2</sup> de microacarreadores a 50 rpm, se adhirieron 36,996 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores (45 células·microacarreador<sup>-1</sup>) y con  $1.5 \times 10^5$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores a 50 rpm, se adhirieron 35,474 células·cm<sup>2</sup> (43 células·microacarreador<sup>-1</sup>) (Figura 20-A). Se encontró que independientemente de la condición de agitación inicial, la densidad celular inicial fue muy alta con relación a la cantidad de microacarreadores, por lo que la expansión celular en la superficie de estos fue mínima, desde el tiempo inicial de la cinética (0h), presentándose a las 48h el pico máximo de crecimiento celular, observándose un ligero decaimiento posterior a este tiempo, hasta las 168h, sin embargo, no se observaron diferencias entre cada tiempo (Figura 20-B).

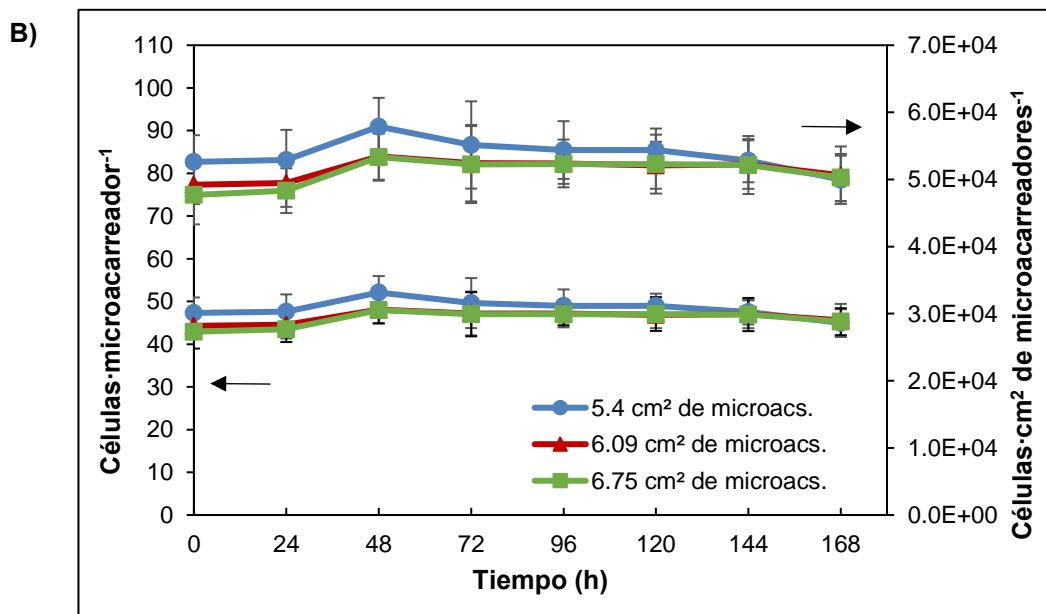
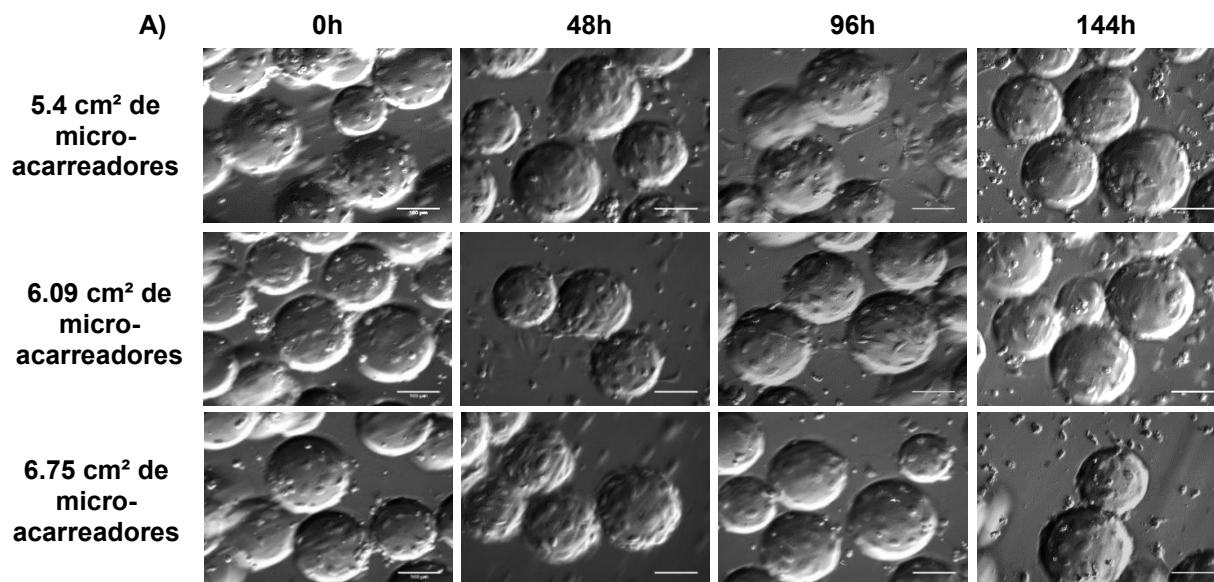




**Figura 20. Micrografías de PVs unidas a microcarreadores y su cinética de crecimiento, en la condición de  $1.5 \times 10^5$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 5.4, 6.09 y 6.75 cm<sup>2</sup> de microcarreadores y 50rpm de agitación inicial. A) Representación del crecimiento de las PVs en la superficie de microcarreadores, evaluando distintas densidades de estos. B) Demostración del número de células·microcarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microcarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 168h de cultivo, con relación a distintas densidades de microcarreadores en cm<sup>2</sup>.**

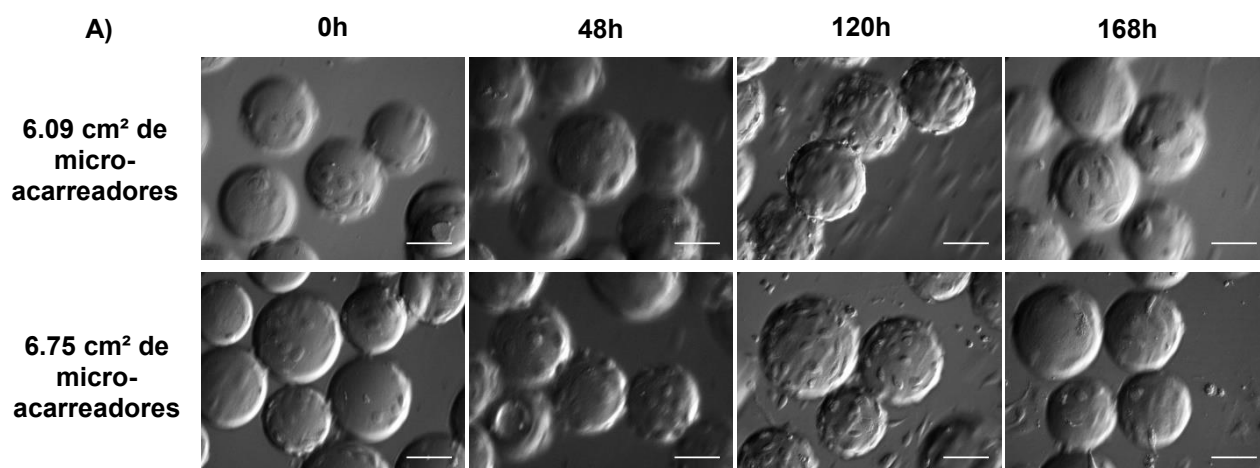
En cuanto a la condición de  $1.5 \times 10^5$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 5.4 cm<sup>2</sup> de microcarreadores a 60 rpm, se adhirieron 47,773 células·cm<sup>2</sup> de microcarreadores (47 células·microcarreador<sup>-1</sup>); empleando  $1.5 \times 10^5$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 6.09 cm<sup>2</sup> de microcarreadores a 60 rpm, se adhirieron 32,774 células·cm<sup>2</sup> de microcarreadores (44 células·microcarreador<sup>-1</sup>) y con  $1.5 \times 10^5$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 6.75 cm<sup>2</sup> de microcarreadores a 60 rpm, se adhirieron 35,885 células·cm<sup>2</sup> (42 células·microcarreador<sup>-1</sup>) (Figura 21-A). En esta condición, se determinó que al igual que en la prueba de agitación anterior, la densidad celular inicial fue muy alta, con relación a la cantidad de microcarreadores, por lo que la expansión celular en la superficie de estos fue mínima, desde el tiempo inicial de la cinética, presentándose a las 48h el pico máximo de crecimiento (57,883 células·cm<sup>2</sup> de microcarreadores [5.4 cm<sup>2</sup> de microcarreadores], 53,439 células·cm<sup>2</sup> de microcarreadores [6.09 cm<sup>2</sup> de microcarreadores] y 53,328 células·cm<sup>2</sup> de microcarreadores [6.75 cm<sup>2</sup> de microcarreadores]), observándose un ligero decaimiento y encontrando células muertas

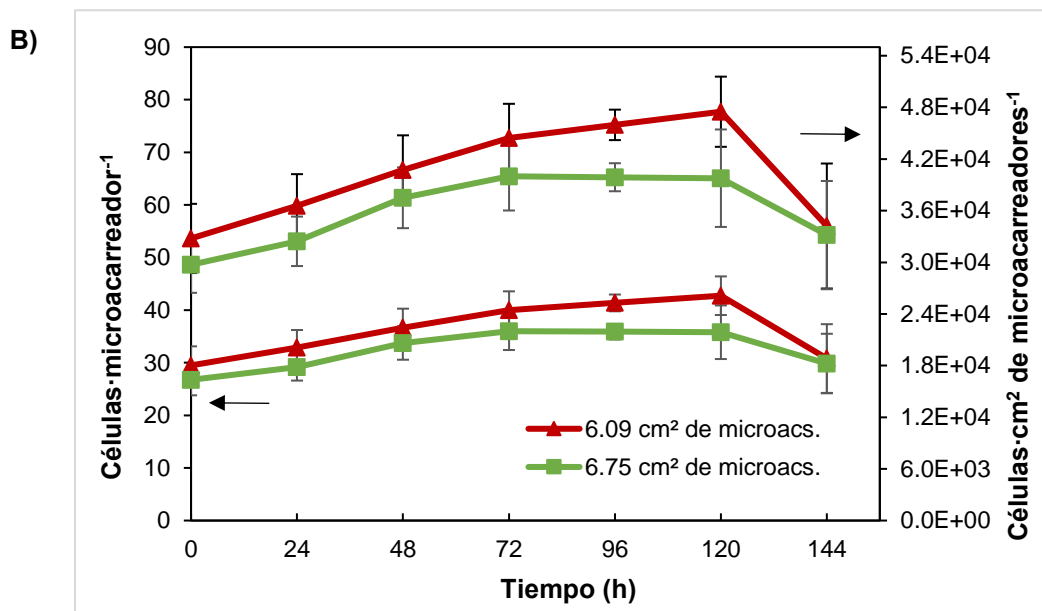
posterior a este momento, hasta las 168h, sin embargo, no se observaron diferencias entre cada tiempo (Figura 21-B).



**Figura 21. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores y su cinética de crecimiento, en la condición de  $1.5 \times 10^5$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 5.4, 6.09 y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores y 60rpm de agitación inicial. A) Representación del crecimiento de las PVs en la superficie de microacarreadores, evaluando distintas densidades de estos. B) Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 168h de cultivo, con relación a distintas densidades de microacarreadores en cm<sup>2</sup>.**

Al no haber encontrado diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre cada área de microacarreadores empleada hasta este punto, nos permitió decidir el emplear en los experimentos posteriores, solo las dos cantidades más grandes de microacarreadores (6.09 y 6.75  $\text{cm}^2$  de microacarreadores), además de que se consideró emplear sólo la condición de 50rpm para la adhesión inicial, en las siguientes pruebas, pues tampoco se observó que la velocidad para la adhesión inicial, tuviera algún efecto sobre el crecimiento. Empleando una densidad de  $1.1 \times 10^5$  células·mililitro<sup>-1</sup> y 6.09  $\text{cm}^2$  de microacarreadores, se adhirieron 37,907 células· $\text{cm}^2$  de microacarreadores (29 células células· microacarreador<sup>-1</sup>) y con  $1.1 \times 10^5$  células·mililitro<sup>-1</sup> y 6.75  $\text{cm}^2$  de microacarreadores a 50 rpm, se adhirieron 29,719 células· $\text{cm}^2$  (26 células· microacarreador<sup>-1</sup>) (Figura 22- A). En esta prueba, se observó un comportamiento del crecimiento celular similar al encontrado con las condiciones anteriores, en donde la densidad celular fue muy alta en relación a la cantidad de microacarreadores, por lo que la expansión celular en la superficie de estos fue mínima, desde el tiempo inicial de la cinética, presentándose a las 120h el pico máximo de crecimiento (47,495 células· $\text{cm}^2$  de microacarreadores [6.09  $\text{cm}^2$  de microacarreadores] y 39,773 células· $\text{cm}^2$  de microacarreadores [6.75  $\text{cm}^2$  de microacarreadores]), observándose un ligero decaimiento encontrando células muertas posterior a este momento, este experimento se concluyó a las 144h de cultivo. No se observaron diferencias entre cada tiempo de la cinética de crecimiento (Figura 22-B).

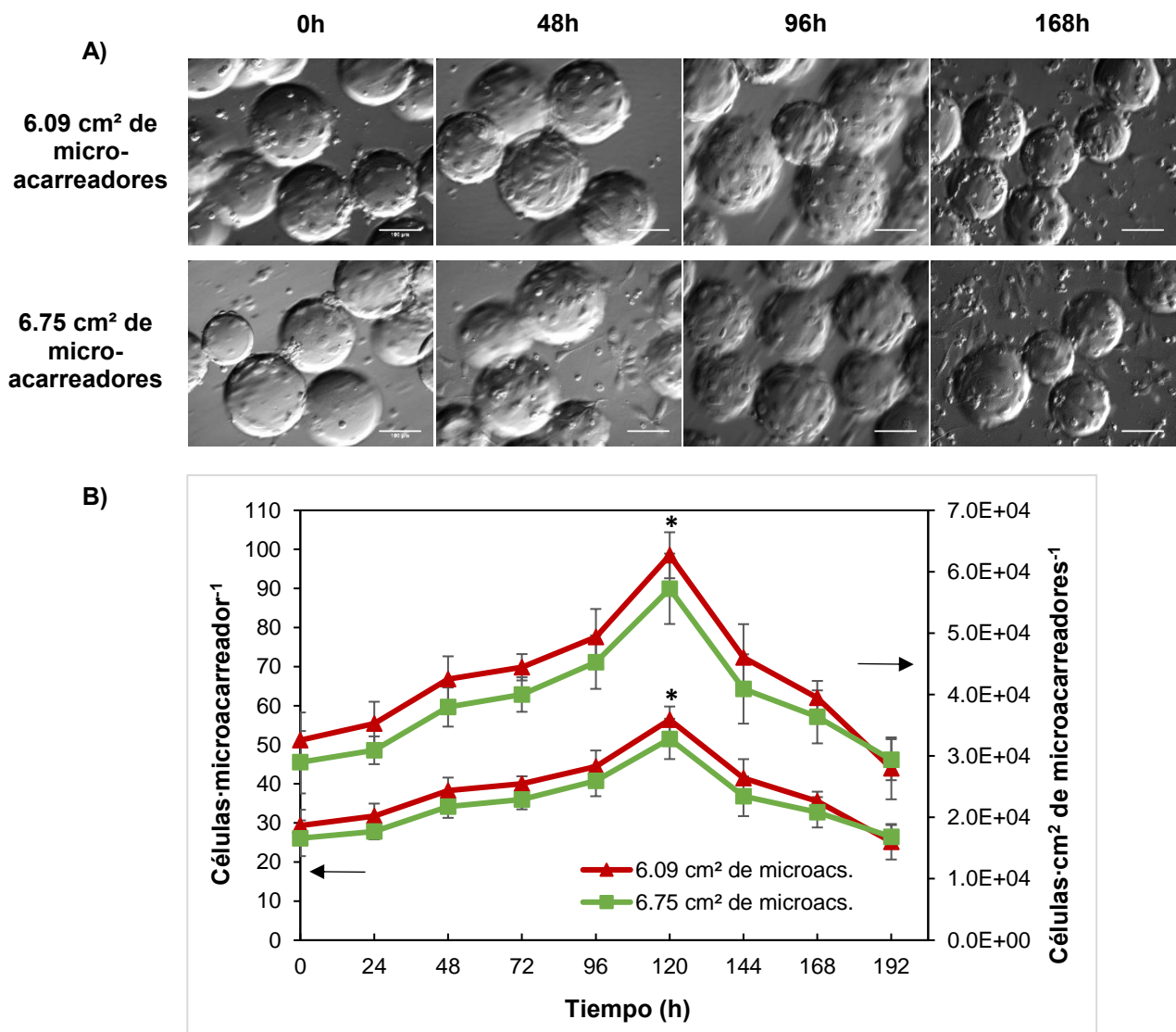




**Figura 22. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores y su cinética de crecimiento, en la condición de  $1.1 \times 10^5$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 6.09 y 6,75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores y 50rpm de agitación inicial. A) Representación del crecimiento de las PVs en la superficie de microacarreadores, evaluando distintas densidades de estos. B) Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 144h de cultivo, con relación a distintas densidades de microacarreadores en cm<sup>2</sup>.**

Con una densidad de  $9 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup> y 6.09 cm<sup>2</sup> de microacarreadores, se adhirieron 29,256 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores (29 células·microacarreador<sup>-1</sup>) y con  $9 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup> y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores a 50 rpm, se adhirieron 27,134 células·cm<sup>2</sup> de microacareadores (26 células·microacarreador<sup>-1</sup>) (Figura 23-A). En esta siguiente condición, con una densidad celular inicial menor, se observó una tendencia de crecimiento celular positivo, desde el inicio de la cinética, en donde el punto máximo de expansión celular fueron las 120h (62,678 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores [6.09 cm<sup>2</sup> de microacarreadores] y 57,216 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores [6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores]) observándose un decaimiento y encontrando células muertas posterior a este momento, hasta las 192h del término del cultivo. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) a las 120h, con relación a los otros tiempos de la cinética de crecimiento (Figura 23-B).

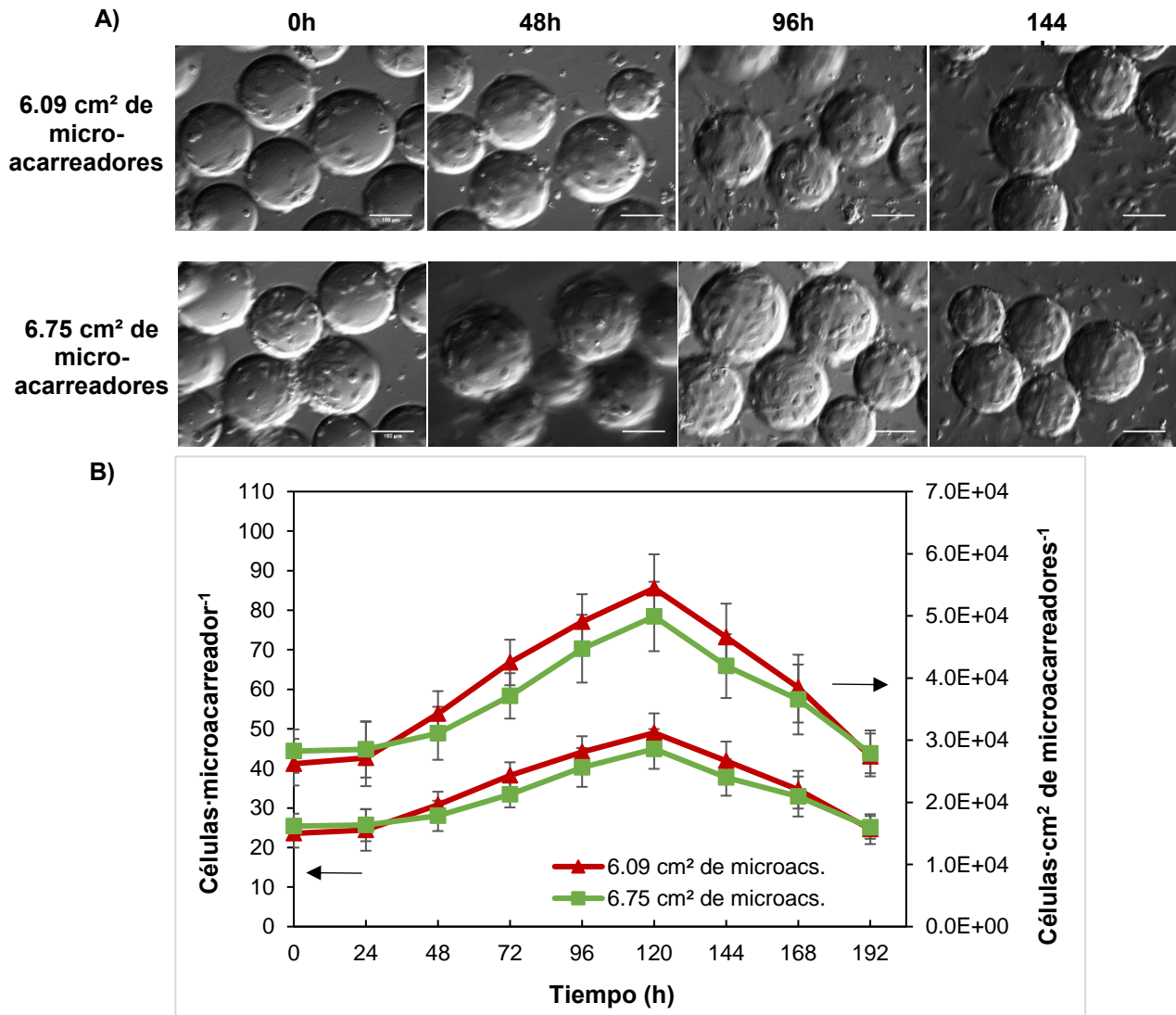




**Figura 23. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores y su cinética de crecimiento, en la condición de  $9 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 6.09 y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores y 50rpm de agitación inicial. A)** Representación del crecimiento de las PVs en la superficie de microacarreadores, evaluando distintas densidades de estos. **B)** Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 192h de cultivo, con relación a distintas densidades de microacarreadores en cm<sup>2</sup>.

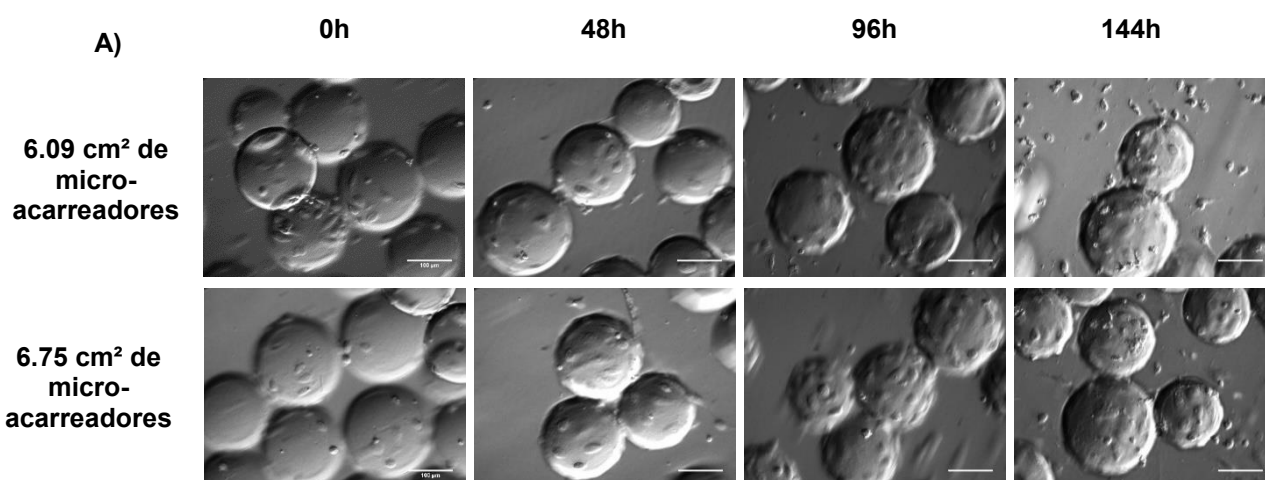
Empleando una densidad de  $7 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup> y 6.09 cm<sup>2</sup> de microacarreadores, se adhirieron 26,201 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores y con  $7 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup> y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores a 50 rpm, se adhirieron 28,237 células·cm<sup>2</sup> (Figura 24-A). En esta condición, al igual que la prueba anterior, se observó una tendencia de crecimiento celular positivo, desde el inicio de la cinética, en donde el punto máximo de expansión

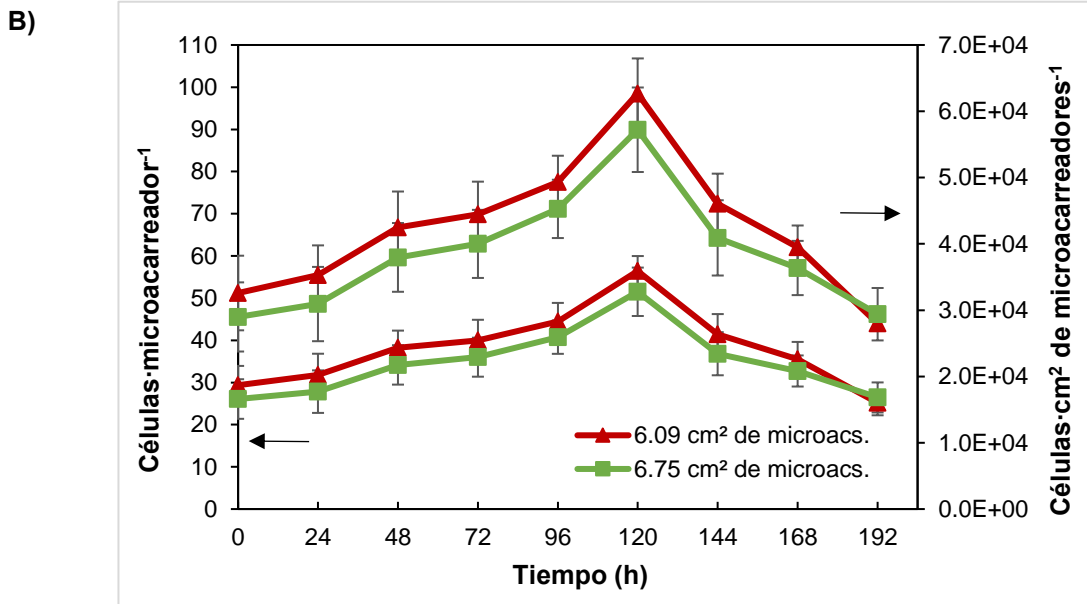
celular fueron las 120h (54,439 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores [6.09 cm<sup>2</sup> de microacarreadores] y 49,902 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores [6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores]) observándose un decaimiento y encontrando células muertas posterior a este momento, hasta las 192h del término del cultivo. Se encontraron diferencias significativas a las 120h, con relación a los otros tiempos de la cinética de crecimiento (Figura 24-B).



**Figura 24. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores y su cinética de crecimiento, en la condición de  $7 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 6.09 y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores y 50rpm de agitación inicial. A) Representación del crecimiento de las PVs en la superficie de microacarreadores, evaluando distintas densidades de estos. B) Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 192h de cultivo, con relación a distintas densidades de microacarreadores en cm<sup>2</sup>.**

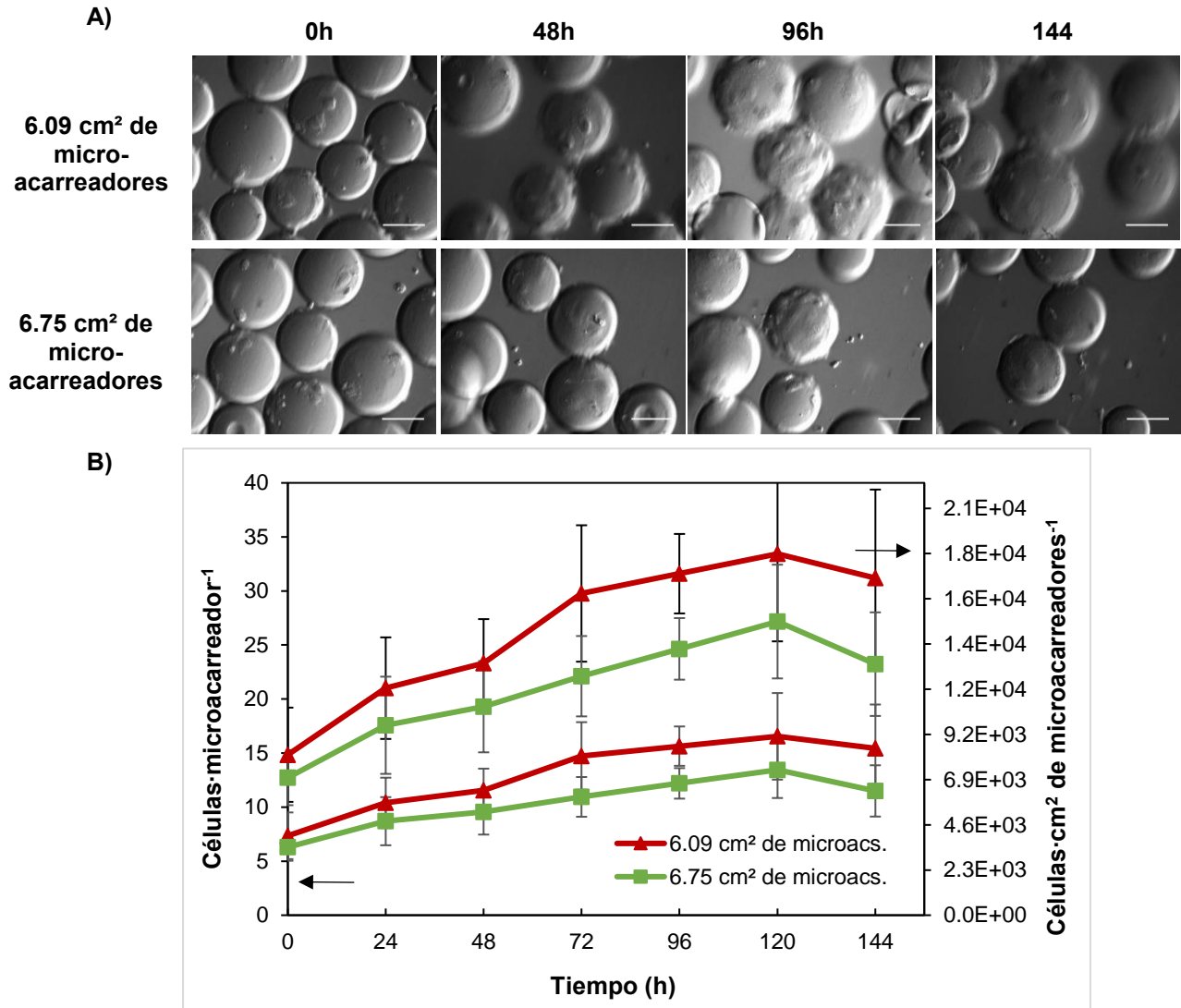
Con una densidad de  $5 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup> y 6.09 cm<sup>2</sup> de microacarreadores, se adhirieron 20,183 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores y con  $5 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup> y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores a 50 rpm, se adhirieron 16,665 células·cm<sup>2</sup> (Figura 25- A). En esta siguiente condición, con una densidad celular inicial menor, se observó una tendencia de crecimiento celular positivo, desde el inicio de la cinética, en donde el punto máximo de expansión celular fueron las 120h (62,678 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores [6.09 cm<sup>2</sup> de microacarreadores] y 57,216 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores [6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores]) observándose un decaimiento y encontrando células muertas posterior a este momento, hasta las 192h del término del cultivo. Se encontraron diferencias significativas a las 120h, con relación a los otros tiempos de la cinética de crecimiento (Figura 25-B).





**Figura 25. Micrografías de CPEs unidas a microcarreadores y su cinética de crecimiento, en la condición de  $5 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 6.09 y 6.75 cm<sup>2</sup> de microcarreadores y 50 rpm de agitación inicial. A) Representación del crecimiento de las PVs en la superficie de microcarreadores, evaluando distintas densidades de estos. B) Demostración del número de células·microcarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microcarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 192h de cultivo, con relación a distintas densidades de microcarreadore en cm<sup>2</sup>.**

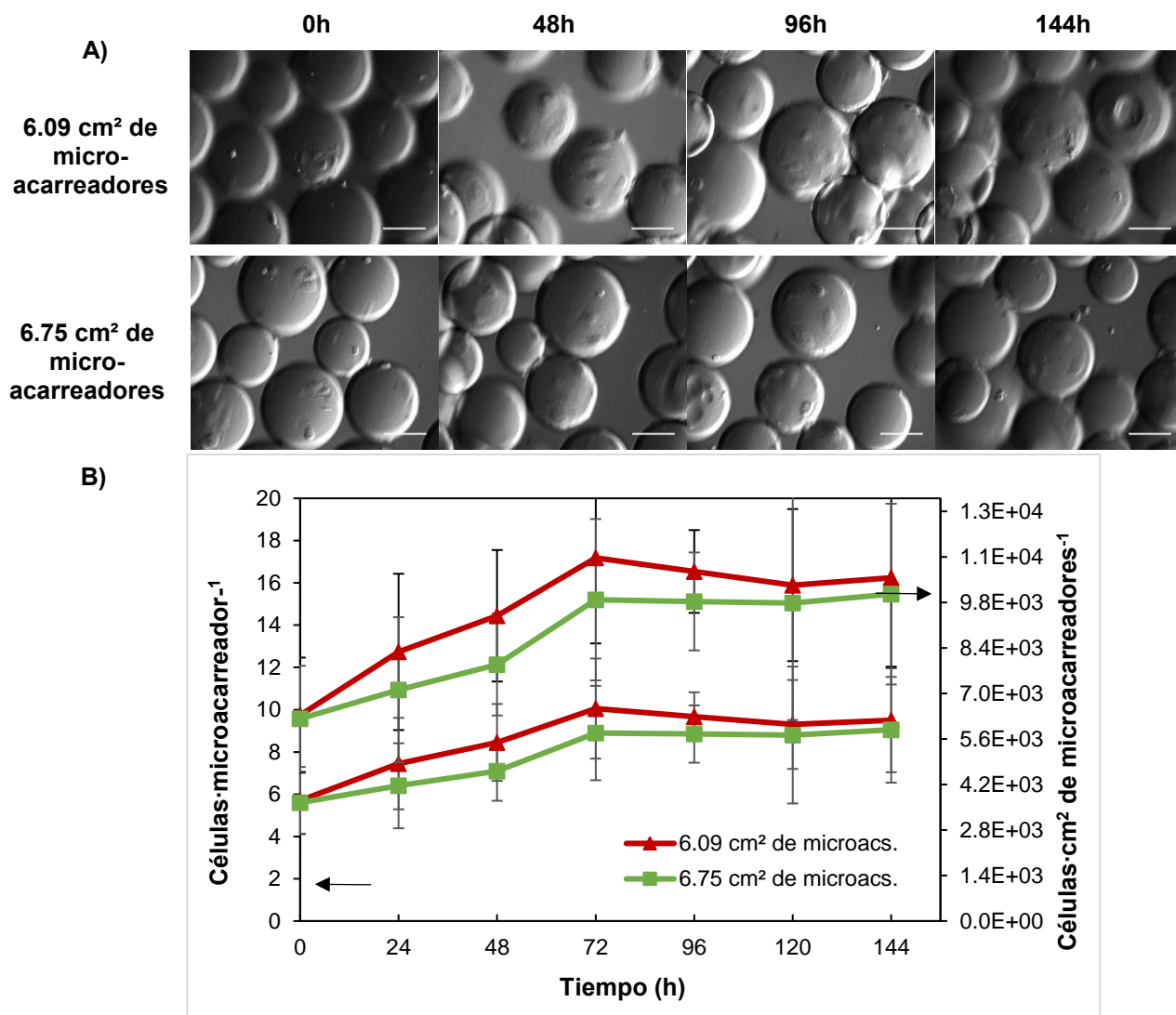
Con una densidad de  $4 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup> y 6.09 cm<sup>2</sup> de microcarreadores, se adhirieron 6,999 células·cm<sup>2</sup> de microcarreadores y con  $4 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup> y 6.75 cm<sup>2</sup> de microcarreadores a 50 rpm, se adhirieron 8,165 células·cm<sup>2</sup> (Figura 26-A). En esta condición, se observó que la densidad celular inicial utilizada fue baja, con relación al número de microcarreadores, en donde el punto máximo de expansión celular fueron las 120h (18,387 células·cm<sup>2</sup> de microcarreadores [6.09 cm<sup>2</sup> de microcarreadores] y 14,942 células·cm<sup>2</sup> de microcarreadores [6.75 cm<sup>2</sup> de microcarreadores]), observándose un decaimiento posterior a este momento, este experimento se concluyó a las 144h de cultivo. No se observaron diferencias entre cada tiempo de la cinética de crecimiento (Figura 26-B).



**Figura 26. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores y su cinética de crecimiento, en la condición de  $4 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 6.09 y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores y 50rpm de agitación inicial. A) Representación del crecimiento de las PVs en la superficie de microacarreadores, evaluando distintas densidades de estos. B) Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo  $\leftarrow$ ) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho  $\rightarrow$ ), a lo largo de 192h de cultivo, con relación a distintas densidades de microacarreadores en cm<sup>2</sup>.**

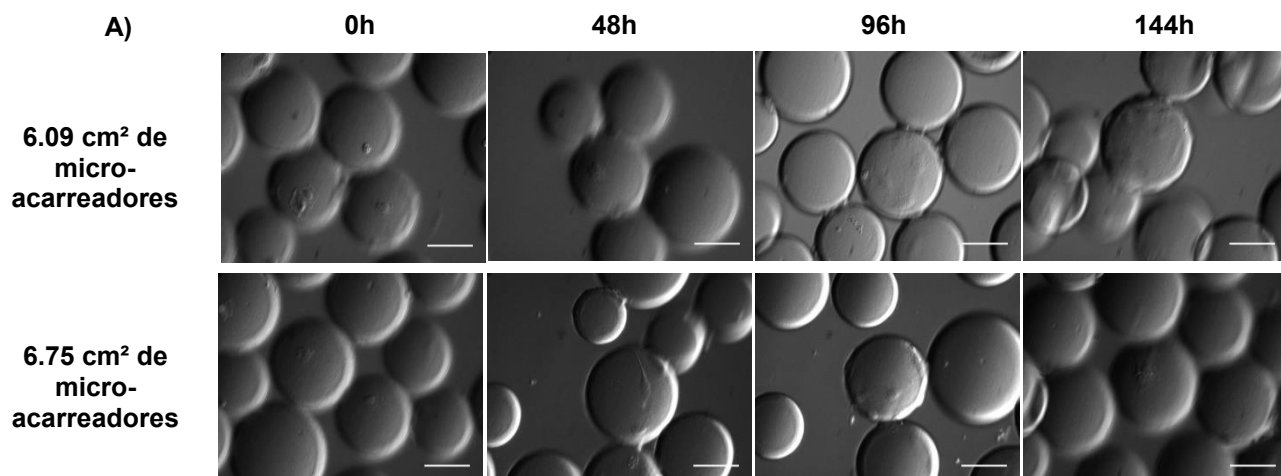
Con una densidad de  $3 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup> y 6.09 cm<sup>2</sup> de microacarreadores, se adherieron 6,332 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores y con  $3 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup> y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores a 50 rpm, se adherieron 6,221 células·cm<sup>2</sup> (Figura 27-A). En esta condición, se observó que la densidad celular inicial utilizada demasiado baja, con relación

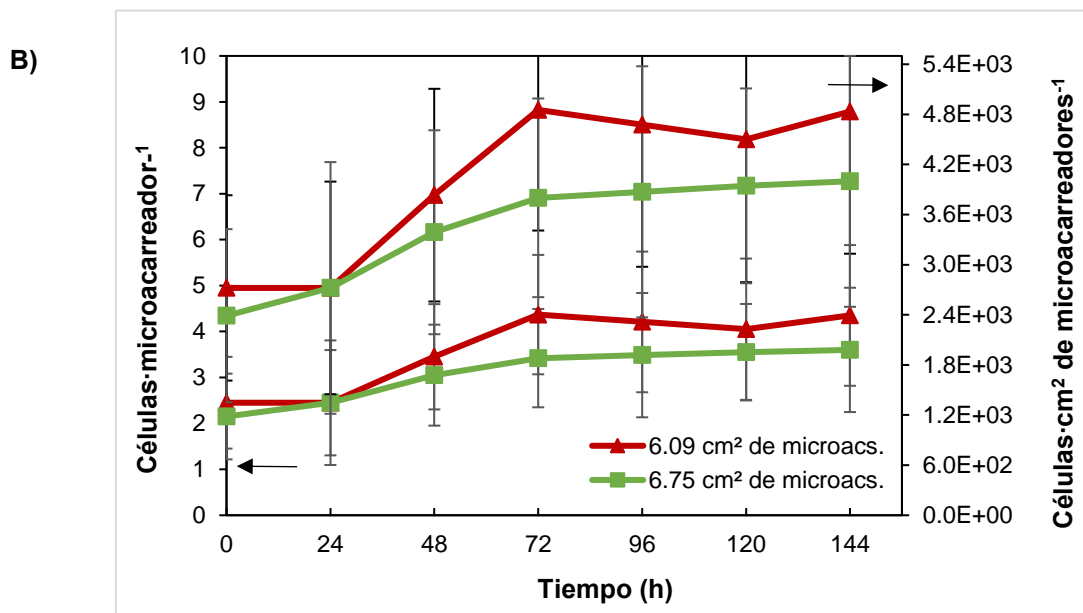
al número de microacarreadores, en donde el punto máximo de expansión celular fueron las 72h (11,168 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores [6.09 cm<sup>2</sup> de microacarreadores] y 9,882 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores [6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores]), observándose un ligero decaimiento posterior a este momento, este experimento se concluyó a las 144h de cultivo. No se observaron diferencias entre cada tiempo de la cinética de crecimiento (Figura 27-B).



**Figura 27. Micrografías de CPEs unidas a microacarreadores y su cinética de crecimiento, en la condición de  $3 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 6.09 y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores y 50rpm de agitación inicial. A) Representación del crecimiento de las PVs en la superficie de microacarreadores, evaluando distintas densidades de estos. B) Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 192h de cultivo, con relación a distintas densidades de microacarreadores en cm<sup>2</sup>.**

Con una densidad de  $1 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup> y 6.09 cm<sup>2</sup> de microacarreadores, se adhirieron 2,721 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores y con  $1 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup> y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores a 50 rpm, se adhirieron 2,388 células·cm<sup>2</sup> (Figura 28-A). En esta condición, al igual que en la última prueba, se observó que la densidad celular inicial utilizada fue muy baja, con relación al número de microacarreadores, en donde el punto máximo de expansión celular fueron las 72h (4,853 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores [6.09 cm<sup>2</sup> de microacarreadores] y 3,800 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores [6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores]), posterior a este tiempo, se observó un mantenimiento de la densidad celular hasta las a las 144h en que concluyó el cultivo. No se observaron diferencias entre cada tiempo de la cinética de crecimiento (Figura 28-B).



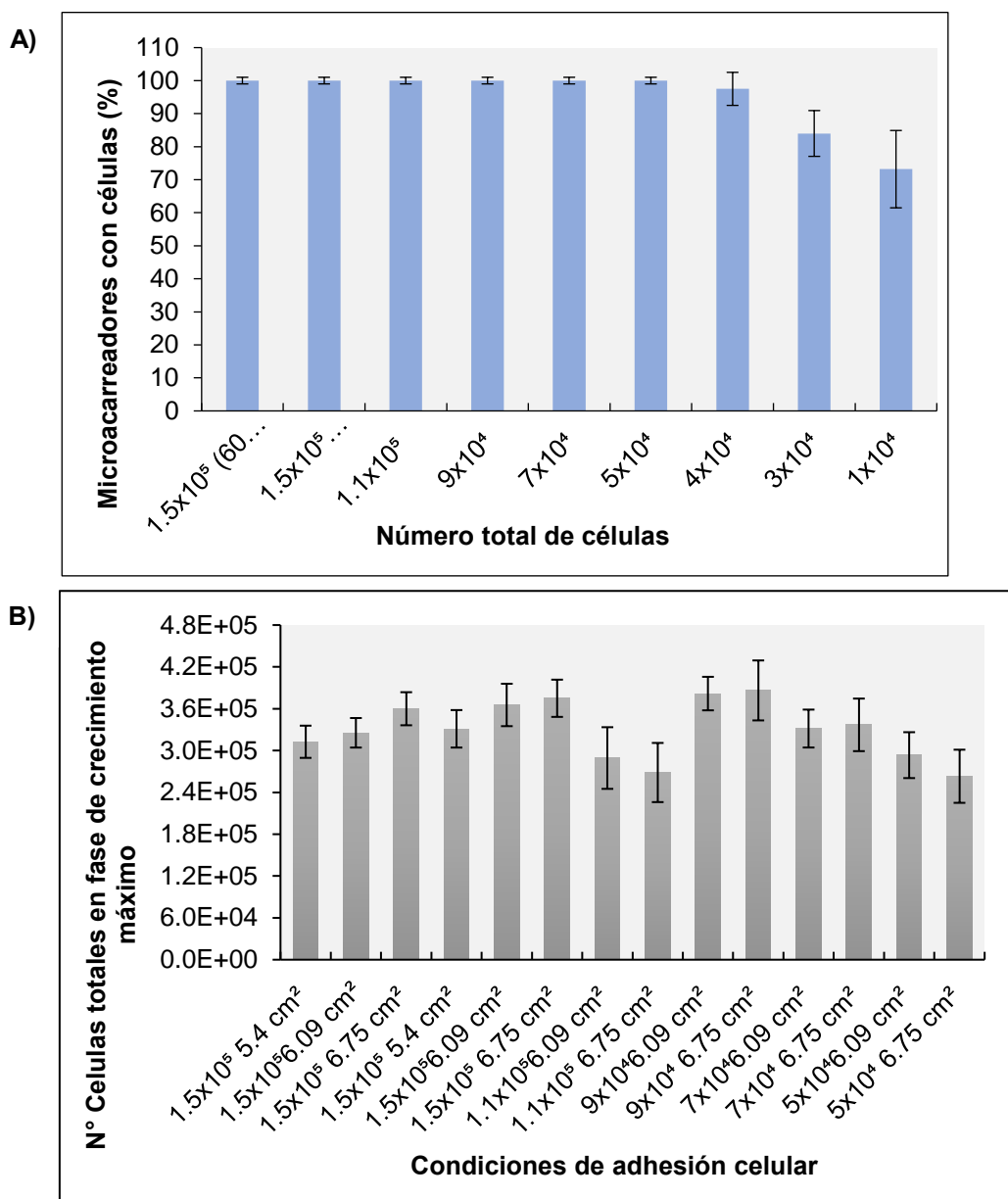


**Figura 28. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores y su cinética de crecimiento, en la condición de  $1 \times 10^4$  células·mililitro<sup>-1</sup>, 6.09 y 6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores y 50rpm de agitación inicial. A) Representación del crecimiento de las PVs en la superficie de microacarreadores, evaluando distintas densidades de estos. B) Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 192h de cultivo, con relación a distintas densidades de microacarreadores en cm<sup>2</sup>.**

Para determinar la mejor condición de adhesión, primero fue necesario comparar el porcentaje de microacarreadores contabilizados, que presentó al menos una célula adherida a su superficie, en relación con cada una de las densidades celulares empleadas, principalmente, por que se encontró que en las condiciones de  $1 \times 10^4$  a  $4 \times 10^4$  células iniciales, el porcentaje de microacareadores con al menos una célula en su superficie fue de entre el 73-97%, siendo el intervalo de condiciones de entre  $5 \times 10^4$ - $1.5 \times 10^5$  células iniciales, en el que el 100% de microacareadores contabilizados, presentaron al menos una célula anclada a su superficie, siendo esto necesario, para asegurar al menos el crecimiento celular en todos los microacarreadores, en los siguientes experimentos (Figura 29-A). Para el segundo análisis se comparó el número total de células obtenidas en fase de crecimiento máximo, de las condiciones de densidades de células iniciales ( $5 \times 10^4$ - $1.5 \times 10^5$ ) en relación con las distintas densidades de microacarreadores en cm<sup>2</sup>. Se determinó que en el intervalo considerado entre las condiciones  $5 \times 10^4$  células·6.75 cm<sup>2</sup> -  $9 \times 10^4$  células·6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores, correspondiente a  $2.63 \times 10^5$ -  $3.81 \times 10^5$  células totales, se encontró la



condición óptima para llevar el experimento a la siguiente fase, pues no se presentaron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), con relación a las condiciones con las densidades celulares más altas, eventualmente se eligieron las condiciones de  $5 \times 10^4$  y  $7 \times 10^4$  células- $6.75 \text{ cm}^2$  de microacarreadores, como las condiciones óptimas para iniciar la fase de agitación constante (Figura 29-B).



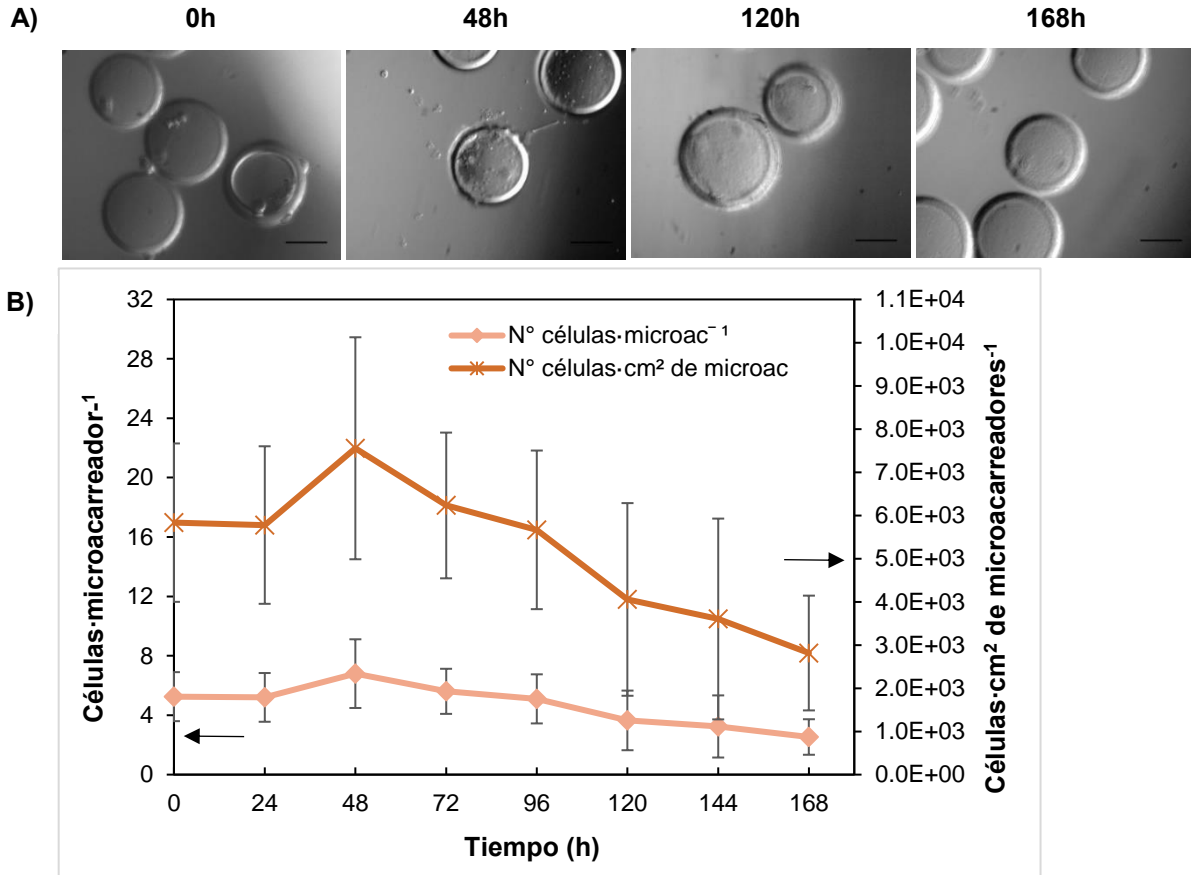
**Figura 29. Porcentaje de microacarreadores con células y número de células en fase de crecimiento máximo. A)** Cantidad de microacarreadores en porcentaje (%), que presentaron al menos una célula adherida a su superficie, posterior a la etapa de adhesión inicial; **B)** Número de células totales en fase estacionaria de la cinética de crecimiento, con relación a las distintas densidades celulares empleadas.

### 6.1.6 Cultivo en suspensión

Posterior a evaluar la expansión de distintas densidades de PVs, empleando diferentes cantidades de microacarreadores, se eligieron las condiciones que se consideraron como las óptimas de esta primera etapa, por lo que el siguiente paso fue evaluar el crecimiento celular empleando estas condiciones mencionadas, sometidas a condiciones de agitación constante. A partir de este punto se ocupó un volumen mayor para el crecimiento celular en suspensión.

Como prueba preliminar se evaluó de manera visual el efecto físico que ejerce la agitación orbital constante sobre un líquido, el cual en este caso fue el agua, por lo que se eligieron las siguientes condiciones para evaluar el crecimiento de las PVs en la superficie de microacarreadores, ahora en agitación constante: 60 RPM, 80 RPM, 100 RPM y 120 RPM.

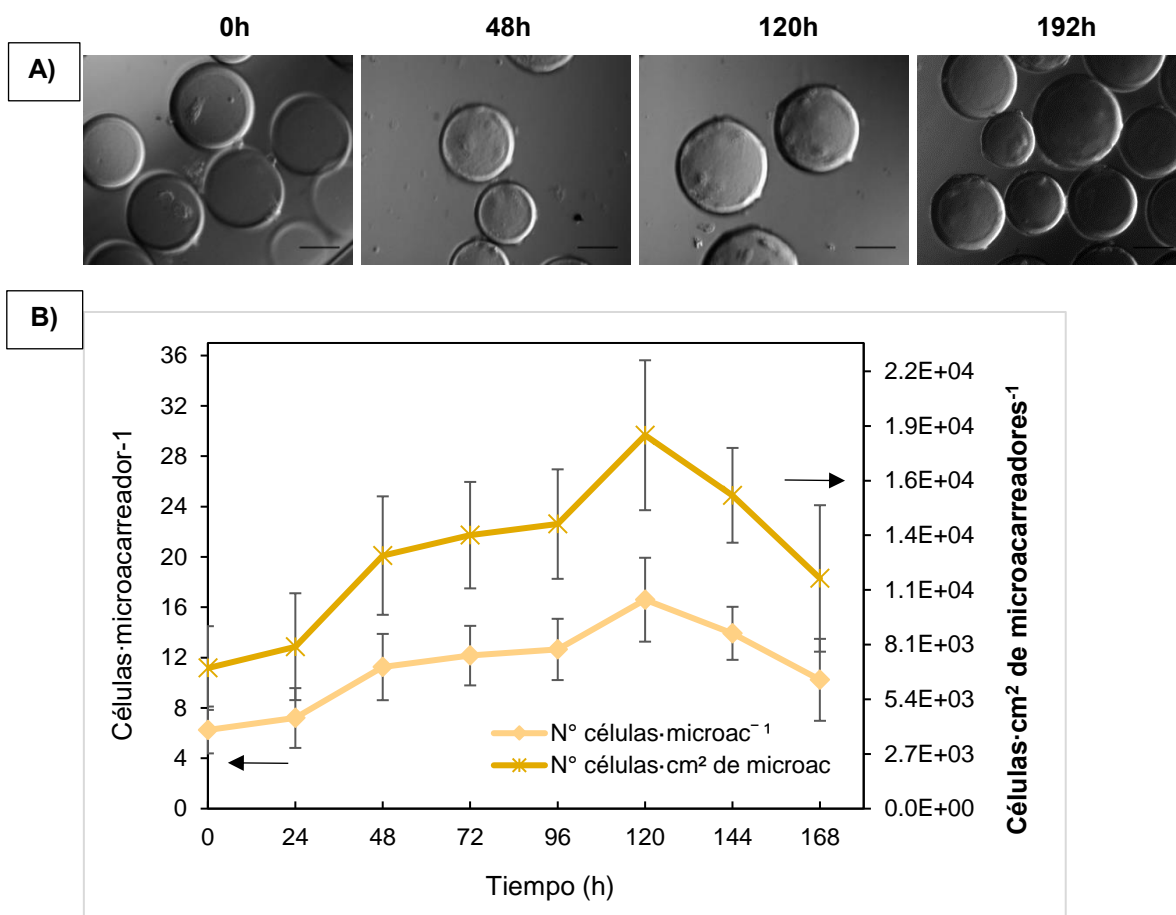
Una vez elegidas las condiciones de agitación constante, se encontró que en la condición de  $5 \times 10^4$  células·6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores ·mililitro<sup>-1</sup>, a 120 rpm, se adhirieron 5,832 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores (5.25 células·microacarreador<sup>-1</sup>), sin embargo, se observó que el punto de expansión celular máxima fue a las 48h, con una densidad de 7,554 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores (6.8 células·microacarreador<sup>-1</sup>). Posterior a este tiempo, la densidad celular decayó, desde las 72h a las 168h, tiempo en que terminó la cinética de proliferación. De acuerdo con que se observó este un crecimiento celular bajo, probablemente debido a la condición de agitación, se decidió no evaluar la otra condición de densidad celular más alta, dando lugar a los experimentos con la siguiente condición de agitación. Se calculó un esfuerzo de corte de 4.82 dyn·cm<sup>-2</sup> para esta condición de agitación (Figura 30).



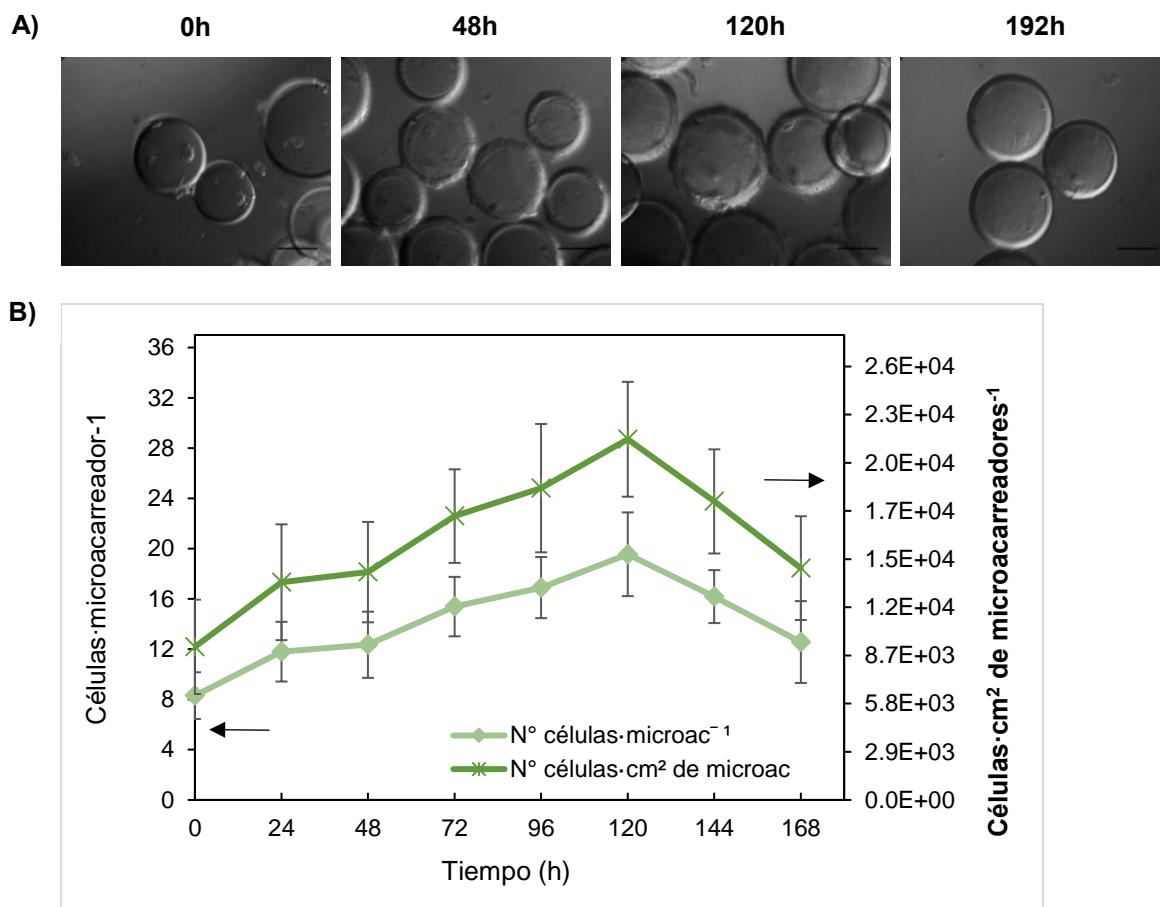
**Figura 30. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores en agitación constante y su cinética de proliferación, en la condición de  $5 \times 10^4$  células·6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores ·mililitro<sup>-1</sup>, a 120 rpm. A)** Representación del crecimiento de los PVs en la superficie de microacarreadores, en cultivo en suspensión a 120 RPM. **B)** Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho ←), a lo largo de 168h de cultivo, con relación a la condición de agitación.

Como se observa en la Figura 31, se encontró que en la condición de  $5 \times 10^4$  células·6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores ·mililitro<sup>-1</sup>, a 100 rpm, a las 0h se adhirieron inicialmente 6,943 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores (6.25 células·microacarreador<sup>-1</sup>), sin embargo, se observó que el punto de expansión celular máxima fue a las 120h, con una densidad de 18,442 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores (16.6 células·microacarreador<sup>-1</sup>), posterior a este tiempo, la densidad celular decayó, en los últimos tiempos de la cinética de proliferación. Lo anterior nos indicó que, a partir de esta condición de agitación constante, el crecimiento celular en la superficie de los microacarreadores fue posible, por lo que se evaluó la siguiente densidad celular. Empleando la condición de  $7 \times 10^4$  células·6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores ·mililitro<sup>-1</sup>, a 100 rpm (Figura 32), a las 0h se adhirieron inicialmente

9,221 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores (8.3 células·microacarreador<sup>-1</sup>), sin embargo, se observó que el punto de expansión celular máxima fue a las 120h, con una densidad de 21,720 células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores (16.6 células·microacarreador<sup>-1</sup>), posterior a este tiempo, la densidad celular decayó, en los últimos tiempos de la cinética de proliferación. Se calculó un esfuerzo de corte de 3.45 dyn·cm<sup>-2</sup>, para esta condición de agitación.

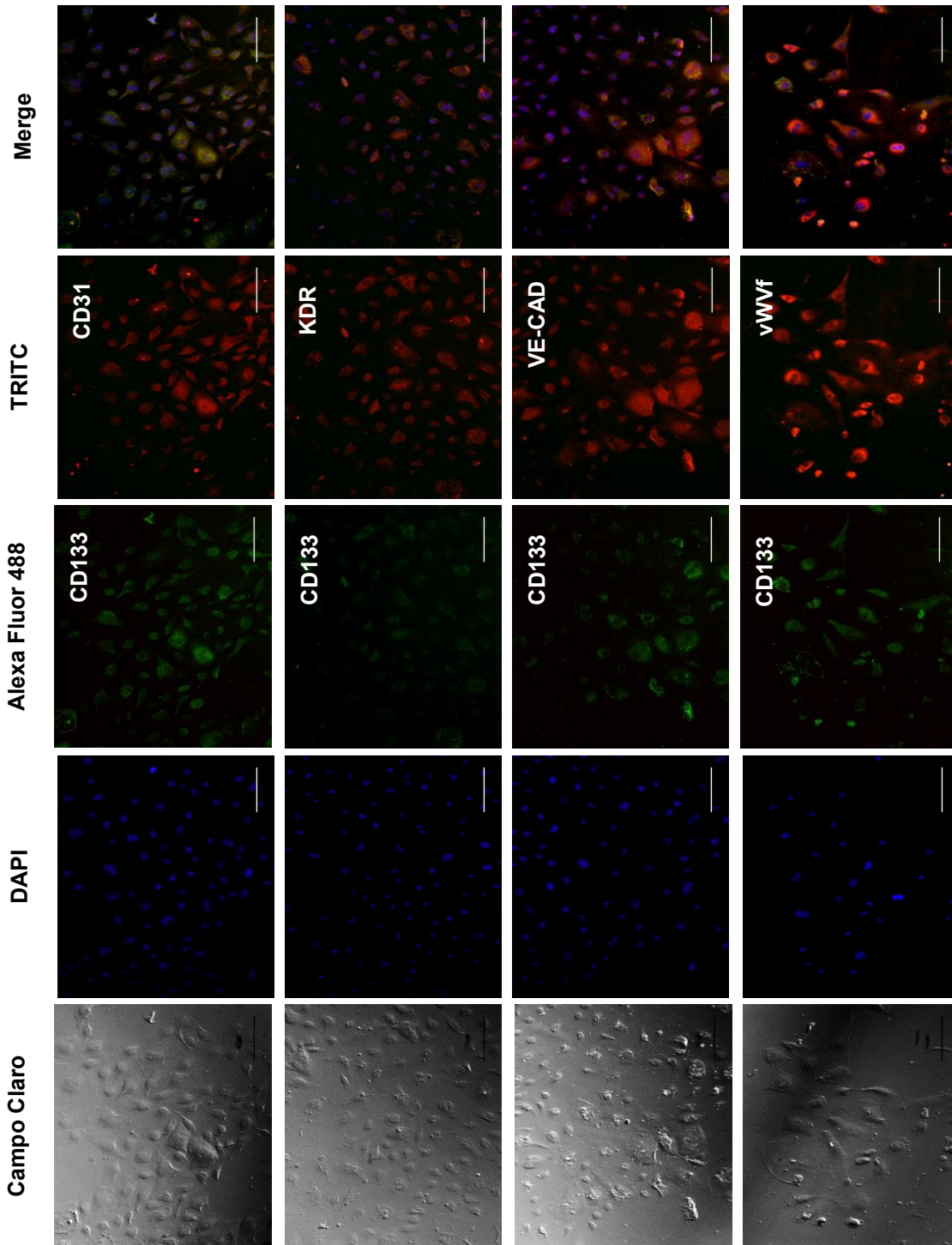


**Figura 31. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores en agitación constante y su cinética de crecimiento, en la condición de  $5 \times 10^4$  células·6.75 cm<sup>2</sup> de microacarreadores ·mililitro<sup>-1</sup>, a 100 rpm. A)** Representación del crecimiento de PVs en la superficie de microacarreadores, en cultivo en suspensión a 100 RPM. **B)** Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo ←) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho →), a lo largo de 168h de cultivo, con relación a la condición de agitación.



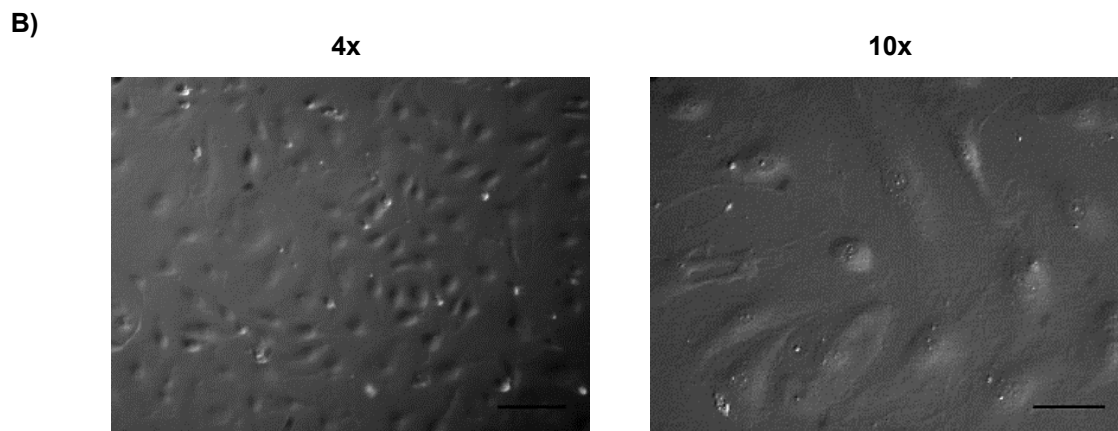
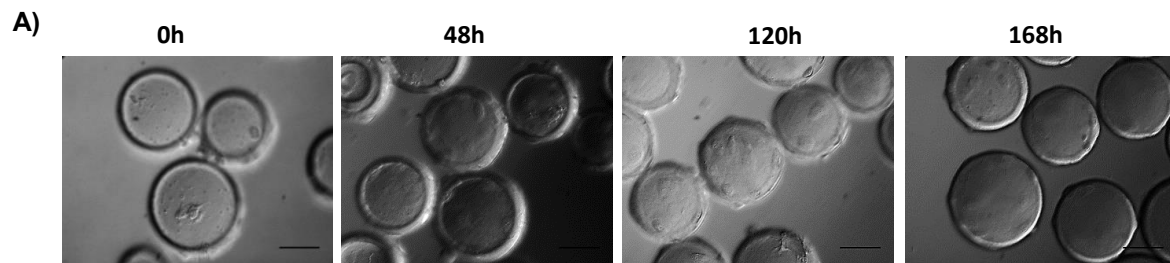
**Figura 32. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores en agitación constante y su cinética de crecimiento, en la condición de  $7 \times 10^4$  células· $6.75 \text{ cm}^2$  de microacarreadores·mililitro<sup>-1</sup>, a 100 rpm** **A)** Representación del crecimiento de PVs en la superficie de microacarreadores, en cultivo en suspensión a 100 RPM. **B)** Demostración del número de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo  $\leftarrow$ ) y células· $\text{cm}^2$  de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho  $\rightarrow$ ), a lo largo de 168h de cultivo, con relación a la condición de agitación.

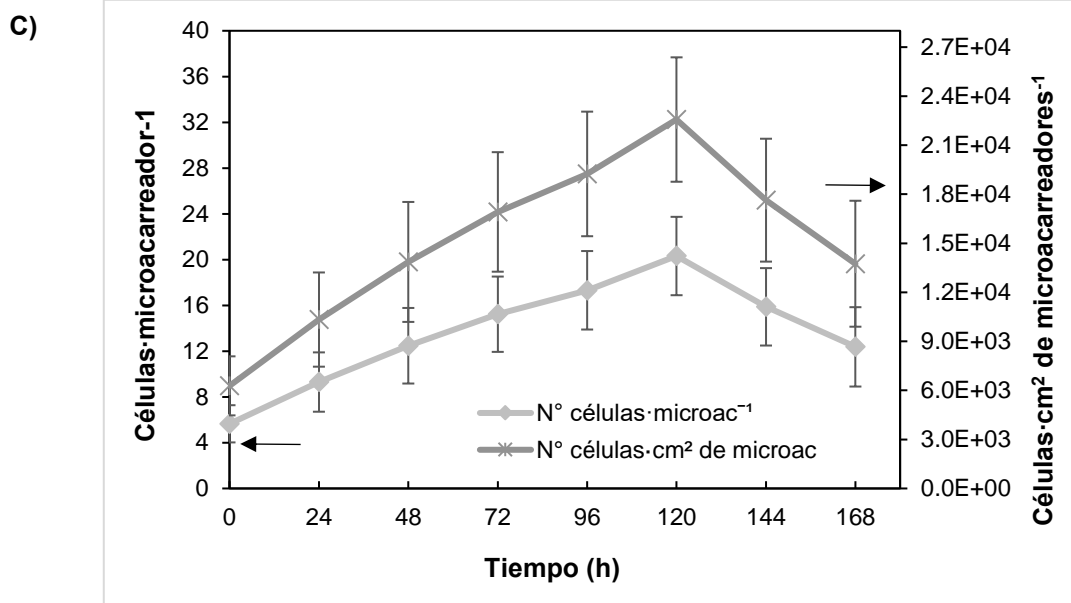
Posterior a la comparación de ambas densidades celulares sometidas a la condición de 100 rpm se determinó que la densidad de  $7 \times 10^4$  células fue la óptima, por lo que se realizó una inmunocitoquímica de estas células en monocapa, posterior a su recuperación de la superficie de los microacarreadores, en la etapa de crecimiento máximo de la cinética de proliferación. Por inmunocitoquímica, se identificó visualmente la co-localización del marcador de membrana CD133 (verde) con los marcadores KDR, PECAM-1, VE-Cadherina, y el factor de Von Willebrand (rojo), resaltando los núcleos celulares con DAPI (azul), por lo que fue muy notable la expresión de estos marcadores, posterior al proceso de agitación constante a 100 rpm, corroborando que estas células, conservaron su condición de progenitor endotelial (Figura 33).



**Figura 33. Micrografías de las PVs recuperadas del cultivo en suspensión a 100 rpm, identificadas por inmunocitoquímica.** Co-expresión de CD133-Alexa Fluor 488 (verde), como marcador de troncalidad y marcadores de linaje endotelial como PECAM-1, KDR, VE-CAD y vWf TRITC- TRICT (rojo). Escala representa 50  $\mu\text{m}$ .

Como se observa en las micrografías de la Figura 34-A, se encontró que en la condición de  $7 \times 10^4$  células  $\cdot 6.75 \text{ cm}^2$  de microacarreadores  $\cdot \text{mililitro}^{-1}$ , a 80 rpm, la expansión de las las PVs en la superficie de los microacarreadores, fue posible en donde a las 0h se adhirieron inicialmente 6,277 células  $\cdot \text{cm}^2$  de microacarreadores ( $5.65$  células  $\cdot \text{microacarreador}^{-1}$ ), sin embargo, se observó que el punto de expansión celular máxima fue a las 120h, con una densidad de 22,569 células  $\cdot \text{cm}^2$  de microacarreadores ( $20.31$  células  $\cdot \text{microacarreador}^{-1}$ ), posterior a este tiempo, la densidad celular decayó, en los últimos tiempos de la cinética de proliferación, semejante a lo ocurrido en la condición de agitación anterior. Posterior a las 120h, tiempo de crecimiento celular máximo, se recuperó una fracción celular de la superficie de los microacarreadores, la cual se re-inoculó en monocapa, comprobando que estas células siguieron presentando una morfología de progenitor endotelial en su mayoría, sin embargo, también se encontró una importante cantidad de células alargadas (Figura 34-B/C). Se calculó un esfuerzo de corte de  $2.52 \text{ dyn} \cdot \text{cm}^{-2}$ , para esta condición de agitación.

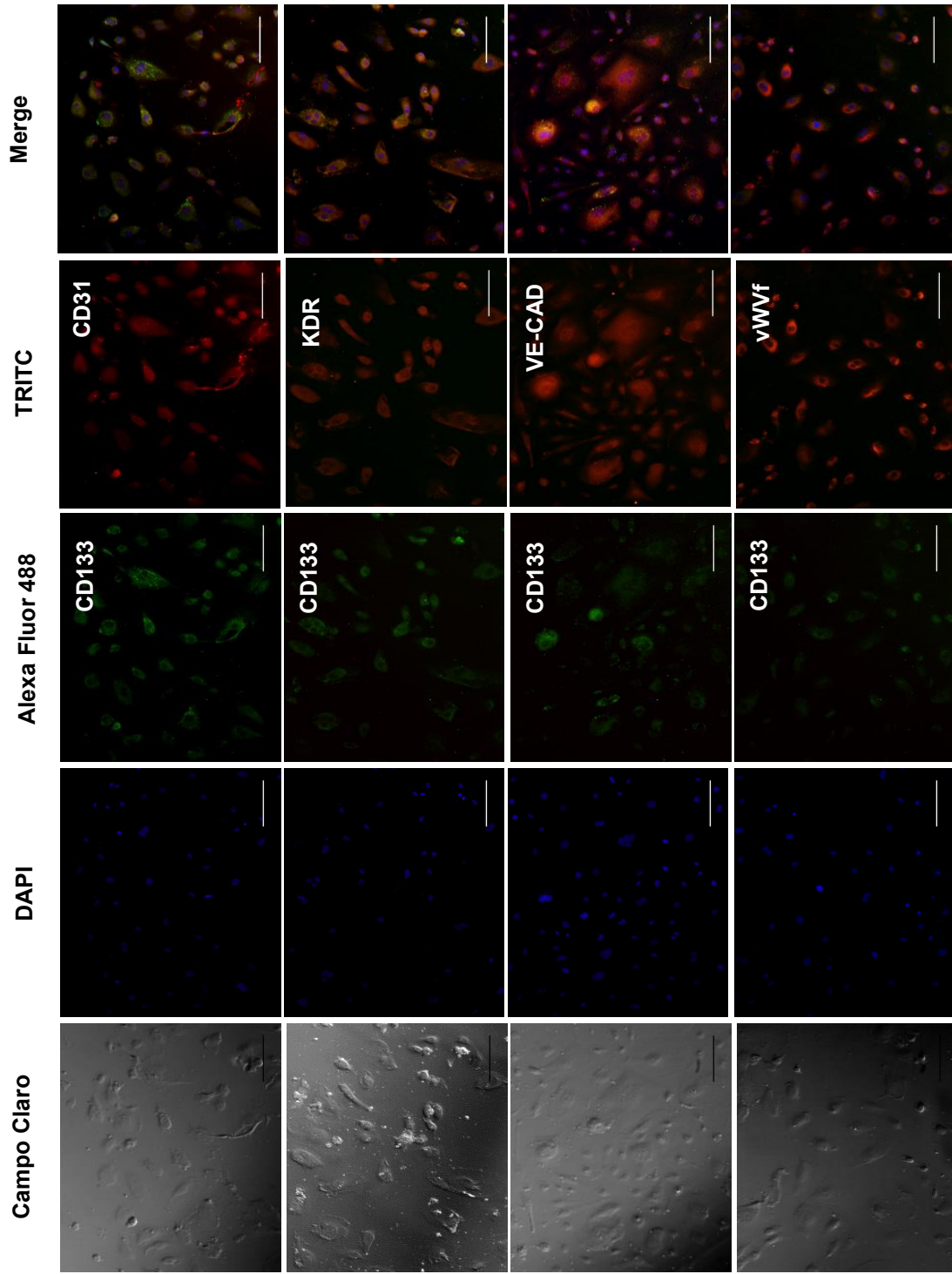




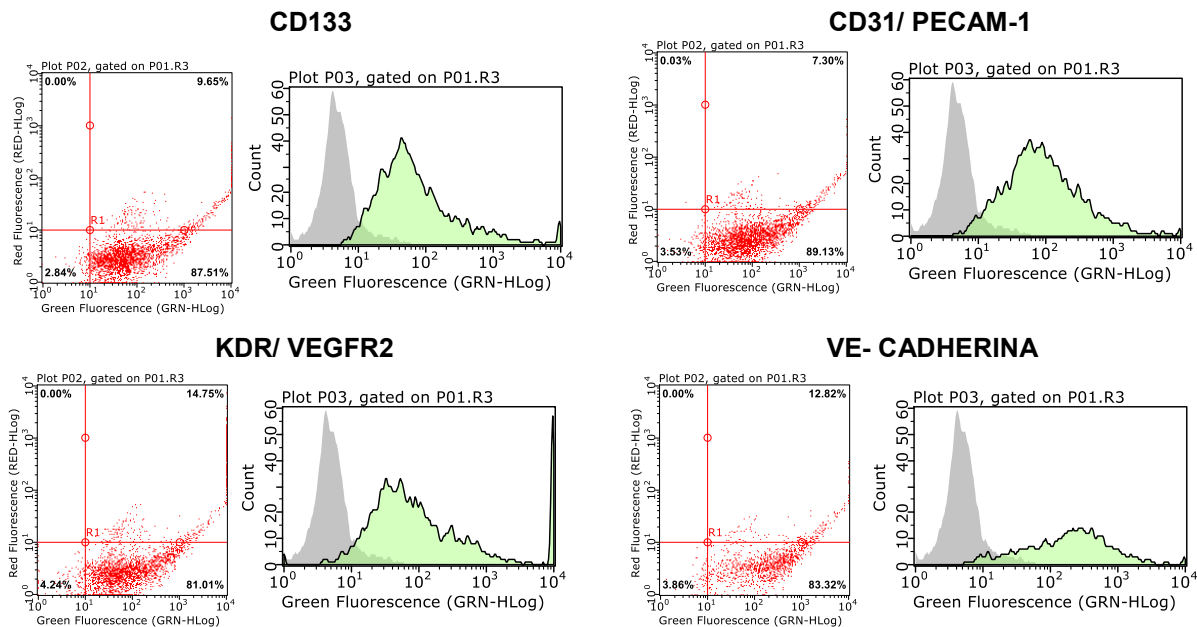
**Figura 34. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores en agitación constante, su cinética de proliferación, en la condición de  $7 \times 10^4$  células· $6.75 \text{ cm}^2$  de microacarreadores ·mililitro<sup>-1</sup>, a 80 rpm, y células recuperadas post agitación** A) Representación de la proliferación de PVs en la superficie de microacarreadores, en cultivo en suspensión a 80 RPM. B) Micrografías de células re-cultivadas en monocapa posterior al cultivo en suspensión, escala representa  $100 \mu\text{m}$  (4x) y  $50 \mu\text{m}$  (10x). C) Se representa la proliferación de células·microacarreador<sup>-1</sup> (eje vertical izquierdo  $\leftarrow$ ) y células·cm<sup>2</sup> de microacarreadores<sup>-1</sup> (eje vertical derecho  $\rightarrow$ ), a lo largo de 168h de cultivo, con relación a la condición de agitación.

Posterior a la recuperación de las PVs de la superficie de los microacarreadores, en la condición de 80 rpms, se identificó visualmente por inmunocitoquímica, la co-localización del marcador de membrana CD133 (verde) con los marcadores KDR, PECAM-1, VE-Cadherina, y el factor de Von Willebrand (rojo), resaltando los núcleos celulares con DAPI (azul), por lo que al igual que en la condición de agitación anterior, la expresión de estos marcadores fue muy notable, corroborando que estas células, conservaron su condición de progenitor endotelial, sin embargo posterior a esta prueba se decidió realizar una citometría de flujo para evaluar el porcentaje de expresión de cada marcador (Figura 35). Por citometría de flujo se determinó que el porcentaje de expresión de al menos 50,000 eventos adquiridos para cada marcador fue muy distinto entre cada uno de estos en comparación al control, encontrando un 87.51% para CD133, 81.01% para KDR, 87.51% para CD31 y un 83.32% para VE- Cadherina, por lo que se confirmó que la expresión de estos marcadores fue alta, corroborado lo encontrado en la inmunocitoquímica (Figura 36).





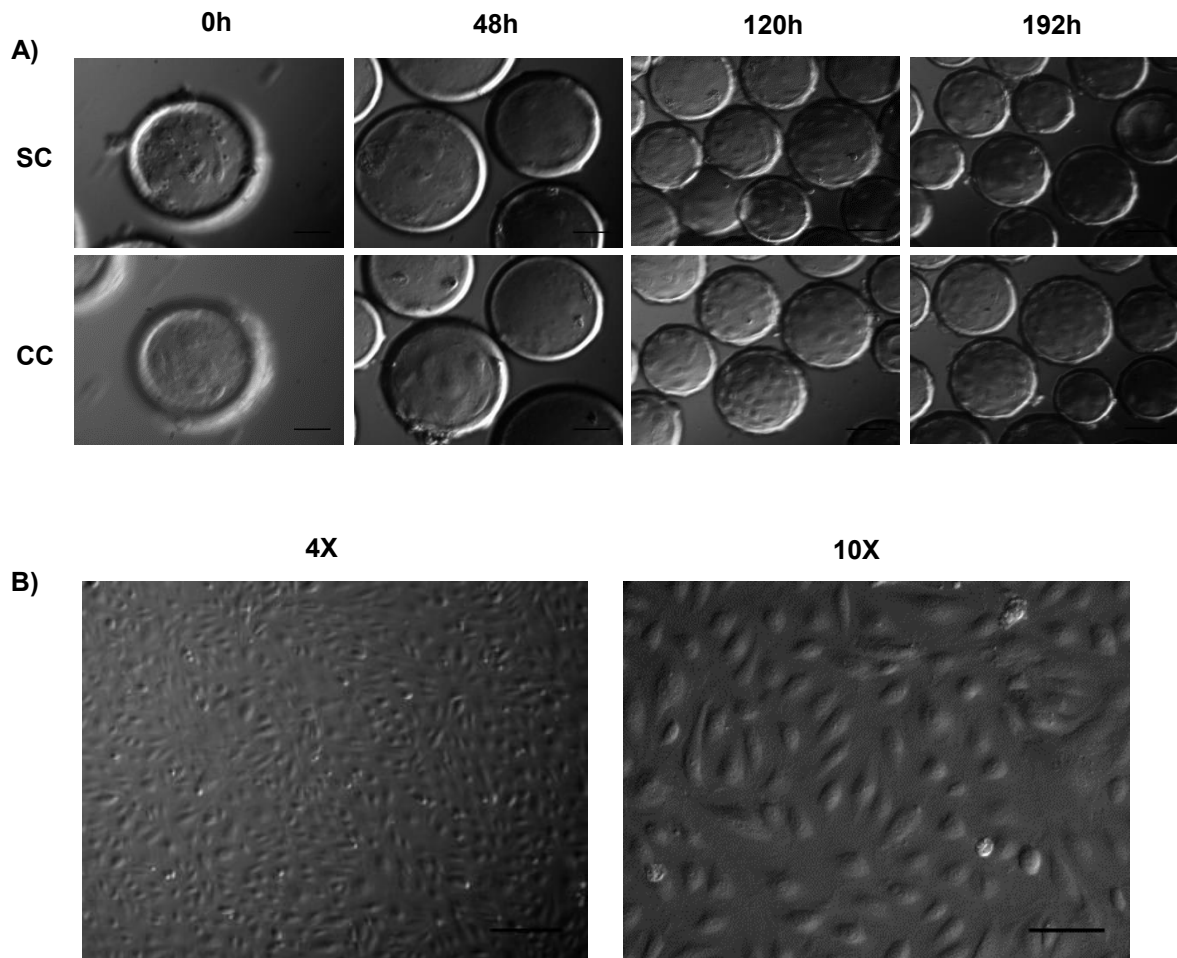
**Figura 35. Micrografías de las PVs recuperadas del cultivo en suspensión a 80 rpm, identificadas por inmunocitoquímica. Co-expresión de CD133-Alexa Fluor 488 (verde), como marcador de troncalidad y marcadores de linaje endotelial como PECAM-1, KDR, VE-CAD y VWf TRITC- TRICT (rojo). Escala representa 50 µm.**

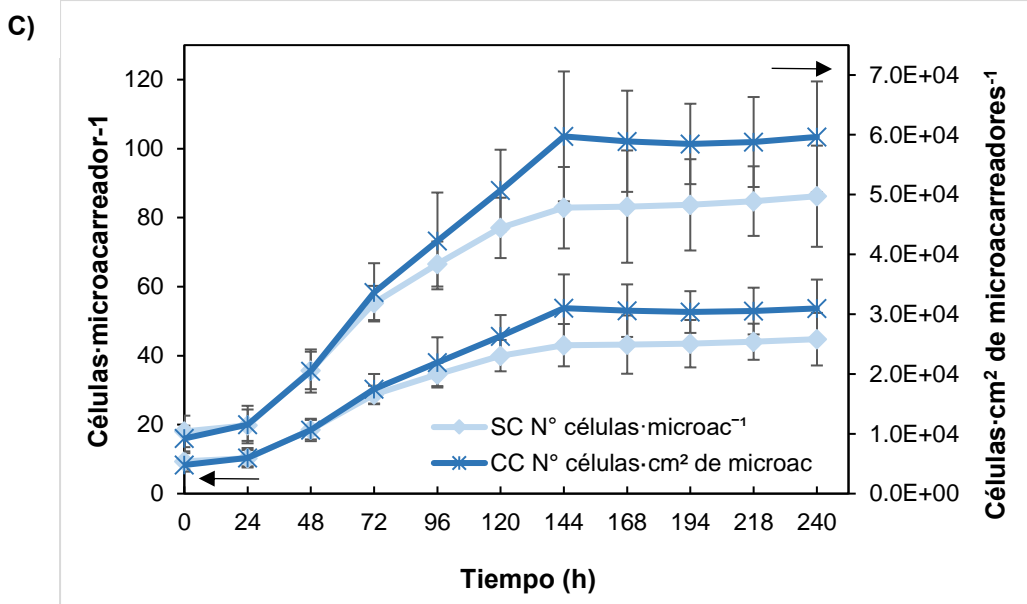


**Figura 36. Citometría de flujo de las PV cultivadas en suspensión a 80 RPM.** Se representa el porcentaje de expresión para los marcadores CD133, KDR, CD31/PECAM-1 y VE-Cadherina, en comparación con el control (histograma gris).

Durante las condiciones de agitación constante anteriores, el cultivo se mantuvo sin cambio de medio, sin embargo, a partir de lo encontrado a 60 rpm, se realizó un segundo experimento, con cambio de medio cada 72h (3 días). En las micrográficas se muestra que en la condición de  $7 \times 10^4$  células  $\cdot 6.75 \text{ cm}^2$  de microacarreadores  $\cdot \text{mililitro}^{-1}$ , sin cambio de medio (SC), la expansión celular en la superficie de los microacarreadores fue muy notable en donde a las 0h se adhirieron inicialmente  $10,406 \text{ células} \cdot \text{cm}^2$  de microacarreadores ( $9.3 \text{ células} \cdot \text{microacarreador}^{-1}$ ), mientras que el punto de expansión celular máxima fue a las 144h, con una densidad de  $47,810 \text{ células} \cdot \text{cm}^2$  de microacarreadores ( $43.03 \text{ células} \cdot \text{microacarreador}^{-1}$ ), posterior a este tiempo, la densidad celular se mantuvo constante hasta las 240h en que se extendió la cinética. En la condición con cambio de medio (CC), como se observa en las microfotografías, se obtuvo un mayor número de células que en la condición sin cambio (Figura 37-A), por lo que aunque a las 0h se adhirieron inicialmente  $9,221 \text{ células} \cdot \text{cm}^2$  de microacarreadores ( $8.3 \text{ células} \cdot \text{microacarreador}^{-1}$ ), mientras que el punto de expansión celular máxima fue a las 144h, con una densidad de  $59,734 \text{ células} \cdot \text{cm}^2$  de microacarreadores ( $53.76 \text{ células} \cdot \text{microacarreador}^{-1}$ ), posterior a este tiempo, al igual

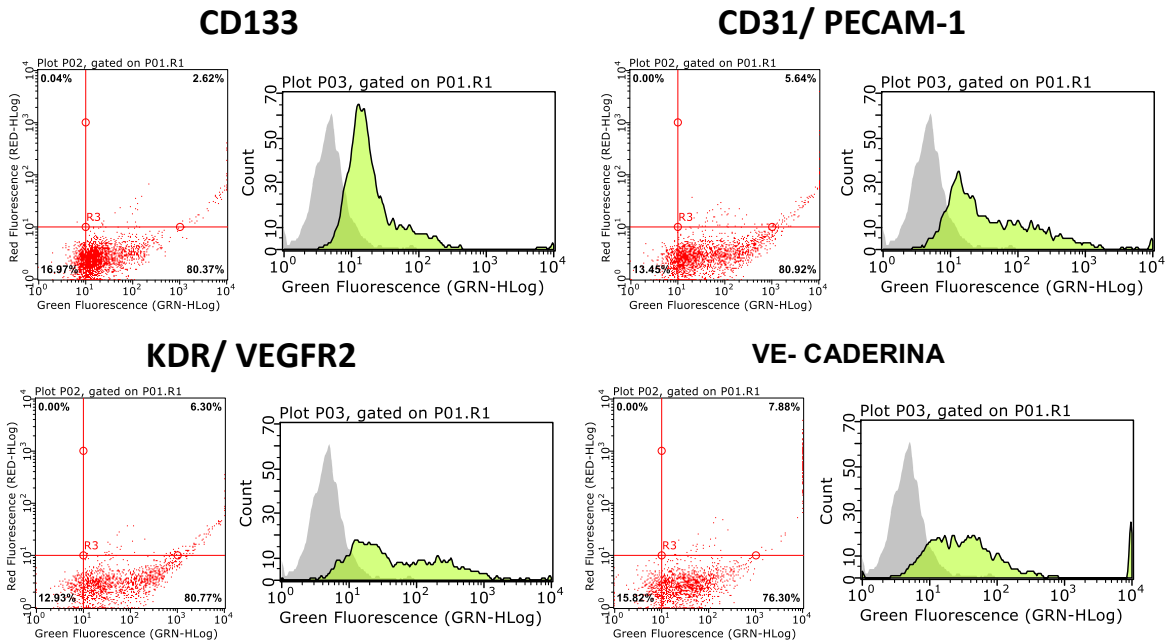
que la condición sin cambio, la densidad celular se mantuvo, hasta el término de la cinética (Figura 37-B). Una fracción celular de la superficie de los microacarreadores, se recuperó a las 144h, de la condición CM, la cual se re-inoculó en monocapa, comprobando que estas células siguieron presentando una morfología de progenitor endotelial en su mayoría. Se calculó un esfuerzo de corte de  $1.70 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ , para esta condición de agitación (Figura 37-C).



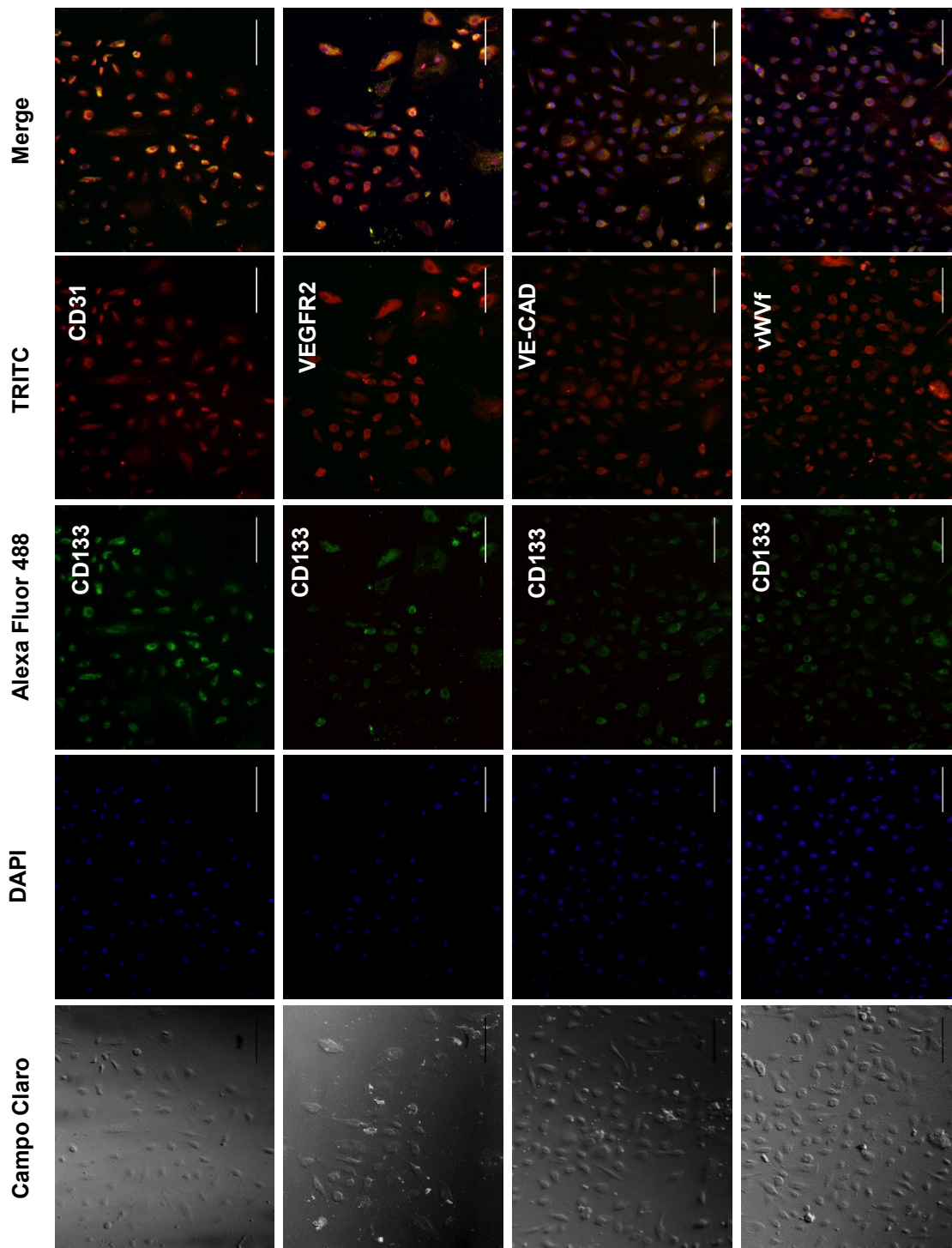


**Figura 37. Micrografías de PVs unidas a microacarreadores en agitación constante, cinética de crecimiento, en la condición de  $7 \times 10^4$  células  $\cdot 6.75 \text{ cm}^2$  de microacarreadores  $\cdot \text{mililitro}^{-1}$ , a 60 rpm, y células recuperadas post agitación. A) Representación del crecimiento de PVs en la superficie de microacarreadores, sin cambio (SC) y con cambio de medio (CC). B) Número de células  $\cdot \text{microacarreador}^{-1}$  (eje vertical izquierdo  $\leftarrow$ ) y células  $\cdot \text{cm}^2$  de microacarreadores  $\cdot \text{microac}^{-1}$  (eje vertical derecho  $\rightarrow$ ), sin cambio (SC) y con cambio de medio (CC) a lo largo de 168h de cultivo. C) Células re-cultivadas en monocapa, escala representa  $100 \mu\text{m}$**

Posterior a la recuperación de las PVs de la condición de 60 rpm, con cambio de medio, se identificó visualmente por inmunocitoquímica, la co-localización del marcador de membrana CD133 (verde) con los marcadores KDR, PECAM-1, VE-Cadherina, y el factor de Von Willebrand (rojo), resaltando los núcleos celulares con DAPI (azul), por lo que al igual que en la condición de agitación anterior, la expresión de estos marcadores fue muy notable, corroborando que estas células, conservaron su condición de progenitor endotelial (Figura 38). Por citometría de flujo, con células obtenidas posterior a la misma condición seleccionada, se determinó que el porcentaje de expresión de al menos 50,000 eventos adquiridos para cada marcador fue muy distinto entre cada uno de estos en comparación al control, encontrando un 80.37% para CD133, 80.77% para KDR, 80.92% para CD31 y un 76.30% para VE- Cadherina, corroborando los encontrados obtenidos por inmunocitoquímica (Figura 39).

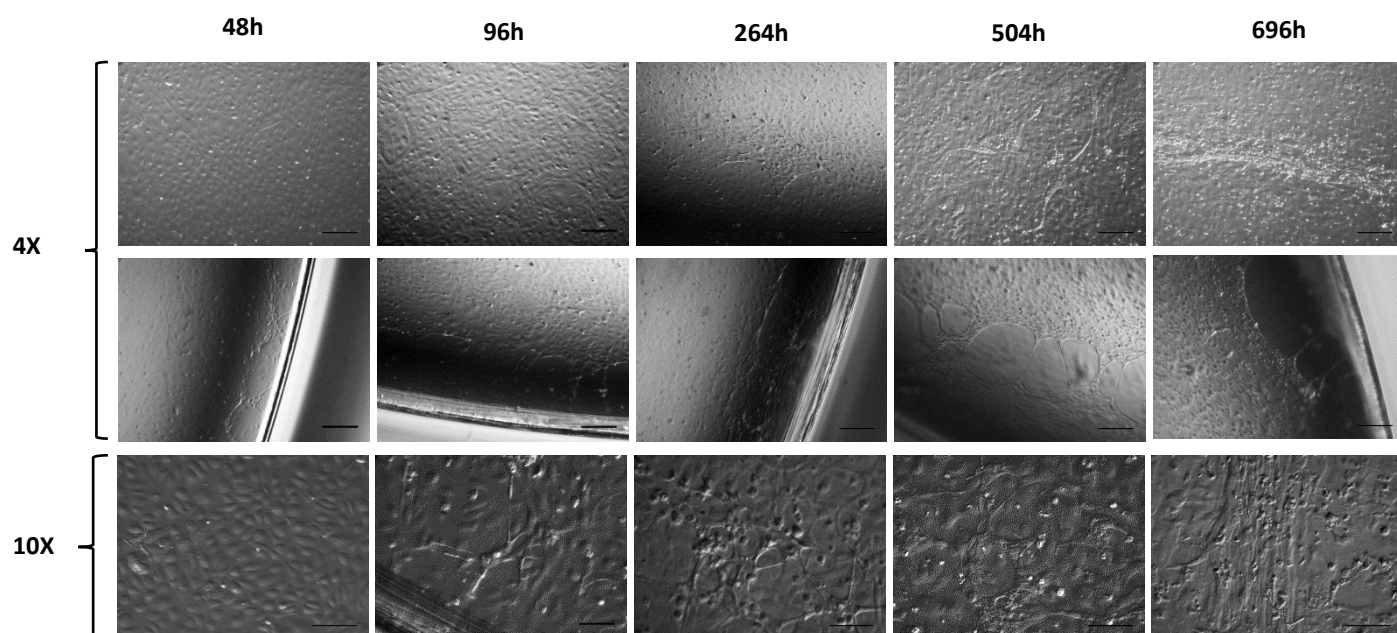


**Figura 38. Citometría de flujo de las PVs cultivadas en suspensión a 60 RPM. Se representa el porcentaje de expresión para los marcadores CD133, KDR, CD31/PECAM-1 y VE-Cadherina, en comparación con el control (histograma gris).**



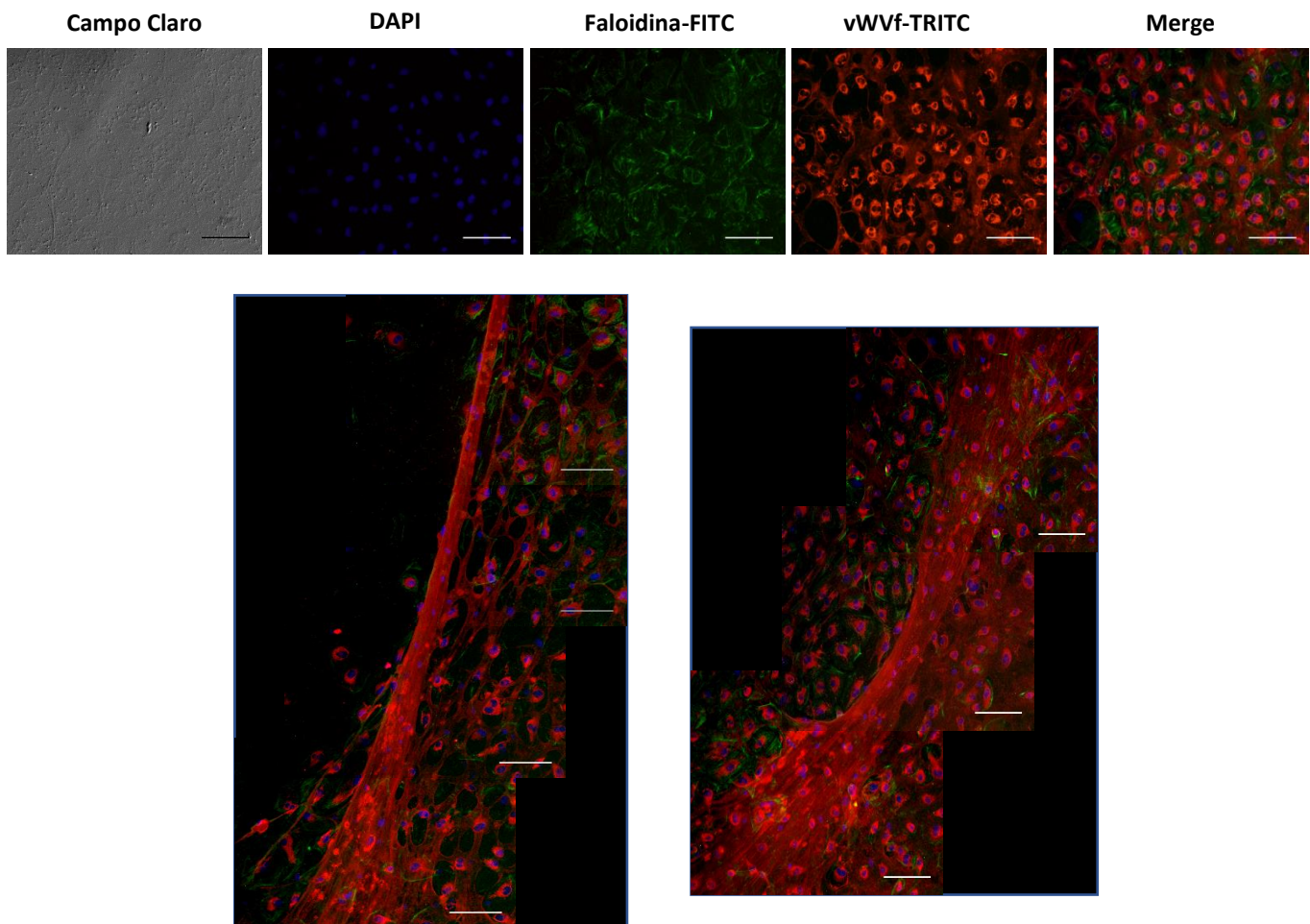
**Figura 39. Micrografías de las PVs recuperadas del cultivo en suspensión a 60 rpm, identificadas por inmunocitoquímica.** Co-expresión de CD133-Alexa Fluor 488 (verde), como marcador de troncalidad y marcadores de linaje endotelial como PECAM-1, KDR, VE-CAD y vWVf TRITC- TRICT (rojo). Escala representa 50  $\mu$ m.

Las PVs recuperadas de la condición con cambio de medio a 60 RPM, se sometieron a un proceso de diferenciación para la generación de estructuras microvasculares, al igual que con las PVs cultivadas en monocapa. Esta prueba se realizó a partir de un inóculo de  $1 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>, esto para confirmar el linaje endotelial-vascular de estas células (Figura 40). La monocapa celular, se encontró confluyente posterior a las 48h de cultivo, encontrando las primeras estructuras alargadas a las 96h. En tiempos posteriores, entre las 264 y las 504h se formó una red de células interconectadas, encontrando en la orilla de los pozos de cultivo algunas estructuras mucho más alargadas. A los 30 días de cultivo, se encontraron estructuras alargadas más robustas, que, en los tiempos anteriores, formadas por varias células, además de seguir agrupándose en forma reticular, este comportamiento fue muy similar al encontrado en la diferenciación de las PVs cultivadas en monocapa.



**Figura 40. Formación de microvasculatura a partir de PVs recuperadas del cultivo en suspensión a 60 RPM.** Proceso de generación de estructuras microvasculares a partir de PVs re-cultivadas en monocapa, durante 30 días, escala representa 100  $\mu\text{m}$  (4X) y 50  $\mu\text{m}$  (10X).

Posterior a la formación de estructuras microvasculares *in vitro*, a partir de las PVs recuperadas de la condición de 60rpm, se detectó por inmunocitoquímica, que estas células poseían una alta expresión del factor de Von Willebrand, empleando Faloidina para distinguir el la expresión de F-actina en el citoesqueleto celular, por lo que se observó un comportamiento muy similar al encontrado en la diferenciación a partir de PVs en monocapa, la expresión del factor de von Willebrand estaba distribuida en la membrana celular y la estructura reticulada que envolvía a las células, considerando de que se trata de la matriz extracelular. También se encontraron estructuras que visualmente se asemejaron a microvasculatura, siendo estas muy alargadas y robustas, conformadas por muchas células (Figura 41).



**Figura 41. Micrografías PVs diferenciadas en monocapa, recuperadas del cultivo en suspensión a 60 RPM, identificadas por inmunocitoquímica. Co-expresión de Faloidina-FITC (verde) y el factor de Von Willebrand- TRITC (rojo), resaltando los nucleos celulares con DAPI (azul) en estructuras microvasculares, posterior a un proceso de diferenciación por 30 días.**



## 7. Discusión

Una de las primeras evidencias para corroborar el linaje endotelial de las células obtenidas a partir de sangre periférica humana, fue el que al emplear un medio selectivo para la diferenciación hacia linaje endotelial (EGM-2), se logró obtener células con morfología en adoquín en crecimiento en grandes colonias, como ya se ha descrito anteriormente, esto entre aproximadamente los 8-20 días de diferenciación, cuando se ha reportado un tiempo de aparición de entre los 11-25 días desde el inicio de la derivación (Tagawa y cols., 2015). Estas células ya se han logrado derivar de sangre de cordón umbilical y por supuesto de medula ósea (Prasain y cols., 2012; Guan y cols., 2013). La composición del medio EGM-2 contiene distintos factores de crecimiento, como el VEGF, hFGF, hEGF y R3-IGF-1, los cuales desencadenan distintas vías de señalización que promueven tanto la proliferación celular, como la diferenciación de los progenitores endoteliales, teniendo incluso un efecto sinérgico entre ellos (Muscari y cols., 2010; Yang y cols., 2012; Kimura y cols., 2013; Sai y cols., 2014;). Otros factores contenidos en el medio de cultivo, son importantes para el mantenimiento de los progenitores, como la hidrocortisona, la cual genera un efecto mitogénico, además de promover la formación de uniones intercelulares, lo cual podría promover la formación de estructuras microvasculares (Fleissner & Thum., 2008; Furihata y cols., 2015; Huttala y cols., 2015); el ácido ascórbico o vitamina C, es un nutrimento esencial para las células endoteliales, necesario para la migración y la síntesis de proteínas de matriz extracelular, como el colágeno IV (Telang y cols., 2007) y la heparina principalmente, la cual más que generar un efecto sobre los progenitores endoteliales, genera un efecto protector para estos, para los factores de crecimiento, protegiéndolos de su degradación, independiente de su efecto anticoagulante (D'Amore, 1990).

Durante el cultivo en monocapa y cinética de proliferación de las PVs se determinó la capacidad de proliferación de éstas células, puesto que posterior a las 120- 144h de la cinética de proliferación el número de PVs-cm<sup>-2</sup> disminuyó al igual que su viabilidad, pues al llegar a una gran confluencia el cultivo en monocapa, se agotaron los espacios superficiales y consecuentemente los nutrimentos y factores de crecimiento del medio de cultivo, generando los suficientes metabolitos tóxicos, como lactatos y amonio, lo cual se observa en el cambio de pH del medio de cultivo, todo lo anterior provocó la muerte celular en los tiempos finales de la cinética (Fernandes y cols., 2010).

Otra característica de las PVs son sus parámetros de proliferación en donde algunos autores ya han reportado que las CPEs derivadas de SP poseen un tiempo de duplicación aproximado de entre 29h, similar al que han encontrado en células obtenidas a partir de médula ósea, lo cual se asemeja mucho a lo encontrado en este estudio; con un tiempo de duplicación para nuestros PVs cultivados en monocapa de 31.44h en promedio (Bompais y cols., 2004; Tura y cols., 2013).

Para identificar el inmunofenotipo de las PVs en monocapa, y a las PVs sometidas a las distintas condiciones de agitación constante, por inmunocitoquímica y citometría de flujo se empleó el anticuerpo anti-CD133 o Prominina-1 y los anticuerpos anti-KDR, CD31 o PECAM-1, VE-CAD y el factor de von Willebrand (este último solo por inmunocitoquímica).

Ya se ha reportado que la glicoproteína transmembranal CD133 se expresa de manera importante en células con alta capacidad proliferativa, como progenitores neurales, progenitores endoteliales, células derivadas de músculo, próstata, riñón y piel, además del cáncer (Baersch y cols., 1999; Alessandri y cols., 2004; Belicci y cols., 2004; Richardson y cols., 2004; Cantley., 2005); aunque el marcador CD133 no es específico para los progenitores endoteliales, ya se ha reportado que la pérdida de su expresión se asocia con diferenciación. Se ha descrito en distintos trabajos que progenitores vasculares derivados de sangre periférica, pueden presentar una expresión de CD133 entre el 63- 95% para este marcador, mientras que para PVs derivados de médula ósea, se ha reportado un porcentaje de 81.23%, por lo que de acuerdo a lo descrito anteriormente, se corroboró, que tanto en células crecidas en monocapa, como en suspensión una importante cantidad de estas siguieron expresando el marcador CD133, corroborando su estado progenitor (Cheng y cols., 2012; Meng y cols., 2013; Fu y cols., 2014).

En cuanto a los marcadores de linaje endotelial, también se ha reportado una importante expresión de estos en los progenitores vasculares derivados de sangre periférica humana, presentando porcentajes de entre un 81- 98% para KDR o el receptor del VEGF, un 93- 98% para CD31 o PECAM-1, un 64%-75% VE- Caderina y un 69% para vWF, aunque para este último sólo se realizó inmunocitoquímica en nuestro trabajo (Rehman y cols., 2003; Zhang y cols., 2006; Chen y cols., 2010; Ladhoff y cols., 2010; Brunt y cols., 2012; Meng y cols., 2013; Fu y cols., 2014). Lo anterior, concuerda con los resultados obtenidos, tanto para las PVs cultivadas en monocapa, como en suspensión, por lo que pese a someter a

las PVs a distintas condiciones de agitación, siguieron expresando en su mayoría los marcadores de linaje endotelial

Posterior a las pruebas de adhesión preliminares, se determinó que a diferencia de lo que se ha reportado, el emplear una alta densidad celular, en el cultivo en suspensión asegura supervivencia y viabilidad celular, sin embargo esto ocasiona un bajo rango de proliferación, sin embargo al evaluar condiciones con las densidades menores ( $1-3 \times 10^4$  células·cm<sup>-2</sup>), es imposible obtener expansión celular en la etapa de crecimiento máximo de las cinéticas de proliferación asociado principalmente a que no todos los microacarreadores poseían células adheridas, de acuerdo a lo anterior se determinó que una densidad media de PVs ( $7 \times 10^4$  células·ml<sup>-1</sup> y  $5 \times 10^4$  células·ml<sup>-1</sup>), es suficiente para obtener un número robusto de células en un corto tiempo, lo cual fue lo más adecuado, ya que uno de los objetivos principales de este protocolo fue el de poder obtener un número robusto de células, a partir de una cantidad relativamente baja de PVs considerando su potencial aplicación como terapia autóloga.

Numerosos estudios han referido que el *shear stress* (esfuerzo de corte) influye directamente en la proliferación celular y diferenciación de progenitores endoteliales de distintos orígenes. Se ha determinado que el someter por si solas a las PVs a un *shear stress*, el ciclo celular se ve afectado induciendo un cambio de fase G0 y G1 a S, G2 y M (Yamamoto y cols., 2005). La mayoría de los autores coinciden en que la fase del ciclo que se ve aumentada en este tipo de condiciones es la fase M liderada por vías de señalización como Tie2/PI3K/Akt/mTOR y ERK1/2, las cuáles inducen la proliferación celular, principalmente en condiciones de agitación orbital (Dardik y cols., 2005; Obi y cols., 2012; Yang y cols., 2012). Esto se ha demostrado, pues al someter un cultivo de PVs en monocapa a un *shear stress* de entre  $1.25 - 2$  dyn·cm<sup>-2</sup> en las primeras 24h su número aumentó significativamente, respecto a un cultivo de PVs estático (Yamamoto y cols., 2003). Se sabe que, para la mayoría de las células, la progresión del ciclo celular, entre las distintas fases, es dependiente de anclaje, por lo que se requiere una gran proporción de asociaciones de integrinas con matriz extracelular, y la formación de complejos de adhesión asociados a actina, del citoesqueleto (Fang y cols., 1996; Schulze y cols., 1996; Mettouchi y cols., 2001) Antes de entrar en mitosis, los complejos de adhesión son rápidamente desensamblados para permitir la desasociación del citoesqueleto y que las células entren en citocinesis, siendo este mecanismo controlado por Ciclina B1 y la subsecuente inhibición

de CDK1 (Maddox y cols., 2003; Dao y cols., 2009; Mathew y cols., 2014; Jones y cols., 2018).

Lo descrito previamente, podría explicar el comportamiento de las distintas cinéticas de proliferación de las condiciones de agitación constante evaluadas en este trabajo, en donde en la cinética de las PVs sometidas a la condición de 120 RPM equivalente en el sistema utilizado a  $4.82 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ , pudo ocurrir algún tipo de muerte celular, o simplemente las células se siguieron desprendiendo de los microacarreadores posterior a las 48h de cultivo, puesto que tan solo en la condición de 100 RPM equivalente en el sistema utilizado a  $3.45 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ , ocurrió expansión celular, sin embargo sería necesario realizar más experimentos para evaluar este efecto. Como se explicó anteriormente este mismo efecto puede explicar el comportamiento de las cinéticas de proliferación en las condiciones de 80 RPM (equivalente a  $2.52 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) y 60 RPM (equivalente a  $1.70 \text{ dyn}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) en donde en ésta última condición se obtuvo el mayor número de células, en la etapa exponencial, sin cambio de medio, en comparación a las condiciones de mayor agitación. En la condición con renovación de medio, posterior a las 72h de la cinética se observó que debido al primer cambio de medio, aumentó la proliferación celular, en comparación a la condición sin cambio. Esto se debe a la renovación de nutrientes y factores de crecimiento, presentes en el medio de cultivo, además de retirar los metabolitos citotóxicos como lactato y amonio, similar a lo que se observó en la cinética de proliferación de los PVs en monocapa (Fernandes y cols., 2010).

Se ha reportado que el medio EGM-2 promueve la producción de ON, quizá como un efecto dirigido por las distintas citocinas con las que es suplementado este medio, como el VEGF o FGF, de las cuáles se ha reportado, aumentan la angiogénesis (Kano y cols., 2005; Guan y cols., 2013). El ON es un vasodilatador que se sabe, participa de manera importante en la movilización de las PVs desde la médula ósea hasta distintos sitios de la circulación periférica, sin embargo, el ON también es esencial para la supervivencia, migración y angiogénesis, es decir la formación de estructuras vasculares a partir de progenitores endoteliales (He y cols., 2004; Ozüyanan y cols., 2005). Se ha encontrado que el ON aumenta la generación de uniones intercelulares GAP, lo cual podría estar relacionado con la formación de estructuras vasculares, pues son estas uniones intercelulares las que predominan en el endotelio vascular y permiten el alineamiento de las células para formar estructuras vasculares (Hoffmann y cols., 2003). Este alineamiento o ensamblaje se podría

asemejar mucho al mecanismo de formación del plexo vascular primitivo, en donde angioblastos, comienzan a ensamblarse en cordones, formando así una red inicial, que eventualmente formará estructuras tubulares huecas, más complejas (Cleaver & Krieg., 2010)

La expresión del factor de Von Willebrand es específica para células endoteliales (progenitores endoteliales y células endoteliales especializadas) y esta se ve aumentada por la acción de distintos factores angiogénicos, como el VEGF, FGF-2, IGF, TFGb, PDGF, PD-ECGF, entre otros, que además de estar presentes en el EGM-2, estos son secretados por las células endoteliales, sin embargo, algunos autores han reportado que este marcador propiamente regula la angiogénesis de forma negativa (Nicosia y cols., 1994; Zanetta y cols., 2000; Kubis & Levy., 2003). Se ha encontrado que, mediante el silenciamiento del gen que codifica para Vwf, la proliferación celular, migración y angiogénesis se ven aumentadas, observando este comportamiento en formación y progresión de tumores; no obstante, una alta expresión de este factor, en condiciones normales detiene la angiogénesis, concluyendo que este mismo factor podría ejercer alguna función proapoptótica (Terraube y cols., 2006; Starke y cols., 2011). En sentido estricto, posterior a la diferenciación de los PV para la formación de las estructuras microvasculares, la proliferación celular disminuyó, además de que ocurrió un punto en el que el cultivo se encontraba repleto de estructuras microvasculares, lo cual estaría relacionado con la especialización de los PVs, por lo que se considera que esto pudo estar regulado por la acción del Vwf, principalmente

Lo anterior explicaría el resultado obtenido de los dos procesos de formación de microvasculatura *in vitro* (cultivo en monocapa y en suspensión), que se llevaron a cabo en este protocolo, anterior al proceso de cultivo en suspensión y posterior a este; todo esto estimulado por los cambios de medio de cultivo EGM-2, cada 6 días principalmente, ya que no se observaron diferencias visuales en contraste a realizar un cambio de medio cada 3 días. Confirmando que es factible expandir los PVs derivados de SP en suspensión posterior a su exposición a fuerzas de corte equivalentes a las encontradas *in vivo* en estructuras vasculares de mayor diámetro, como la vena cava y aortas, con la capacidad de formar estructuras microvasculares *in vitro* (Papaionau, T. y cols., 2005).

## 8. Conclusiones

- Se confirmó que tanto las PVs de SP cultivadas en monocapa, como las PVs obtenidas posterior al cultivo en suspensión a 80 y 60 RPM presentan un perfil de expresión CD133<sup>+</sup>, PECAM-1<sup>+</sup>, VEGFR2<sup>+</sup> y VE-CADERINA<sup>+</sup>, mayor al 80% corroborando su estado progenitor.
- Tanto las PVs de SP cultivadas en monocapa, como las PVs obtenidas posterior al cultivo en suspensión a 60 RPM, las poseen la capacidad de formar estructuras microvasculares *in vitro*, las cuales fueron positivas para el factor de Von Willebrand.
- Es suficiente una agitación constante de 60 rpm, para expandir las PVs de SP adheridas a microacarreadores, sin embargo, es necesario renovar parcialmente el medio de cultivo, para obtener una mayor cantidad, posterior a 5 días de cultivo.
- Es necesario emplear una densidad de PVs de SP inicial aproximada de entre  $5 \times 10^4$ -  $7 \times 10^4$  células·  $6.75 \text{ cm}^2$  de microacarreadores ·mililitro<sup>-1</sup>, para realizar un óptimo cultivo en suspensión y lograr obtener un importante número de células al final del proceso.
- El esfuerzo de corte al que fueron sometidas las PVs de SP en una agitación de 60 RPM, es similar al que se encuentran expuestas estructuras vasculares de mayor diámetro *in vivo*.
- Es posible obtener un total de  $2.016 \times 10^6$  células por matraz Erlenmeyer de 25mL, a 20%, corroborando la eficiencia de este sistema de cultivo, comparado con el cultivo en monocapa.
- La relevancia de este protocolo es que se logró realizar un cultivo de progenitores vasculares obtenidos de sangre periférica humana en suspensión distinto al cultivo convencional (en monocapa), el cual permite obtener a corto plazo un número robusto células, las cuales como parte de un nuevo protocolo, podrían ser utilizadas para distintas aplicaciones de medicina regenerativa e ingeniería de tejidos, como una alternativa para el tratamiento de patologías vasculares y cardiovasculares.

## 9. Literatura citada

1. Ahmann, K., Johnson, S., Hebbel, R. & Tranquillo R. (2011). Shear stress responses of adult blood outgrowth endothelial cells seeded on bioartificial tissue. *Tissue engineering. Part A*, 17(19-20): 2511-2521.
2. Aicher, A., Heeschen, C., Mildner-Rihm, C., Urbich, C., Ihling, C., Technau-Ihling, K., Zeiher, A. & Dimmeler, S. (2003). Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells. *Nature Medicine*, 9(11): 1370–1376.
3. Alessandri, G., Pagano, S., Bez, A., Benetti, A., Pozzi, S., Iannolo, G., Baronio, M., Invernici, G., Caruso, A., Muneretto, C., Bisleri, G. & Parati, E. (2004). Isolation and culture of human muscle-derived stem cells able to differentiate into myogenic and neurogenic cell lineages. *The Lancet*, 364(9448):1872- 1883.
4. Arai, F., Hirao, A. & Suda, T. (2005). Regulation of hematopoietic stem cells by the niche. *Trends in Cardiovascular Medicine.*, 15(2): 75–79.
5. Arai, F., Hosokawa, K., Toyama, H., Matsumoto, Y. & Suda, T. (2012). Role of n-cadherin in the regulation of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1266: 72–77.
6. Asahara, T., Murohara, T., Sullivan, A., Silver, M., van der Zee, R., Li, T., Witzenbichler, B., Schatteman, G. & Isner, J. (1997). Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*, 275(5302):964–967.
7. Asahara, T., Takahashi, T., Masuda, H., Kalka, C., Chen, D., Iwaguro, H. Inai, Y., Silver, M. & Isner, J. (1999). VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO Journal*, 18(14): 3964–3972.
8. Askmyr, M., Sims, N., Martin, T. & Purton, L. (2009). What is the true nature of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche? *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 20(6): 303–309.
9. Avecilla, S., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D, Dias, S., Zhang, F., Hartman, T., Hackett, N., Crystal R., Witte, L., Hicklin, D., Bohlen, P., Eaton, D., Lyden, D., de Sauvage, F. & Rafii S.(2003). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature Medicine*, 10(1): 64–71.

10. Avigdor, A., Goichberg, P., Shvitiel, S., Dar, A., Peled, A., Samira, S., Kollet, O., HersHKoviz, R., Alon, R., Hardan, I., Ben-Hur, H., Naor, D., Nagler, A. & Lapidot, T. (2004). CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow. *Blood*, 103(8): 2981–2989.
11. Baersch, , Baumann, , Ritter, , Jürgens, and Vormoor, (1999), Expression of AC133 and CD117 on candidate normal stem cell populations in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 107: 572-580.
12. Balligand, J., Feron, O. & Dessy, C. (2007). eNOS Activation by physical forces: From short- term regulation of contraction to chronic remodeling of cardiovascular tissues. *Physiological Reviews*, 89(2): 482-543.
13. Basire, A., Sabatier, F., Ravet, S., Lamy, E., Mialhe, A., Zabouo, G., Paul, P., Gurewich, V., Sampol, J. & Dignat-George, F. (2006) High urokinase expression contributes to the angiogenic properties of endothelial cells derived from circulating progenitors. *Thrombosis and Haemostasis*, 95(4):678-688.
14. Batard, P., Monier, M., Fortunel, N., Ducos, K., Sansilvestri-Morel, P., Phan, T., Hatzfeld, A. & Hatzfeld, J. (2000). TGF-(beta)1 maintains hematopoietic immaturity by a reversible negative control of cell cycle and induces CD34 antigen up-modulation. *Journal of cell science*, 113(Pt13): 383–390.
15. Bauters, C., Marotte, F., Hamon, M., Oliviero, P., Farhadian, F., Robert, V., Samuel, J. & Rappaport, L. (2018). Accumulation of fetal fibronectin mRNAs after balloon denudation of rabbit arteries. *Circulation*, 92:904–11.
16. Belicchi, M. , Pisati, F. , Lopa, R. , Porretti, L. , Fortunato, F. , Sironi, M. , Scalamogna, M. , Parati, E. A., Bresolin, N. and Torrente, Y. (2004), Human skin-derived stem cells migrate throughout forebrain and differentiate into astrocytes after injection into adult mouse brain. *J. Neurosci. Res.*, 77: 475-486.
17. Benayahu, D., Akavia, U. & Shur, I. (2007). Differentiation of bone marrow stroma-derived mesenchymal cells. *Current Medicinal Chemistry*, 14(2):, 173–179.
18. Berlin, C., Bargatze, R., Campbell, J., von Andrian, U., Szabo, M., Hasslen, S., Nelson, R., Berg, E., Erlandsen, S. & Butcher, E. (1995). Alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell*, 80(3):413–422.
19. Bhatia, M., Bonnet, D., Wu, D., Murdoch, B., Wrana, J., Gallacher, L. & Dick, J. (1999). Bone morphogenetic proteins regulate the developmental program of human hematopoietic stem cells. *The Journal of experimental medicine*, 189(7): 1139–1148.



20. Bompais, H., Chagraoui, J., Cannon, X., Crisan, M., Liu, X. H., Anjo, A., Tolla-Le Port, C., Leboeuf, M., Charbord, P., Bikfalvi, A., & Uzan, G. (2004). Human endothelial cells derived from circulating progenitors display specific functional properties compared with mature vessel wall endothelial cells. *Blood*, 103(7), 2577-2584.
21. Bouvard, C., Gafsou, B., Dizier, B., Galy-Fauroux, I., Lokajczyk, A., Boisson-Vidal, C., Fischer, A. & Helley, D. (2010). Alpha6-integrin subunit plays a major role in the proangiogenic properties of endothelial progenitor cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 30(8):1569–75.
22. Brunt, K., Wu, J., Chen, Z., Poeckel, D., Dercho, R., Melo, L., Funk, C., Ward, C. & Li, R. (2012). Ex vivo Akt/HO-1 gene therapy to human endothelial progenitor cells enhances myocardial infarction recovery. *Cell Transplantation*, 21(7): 1443- 1461.
23. Burger, D. & Touyz, R. (2012). Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells. *American Society of Hypertension*. 6(2):85-99.
24. Burger, P., Coetzee, S., McKeenan, W., Kan, M., Cook, P., Fan, Y., Suda, T., Heibel, R., Novitzky, Nicolas & A Muller, William & Lynette Wilson, E. (2002). Fibroblast growth factor receptor-1 is expressed by endothelial progenitor cells. *Blood*. 100. 3527-3535.
25. Calvi, L., Adams, G., Weibrecht, K., Weber, J., Olson, D., Knight, M., Martin, R., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F., Milner, L., Kronenberg, H. & Scadden, D. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*, 425(6960): 841–846.
26. Calzi, S., Neu, M., Shaw, L. & Grant, M. (2010). Endothelial progenitor dysfunction in the pathogenesis of diabetic retinopathy: treatment concept to correct diabetes-associated deficits. *EPMA Journal*, 1(1):88-100.
27. Cantley, L. (2005). Adult stem cells in the repair of the injured renal tubule. *Nature Clinical Practice Nephrology*, 1(1): 22- 32.
28. Cao, B., Zhang, Z., Grassinger, J., Williams, B., Heazlewood, C., Churches, Q., James, S., Li, S., Papayannopoulou, T. & Nilsson, S. (2016). Therapeutic targeting and rapid mobilization of endosteal HSC using a small molecule integrin antagonist. *Nature Communications*, 7: 11007.

29. Carman, C. & Springer, T. (2004). A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *The Journal of Cell Biology*, 167(2):377–388.
30. Carmona, G., Chavakis, E., Koehl, U., Zeiher, A. & Dimmeler, S. (2008). Activation of Epcam stimulates integrin-dependent homing of progenitor cells. *Blood*, 111:2640–2646.
31. Ceradini, D., Kulkarni, A., Callaghan, M., Tepper, O., Bastidas, N., Kleinman, M., Capla, J., Galiano, R., Levine, J. & Gurtner, G. (2004). Progenitor cell trafficking is regulated by hypoxic gradients through HIF-1 induction of SDF-1. *Nature Medicine*, 10(8): 858-864.
32. Charrad, R., Li, Y., Delpech, B., Balitrand, N., Clay, D., Jasmin, C., Chomienne, C. & Smadja-Joffe, F. (1999). Ligation of the CD44 adhesion molecule reverses blockage of differentiation in human acute myeloid leukemia. *Nature Medicine*, 5(6): 669–676.
33. Chavakis, E., Aicher, A., Heeschen, C., Sasaki, K., Kaiser, R., El Makhfi, N., Urbich, C., Peters, T., Scharffetter-Kochanek, K., Zeiher, A., Chavakis, T. & Dimmeler, S. (2005). Role of beta2- integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 201(1):63–72
34. Chavakis, E., Hain, A., Vinc, M., Carmona, G., Bianchi, M., Vajkoczy, P., Zeiher, A., Chavakis, T. & Dimmeler, S. (2007). High-mobility group box 1 activates integrin-dependent homing of endothelial progenitor cells. *Circulation Research*, 100(2): 204–212.
35. Chen, D., Zhao, M. & Mundy, G. (2004). Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors*, 22(4): 233–241.
36. Chen, L., Wu, F., Xia, W., Zhang, Y., Xu, S., Cheng, F., Liu, X., Zhang, X., Wang, S. & Tao, J. (2010). CXCR4 gene transfer contributes to in vivo reendothelialization capacity of endothelial progenitor cells. *Cardiovascular Research*, 88(3): 462- 470.
37. Cheng, M., Guan, X., Li, H., Cui, X., Zhang, X., Li, X., Jing, X., Wu, H. & Avsar, E. (2013). Shear stress regulates late EPC differentiation via mechanosensitive molecule-mediated cytoskeletal rearrangement. *PLoS One* 8, 8(7): e67675.
38. Cheng, Y., Guo, S., Liu, G., Feng, Y., Yan, B., Yu, J. ... Li, Z. (2012). Transplantation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells attenuates myocardial interstitial

- fibrosis and cardiac dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *International Journal of Molecular Medicine*, 30, 870-876.
39. Cleaver, O. & Krieg, P. Ed: Rosenthal, S. & Harvey, R. (2010). *Heart Development and Regeneration: Chapter 8.2 Vascular Development*. Academic Press. P487-528.
  40. D'Amore, P. (1990). Heparin- endothelial cell interactions. *Haemostasis*, 1: 159- 165.
  41. Dao, V.T., A.G. Dupuy, O. Gavet, E. Caron, and J. de Gunzburg. 2009. Dynamic changes in Rap1 activity are required for cell retraction and spreading during mitosis. *J. Cell Sci.* 122:2996–3004.
  42. Dardik, A., Chen, L., Frattini, J., Asada, H., Aziz, F., Kudo, F. & Sumpio, B. (2005). Differential effects of orbital and laminar shear stress on endothelial cells. *Journal of Vascular Surgery*. 41(5): 869- 880.
  43. Davis, P. (1995). Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiological reviews*, 75(3): 519- 560.
  44. De Haan, G., Weersing, E., Dontje, B., van Os, R., Bystrykh, L., Vellenga, E. (2003). Miller, G. *In vitro* generation of long-term repopulating hematopoietic stem cells by fibroblast growth factor-1. *Developmental Cell*, 4(2): 241–251.
  45. Di Santo, S., Diehm, N., Ortmann, J., Völzmann, J., Yang, Z., Keo, H., Baumgartner, I. & Kalka, C. (2008). Oxidized low density lipoprotein impairs endothelial progenitor cell function by downregulation of E-selectin and integrin alpha(v)beta5. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 373(4): 528-532.
  46. Duvar, S., Müthing, J., Mohr, H. & Lehmann, J. (1996) Scale up cultivation of primary human umbilical vein endothelial cells on microcarriers from spinner vessels to bioreactor fermentation. *Cytotechnology*, 21(1): 61–72.
  47. Fang, F., G. Orend, N. Watanabe, T. Hunter, and E. Ruoslahti. 1996. Dependence of cyclin E-CDK2 kinase activity on cell anchorage. *Science*. 27
  48. Fazel, S., Chen, L., Angoulvant, D., Li, S., Weisel, R., Keating, A. & Li, R. Activation of c-kit is necessary for mobilization of reparative bone marrow progenitor cells in response to cardiac injury. *FASEB Journal*, 22(3): 930–940.
  49. Fernandes, T., Fernandes, A., Lobato da Silva, C., Diogo, M. & Cabral, J. (2010). Kinetic and metabolic analysis of mouse embryonic stem cell expansion under serum-free conditions. *Biotechnology Letters*. 32: 171-179.

50. Fernandez, P., Lucibello, F., Gehling, U., Lindemann, K., Weidner, N., Zuzarte, M., Adamkiewicz, J., Elsässer, H., Müller, R. & Havemann, K. (2000). Endothelial-like cells derived from human CD14 positive monocytes. *Differentiation*.65(5):287–300.
51. Fleissner, F. & Thum, T. (2008). The IGF-1 Receptor as a Therapeutic Target to Improve Endothelial Progenitor Cell Function. *Molecular Medicine*, 14(5-6): 235–237.
52. Fleissner, F. & Thum, T. (2008). The IGF-1 Receptor as a Therapeutic Target to Improve Endothelial Progenitor Cell Function. *Molecular Medicine*, 14(5-6): 235–237.
53. Fliedner, T., Graessle, D., Paulsen, C. & Reimers, K. (2002). Structure and function of bone marrow hemopoiesis: Mechanisms of response to ionizing radiation exposure. *Cancer biotherapy and radiopharmaceuticals*, 17(4): 405–426.
54. Fu, S., Pang, H., Xu, J. & Wu, X. (2014). C/EBP $\beta$  mediates osteoclast recruitment by regulating endothelial progenitor cell expression of SDF-1 $\alpha$ . *PLoS One*, 9(3): e91217
55. Fuchs, S., Hermanns, M., Kirkpatrick, C. (2006). Retention of a differentiated endothelial phenotype by outgrowth endothelial cells isolated from human peripheral blood and expanded in long-term cultures. *Cell Tissue Research*. 326 (1): 79- 92.
56. Furihata, T., Kawamatsu, S., Ito, R., Saito, K., Suzuki, S., Kishida, S., Saito, Y., Kamiichi, A. & Chiba, K. (2015). Hydrocortisone enhances the barrier properties of HBMEC/ci $\beta$ , a brain microvascular endothelial cell line, through mesenchymal-to-endothelial transition-like effects. *Fluids and barriers of the CNS*, 12:7.
57. Fujiyama, S., Amano, K., Uehira, K., Yoshida, N., Nishiwaki, Y., Nozawa, Y., Jin, D., Takai, S., Miyazaki, M., Egashira, K., Imada, T., Iwasaka, T. & Matsubara, H. (2003). Bone marrow monocyte lineage cells adhere on injured endothelium in a monocyte chemoattractant protein-1-dependent manner and accelerate reendothelialization as endothelial progenitor cells. *Circulation research*, 93(10):980–989.
58. Gadhoum, Z., Leibovitch, M., Qi, J., Dumenil, D., Durand, L., Leibovitch, S. & Smadja-Joffe, F. (2004). CD44: A new means to inhibit acute myeloid leukemia cell proliferation via p27KIP1. *Blood*, 103(3): 1059–1068.
59. Gill, M., Dias, S., Hattori, K., Rivera, M., Hicklin, D., Witte, L., Girardi, L., Yurt, R., Himel, H. & Rafii, S. (2001). Vascular trauma induces rapid but transient mobilization of VEGFR2(+) AC133(+) endothelial precursor cells. *Circulation Research*, 88(2): 167–174.

60. Gowdak, W., Henrique L. & Krieger, E. (2018). Vascular Growth Factors, Progenitor Cells, and Angiogenesis. *Endothelium and Cardiovascular Diseases: Vascular Biology and Clinical Syndromes*. 49-62.
61. Greenbaum, A., Revollo, L., Woloszynek, J., Civitelli, R. & Link, D. (2012). N-cadherin in osteolineage cells is not required for maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood*, 120(2): 295–302.
62. Griese, D., Ehsan, A., Melo, L., Kong, D., Zhang, L., Mann, M., Pratt, R., Mulligan, R. & Dzau, V. (2003). Isolation and transplantation of autologous circulating endothelial cells into denuded vessels and prosthetic grafts: implications for cell-based vascular therapy. *Circulation*, 108(21): 2710–2715.
63. Guan, X., Cheng, M., Li, H., Cui, X., Li, X., Wang, Y., Sun, J. & Zhang, X. (2013). Biological properties of bone marrow-derived early and late endothelial progenitor cells in different culture media. *Molecular Medicine Reports*, 8(6): 1722-1728.
64. Guan, X., Cheng, M., Li, H., Cui, X.D., Li, X., Wang, Y., Sun, J. & Zhang, X. (2013). Biological properties of bone marrow-derived early and late endothelial progenitor cells in different culture media. *Molecular Medicine Reports*, 8(6): 1722-1728.
65. Gubar, O., Rodnichenko, A., Zlatska, O., Zubov, D., Litvinova, L., Shupletsova, V. & Vasyliiev, R. (2018). Isolation and Large-Scale Expansion of Human Endothelial Progenitor Cells from Peripheral Blood. *Problems of Cryobiology and cryomedicine*.28(1): 029- 033.
66. Hauge, E., Qvesel, D., Eriksen, E., Mosekilde, L. & Melsen, F. (2001). Cancellous bone remodeling occurs in specialized compartments lined by cells expressing osteoblastic markers. *J. Bone and Mineral Research.*, 16(9): 1575–1582.
67. He T, Peterson TE, Holmuhamedov EL, et al: Human endothelial progenitor cells tolerate oxidative stress due to intrinsically high expression of manganese superoxide dismutase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 2021-2027, 2004.
68. Heissig, B., Hattori, K., Dias, S., Friedrich, M., Ferris, B., Hackett, N., Crystal, R., Besmer, P., Lyden, D., Moore, M., Werb, Z. & Rafii, S. (2002). Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*, 109(5): 625–637.
69. Henderson, R., Lim, L., Tessier, P., Gavins, F., Mathies, M., Perretti, M. & Hogg, N. (2001). The use of lymphocyte function- associated antigen (LFA)-1-deficient mice

- to determine the role of LFA-1, Mac-1, and alpha4 integrin in the inflammatory response of neutrophils. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(2):219–226.
70. Herder, C., Tonn, T., Oostendorp, R., Becker, S., Keller, U., Peschel, C., Grez, M. & Seifried, E. (2003). Sustained expansion and transgene expression of coagulation factor VIII-transduced cord blood derived endothelial progenitor cells. *Arteriosclerosis, thrombosis and vascular biology*, 23(12): 2266–2272.
71. Ho, L. & Crabtree, G. (2010). Chromatin remodelling during development. *Nature*. V463: 474- 484.
72. Hoffmann, A., Gloc, T., Pohl, U., Zahler, S. (2003). Nitric oxide enhances de novo formation of endothelial gap junctions. *Cardiovascular Research*. 60(2): 421-430.
73. Hofmann, N., Reinisch, A. & Strunk, D. (2009). Isolation and large-scale expansion of adult human endothelial colony forming progenitor cells. *Journal of Visualized Experiments*. 28(32): 1524.
74. Hosokawa, K., Arai, F., Yoshihara, H., Iwasaki, H., Nakamura, Y., Gomei, Y. & Suda, T. (2010). Knockdown of N-cadherin suppresses the long-term engraftment of hematopoietic stem cells. *Blood*, 116(4): 554–563.
75. Hristov, M., Erl, W. & Weber, P. (2003). Endothelial progenitor cells: mobilization, differentiation, and homing. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 23(7):1185-1189.
76. Huang, P., Chen, Y., Wang, C., Chen, J., Tsai, H., Lin, F., Lo, W., Wu, T., Sata, M., Chen, J. & Lin, S. (2009). Matrix metalloproteinase-9 is essential for ischemia-induced neovascularization by modulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 29(8):1179-1184.
77. Hur, J., Yoon, C., Kim, H., Choi, J., Kang, H., Hwang, K., Oh, B., Lee, M. & Park, Y. (2004). Characterization of Two Types of Endothelial Progenitor Cells and Their Different Contributions to Neovascularization. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 24(2): 288- 293.
78. Hur, J., Yoon, C., Lee, C., Kim, T., Oh, I., Park, K., Kim, J., Lee, H., Kang, H., Chae, I., Oh, B., Park, Y., Kim, H. (2007). Akt is a key modulator of endothelial progenitor cell trafficking in ischemic muscle. *Stem Cells*, 25(7):1769-1778.
79. Huttala, O., Vuorenperä, H., Toimela, T., Uotila, J., Kuokkanen, H., Ylikomi, T., Sarkkanen, J. & Heinonen, T. (2015). Human vascular model with defined stimulation

- medium - a characterization study. *Alternatives to animal experimentation*, 32(2): 125- 136.
80. Ikuta, K. & Weissman, I. (1992). Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *PNAS*, 89(4): 1502–1506.
81. Iwaguro, H., Yamaguchi, J., Kalka, C., Murasawa, S., Masuda, H., Hayashi, S., Silver, M., Li, T., Isner, J. & Asahara, T. (2002). Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration. *Circulation*, 105(6):732–738.
82. Jacobsen, S., Ruscetti, F.W., Dubois, C., Lee, J., Boone, T. & Keller, J. (1991). Transforming growth factor-beta trans-modulates the expression of colony stimulating factor receptors on murine hematopoietic progenitor cell lines. *Blood*, 77(8): 1706–1716.
83. Jones, M., Askari, J., Humphries, J. & Humphrie, M. (2018). Cell adhesion is regulated by CDK1 during the cell cycle. *Journal of cardiology*, 217(10): 1- 16.
84. K. D. Puri, S. Chen, and T. A. Springer, Modifying the mechanical property and shear threshold of L-selectin adhesion independently of equilibrium properties. *Nature* 392, 930 (1998).
85. K. Yamamoto, T. Takahashi, T. Asahara, N. Ohura, T. Sokabe, A. Kamiya, and J. Ando, Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *J. Appl. Physiol.* 95, 2081 (2003).
86. Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Gordon, R., Tepper, O., Gravereaux, E., Pieczek, A., Iwaguro, H., Hayashi, S., Isner, J. & Asahara T. (2000). Vascular endothelial growth factor165 gene transfer augments circulating endothelial progenitor cells in human subjects. *Circulation Research*, 86(12): 1198–1202.
87. Kalka, C., Masuda, H., Takahashi, T., Kalka, W., Silver, M., Kearney, M., Li, T., Isner, J. & Asahara, T. (2000). Transplantation of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for therapeutic neovascularization. *PNAS*. 97(7): 3422- 3427.
88. Kamiya, A., Bukhari, R. & Togawa, T. (1984). Adaptive regulation of wall shear stress optimizing vascular tree function. *Bulletin of mathematical biology*, 46(1): 127-137.
89. Kano MR, Morishita Y, Iwata C, Iwasaka S, Watabe T et al. (2005) VEGF-A and FGF-2 synergistically promote neoangiogenesis through enhancement of

- endogenous PDGF-B-PDGFRbeta signaling. *J Cell Sci* 118: 3759–3768. doi:10.1242/jcs.02483. PubMed: 16105884.
90. Karar & Maity. (2011). PI3K/AKT/mTOR pathway in angiogenesis. *Frontiers in molecular neuroscience*, 4(51): 1-8.
91. Kaushal, S., Amiel, G., Guleserian, K., Shapira, O., Perry, T., Sutherland, F., Rabkin, E., Moran, A., Schoen, F., Atala, A., Soker, S., Bischoff, J. & Mayer, J. (2001). Functional small-diameter neovessels created using endothelial progenitor cells expanded ex vivo. *Nature Medicine*, 7(9):1035–1040.
92. Kawamoto, A., Gwon, H., Iwaguro, H., Yamaguchi, J., Uchida, S., Masuda, H., Silver, M., Ma, H., Kearney, M., Isner, J. & Asahara T.(2001). Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia. *Circulation*, 103(5):103:634–637.
93. Khan, S., Solomon, M. & McCoy, J. (2005). Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry Part B Clinical Cytometry*, 64(1):1-8.
94. Kiel, M. and Morrison, S. (2006). Maintaining hematopoietic stem cells in the vascular niche. *Immunity*, 25(6):862– 864.
95. Kim, H., Yang, K., Cho, H., Gwak, G., Park, S., Kim, J., Yun, S. & Moon, In. (2015). Different effects of orbital shear stress on vascular endothelial cells: Comparison with the results of in vivo study with rats. *Vascular Specialist International*, 31(2): 33-40.
96. Kimura, H., Okubo, N., Chosa, N., Kyakumoto, S., Kamo, M., Miura, H. & Ishisaki, A. (2013). EGF Positively Regulates the Proliferation and Migration, and Negatively Regulates the Myofibroblast Differentiation of Periodontal Ligament-Derived Endothelial Progenitor Cells through MEK/ERK- and JNK-Dependent Signals. *Cellular Physiology Biochemistry*, 32(4):899-914.
97. Kocher, A., Schuster, M., Bonaros, N., Lietz, K., Xiang, G., Martens, T., Kurlansky, P., Sondermeijer, H., Witkowski, P., Boyle, A., Homma, S., Wang, S. (2006) Itescu, S. (2006). Myocardial homing and neovascularization by human bone marrow angioblasts is regulated by IL-8/Gro CXC chemokines. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 40(4):455-464.
98. Kocher, A., Schuster, M., Szabolcs, M., Burkhoff, D., Wang, J., Homma, S., Edwards, N. & Itescu, S. (2001). Neovascularization of ischemic myocardium by



- human bone-marrow-derived angioblasts prevents cardiomyocyte apoptosis, reduces remodeling and improves cardiac function. *Nature medicine*, 7(4):430–436.
99. Kong, D., Melo, L., Gneccchi, M., Zhang, L., Mostoslavski, G., Liew, C., Pratt, R. & Dzau, V. (2004). Cytokine-induced mobilization of circulating endothelial progenitor cells enhances repair of injured arteries. *Circulation*. 110(14):2039 –2046.
100. Kong, D., Melo, L., Mangi, A., Zhang, L., Lopez-Illasaca, M., Perrella, M., Liew, C., Pratt, R. & Dzau, V. (2004). Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells. *Circulation*, 109(14):1769 – 1775.
101. Kopp, H., Hooper, A., Avecilla, S. & Rafii, S. (2009). Functional heterogeneity of the bone marrow vascular niche. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1176: 47–54.
102. Krenning, G., van Luyn, M. & Harmsen, M. (2009). Endothelial progenitor cell- based neovascularization: implications for therapy. *Cell, Trends in Molecular Medicine*. 15(14): 180- 190.
103. Kubis, N., & Levy, B. I. (2003). Vasculogenesis and Angiogenesis: Molecular and Cellular Controls: Part 1: Growth Factors. *Interventional Neuroradiology*, 9(3), 227– 237.
104. Kusumbe, A., Ramasamy, S., Itkin, T., Mäe, M., Langen, U., Betsholtz, C., Lapidot, T. & Adams, R. (2016). Age-dependent modulation of vascular niches for haematopoietic stem cells. *Nature*, 532(7599): 380–384.
105. Ladhoff, J., Fleischer, B., Hara, Y., Volk, H. & Seifert, M. (2010). Immune privilege of endothelial cells differentiated from endothelial progenitor cells. *Cardiovascular research*, 88(1): 121- 129.
106. Lapidot, T & Petit, I. (2002). Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Experimental Haematology*, 30(9): 973–81.
107. Levesque, J., Hendy, J., Takamatsu, Y., Simmons, P. & Bendall, L. (2003). Disruption of the CXCR4/CXCL12 chemotactic interaction during hematopoietic stem cell mobilization induced by GCSF or cyclophosphamide. *The Journal of Clinical Investigation*, 111(2): 187–96.
108. Li, L. & Xie, T. (2005). Stem Cell Niche: Structure and Function. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21: 605-631.

109. Lin, H. (2002). The stem-cell niche theory: Lessons from flies. *Nature Reviews. Genetics*, 3(12): 931–940.
110. Lord, B., Testa, N. & Hendry, J. (1975). The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood*, 46(1): 65–72.
111. Luster, A., Alon, R. & von Andrian, U. (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nature Immunology*, 6(12): 1182–1190.
112. Lyden, D., Hattori, K., Dias, S., Costa, C., Blaikie, P., Butros, L., Chadburn, A., Heissig, B., Marks, W., Witte, L., Wu, Y., Hicklin, D., Zhu, Z., Hackett, N., Crystal, R., Moore, M., Hajjar, K., Manova, K., Benezra, R. & Rafii, S. (2001). Impaired recruitment of bone-marrow-derived endothelial and hematopoietic precursor cells blocks tumor angiogenesis and growth. *Nature Medicine*, 7(11): 1194–1201.
113. Maddox, A.S., and K. Burridge. 2003. RhoA is required for cortical retraction and rigidity during mitotic cell rounding. *J. Cell Biol.* 160:255–265.
114. Mathew, S.S., B. Nieves, S. Sequeira, S. Sambandamoorthy, K. Pumiglia, M. Larsen, and S.E. Laflamme. 2014. Integrins promote cytokinesis through the RSK signaling axis. *J. Cell Sci.* 127:534–545
115. McQuibban, G., Butler, G., Gong, J., Bendall, L., Power, C., Clark-Lewis, I. & Overall, C. (2001). Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(47):43503–43508.
116. Meng, S., Cao, J., Wang, L., Zhou, Q., Li, Y., Shen, C., Zhang, X. & Wang, C. (2013). MicroRNA 107 Partly Inhibits Endothelial Progenitor Cells Differentiation via HIF-1 $\beta$ . *PLoS ONE* 7(7): e40323.
117. Mettouchi, A., S. Klein, W. Guo, M. Lopez-Lago, E. Lemichez, J.K. Westwick, and F.G. Giancotti. 2001. Integrin-specific activation of Rac controls progression through the G (1) phase of the cell cycle. *Mol. Cell.* 8:115–127.
118. Mikkola, H. (2006). The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development*, 133(19): 3733–3744.
119. Morrison, S. & Spradling, A. (2008). Stem cells and niches: Mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 2008, 132 (4): 598–611.
120. Murasawa, S., Llevadot, J., Silver, M., Isner, J., Losordo, D. & Asahara, T. (2002). Constitutive human telomerase reverse transcriptase expression enhances regenerative properties of endothelial progenitor cells. *Circulation*, 106(9):1133–1139.

121. Murohara, T., Ikeda, H., Duan, J., Shintani, S., Sasaki, K., Eguchi, H., Onitsuka, I., Matsui, K. & Imaizumi, T. (2000). Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization. *Journal of Clinical Investigation*, 105(11), 1527–1536.
122. Muscari, C., Gamberini, C., Basile, I., Bonafé, F., Valgimigli, S., Capitani, O., Guarnieri, C. & Caldarera, C. M. (2010). Comparison between Culture Conditions Improving Growth and Differentiation of Blood and Bone Marrow Cells Committed to the Endothelial Cell Lineage. *Biological Procedures Online*, 12, 89–106.
123. Müthing, J., Duvar, S., Nerger, S., Büntemeyer, H. & Lehmann, J. (1996) Microcarrier cultivation of bovine aortic endothelial cells in spinner vessels and a membrane stirred bioreactor. *Cytotechnology*, 18(3): 193–206.
124. Nagasawa, T. (2006). Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nature Reviews. Immunology*, 6(2): 107–116.
125. Nervi, B., Link, D. & Di Persio, J. (2006). Cytokines and hematopoietic stem cell mobilization. *Journal of cellular biochemistry*, 99(3): 690–705.
126. Nilsson, S., Haylock, D., Johnston, H., Occhiodoro, T., Brown, T., Simmons, P. (2003). Hyaluronan is synthesized by primitive hemopoietic cells, participates in their lodgment at the endosteum following transplantation, and is involved in the regulation of their proliferation and differentiation *in vitro*. *Blood*, 101(3): 856–862.
127. Nilsson, S., Johnston, H., Whitty, G., Williams, B., Webb, R., Denhardt, D., Bertocello, I., Bendall, L., Simmons, P. & Haylock, D. (2005). Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood*, 106(4): 1232–1239.
128. Obi, S., Masuda, H., Shizuno, T., Sato, A., Yamamoto, K., Ando, J., Abe, Y. & Asahara, T. (2012). Fluid shear stress induces differentiation of circulating phenotype endothelial progenitor cells. *American journal of physiology. Cell physiology*, 303(6): C595- 606.
129. Ogawa, M. (1993). Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*, 81(11): 2844–2853.
130. Ozüyaman B, Ebner P, Niesler U, et al: Nitric oxide differentially regulates proliferation and mobilization of endothelial progenitor cells but not of hematopoietic stem cells. *Thromb Haemost* 94: 770-772, 2005.

131. Papaionau, T. & Stefanadis, C. (2005). Vascular Wall Shear Stress: Basic Principles and Methods. *Hellenic J. Cardiology*. 46: 9-15.
132. Papayannopoulou, T., Craddock, C., Nakamoto, B., Priestley, G. & Wolf, N. (1995). The VLA4/VCAM-1 adhesion pathway defines contrasting mechanisms of lodgement of transplanted murine hemopoietic progenitors between bone marrow and spleen. *PNAS*, 92(21): 9647–9651.
133. Parmar, K., Mauch, P., Vergilio, J., Sackstein, R. & Down, J. (2007). Distribution of hematopoietic stem cells in the bone marrow according to regional hypoxia. *PNAS*, 104(13): 5431–5436.
134. Patel- Hett, S. & D'Amore, P. (2011). Signal Transduction in Vasculogenesis and Developmental Angiogenesis. *The International Journal of Developmental Biology*, 55(4-5): 353- 363.
135. Pelus, L., Horowitz, D., Cooper, S. & King, A. (2002). Peripheral blood stem cell mobilization. *Critical Reviews in Oncology Hematology*, 43(3): 257–275.
136. Prasain, N., Meador, J. L., & Yoder, M. C. (2012). Phenotypic and Functional Characterization of Endothelial Colony Forming Cells Derived from Human Umbilical Cord Blood. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (62): 3872.
137. R. F. Nicosia, S. V. Nicosia, and M. Smith, "Vascular endothelial growth factor, platelet-derived growth factor, and insulin-like growth factor-1 promote rat aortic angiogenesis *in vitro*," *The American Journal of Pathology*, vol. 145, no. 5, pp. 1023–1029, 1994.
138. Rauscher, F., Goldschmidt-Clermont, P., Davis, B., Wang, T., Gregg, D., Ramaswami, P., Pippen, A., Annex, B., Dong, C. & Taylor, D. (2003). Aging, progenitor cell exhaustion, and atherosclerosis. *Circulation*, 108(4): 457–463.
139. Rehman, J., Li, J., Orschell, C.M., & March, K.L. (2003). Peripheral blood "endothelial progenitor cells" are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. *Circulation*, 107(8): 1164-1169.
140. Reinisch, A., Hofmann, N., Obenauf, A., Kashofer, K., Rohde, E., Schallmoser, K., Flicker, K., Lanzer, G., Linkerch, W., Speicher, M. & Strunk, D. (2009). Humanized large-scale expanded endothelial colony-forming cells function *in vitro* and *in vivo*. *Blood*. 113(26): 6716- 6725.

141. Richardson, G., D. and Robson, Craig N. and Lang, Shona H. and Neal, David E. and Maitland, Norman J. and Collins, Anne T. (2004). CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *Journal of Cell Science*, 117(16): 3539- 3545.
142. S. Obi, H. Masuda, T. Shizuno, A. Sato, K. Yamamoto, J. Ando, Y. Abe, and T. Asahara, Fluid shear stress induces differentiation of circulating phenotype endothelial progenitor cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 303, 595 (2012).
143. Sai, Y., Nishimura, T., Muta, M., Iizasa, H., Miyata, T. & Nakashima, E. (2014). Basic Fibroblast Growth Factor Is Essential to Maintain Endothelial Progenitor Cell Phenotype in TR-BME2 Cells. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(4): 688-693.
144. Sakurai, H., Era, T., Jakt, L.M., Okada, M., Nakai, S. & Nishikawa, S. (2006). *In vitro* modeling of paraxial and lateral mesoderm differentiation reveals early reversibility. *Stem Cells*, 24(3): 575–586.
145. Scandura, J., Boccuni, P., Massague, J. & Nimer, S. (2004). Transforming growth factor-induced cell cycle arrest of human hematopoietic cells requires p57KIP2 up-regulation. *PNAS USA*, 101(42): 15231–15236.
146. Schulze, A., K. Zerfass-Thome, J. Bergès, S. Middendorp, P. Jansen-Dürr, and B. Henglein. 1996. Anchorage-dependent transcription of the cyclin A gene. *Mol. Cell. Biol.* 16:4632–4638
147. Shintani, S., Murohara, T., Ikeda, H., Ueni, T., Honma, T., Katoh, A., Sasaki, K., Shimada, T., Oike, Y. & Imaizumi, T. (2001). Mobilization of endothelial progenitor cells in patients with acute myocardial infarction. *Circulation*, 103(23):2776 –2779.
148. Spring, H., Schüler, T., Arnold, B., Hämmerling, G. & Ganss, R. (2005). Chemokines direct endothelial progenitors into tumor neovessels. *PNAS USA*, 102(50):18111-18116.
149. Standal, T., Borset, M. & Sundan, A. (2004). Role of osteopontin in adhesion, migration, cell survival and bone remodeling. *Experimental Oncology*, 26(3): 179–184.
150. Starke, R., Ferraro, F., Paschalaki, K., Dryden, N., McKinnon, T., Sutton, R., Payne, E., Haskard, D., Hughes, A., Cutler, D., Laffan, M. & Randi, A. (2011). Endothelial von Willebrand factor regulates angiogenesis. *117(3): 1071-1080.*
151. Steinl, C., Essl, M., Schreiber, T. D., Geiger, K., Prokop, L., Stevanović, S., Pötz, O., Abele, H., Wessels, J., Aicher, W. & Klein, G. (2013). Release of Matrix Metalloproteinase-8 During Physiological Trafficking and Induced Mobilization of Human Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cells and Development*, 22(9): 1307–1318.

152. Stolberg, S & McCloskey, K. (2009). Can Shear Stress Direct Stem Cell Fate? *Biotechnology Progress*. 25 (1): 10- 19.
153. Suda, T., Arai, F. & Shimmura, S. (2005). Regulation of stem cells in the niche. *Cornea*, 24(8Suppl): S12–S17.
154. Sugiyama, T., Kohara, H., Noda, M. & Nagasawa, T. (2006). Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*, 25(6): 977–988.
155. Sullivan, S., Medina, C., Ledwidge, M., Radomski, M. & Gilmer, J. (2014). Nitric oxide-matrix metalloproteinase-9 interactions: Biological and pharmacological significance: NO and MMP-9 interactions. *BBA-Molecular Cell Research*, 1843(3): 603-617.
156. Tagawa, S., Nakanishi, C., Mori, M., Yoshimuta, T., Yoshida, S., Shimojima, M., Yokawa, J., Kawashiri, M., Yamagishi, M. & Hayashi, K. (2015). Determination of Early and Late Endothelial Progenitor Cells in Peripheral Circulation and Their Clinical Association with Coronary Artery Disease. *International Journal of Vascular Medicine*, 2015: 7p
157. Takeshita, K., Satoh, M., Ii, M., Silver, M., Limbourg, F., Mukai, Y., Rikitake, Y., Radtke, F., Gridley, T., Losordo, D. & Liao, J. (2007). Critical role of endothelial Notch1 signaling in postnatal angiogenesis. *Circulation Research*, 100(1): 70 –78.
158. Telang, S., Klem, A. L., Eaton, J. W. and Chesney, J. (2007). Depletion of ascorbic acid restricts angiogenesis and retards tumor growth in a mouse model. *Neoplasia* 9, 47-56.
159. Terraube, V., Pendu, R., Baruch, D., Gebbink, M., Meyer, D., Lenting, P., Denis, C. (2006). Increased metastatic potential of tumor cells in von Willebrand factor-deficient mice. *Journal of thrombosis and haemostasis*, 4(3): 519–526
160. Tmma, R. & Ribatti, D. (2017). Bone niches, hematopoietic stem cells, and vessel formation. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(1): 1-13.
161. Tura, O., Skinner, E. M., Barclay, G. R., Samuel, K., Gallagher, R. C., Brittan, M., Hadoke, P. W., Newby, D. E., Turner, M. L. and Mills, N. L. (2013), Late Outgrowth Endothelial Cells Resemble Mature Endothelial Cells and Are Not Derived from Bone Marrow. *STEM CELLS*, 31(2): 338-348.
162. Urbich, C. & Dimmeler, S. (2004). Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circulation Research*, 95(4):343-353.

163. Urbich, C., Aicher, A., Heeschen, C., Dernbach, E., Hofmann, W., Zeiher, A. & Dimmeler, S. (2005). Soluble factors released by endothelial progenitor cells promote migration of endothelial cells and cardiac resident progenitor cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 39(5):733–42.
164. Urbich, C., Heeschen, C., Aicher, A., Sasaki, K., Bruhl, T., Farhadi, M., Vajkoczy, P., Hofmann, W., Peters, C., Pennacchio, L., Abolmaali, N., Chavakis, E., Reinheckel, T., Zeiher, A. & Dimmeler, S. (2005). Cathepsin L is required for endothelial progenitor cell-induced neovascularization. *Nature Medicine*, 11(2):206-213.
165. Vasa, M., Fichtlscherer, S., Aicher, A., Adler, K., Urbich, C., Martin, H., Zeiher, A. & Dimmeler, S. (2001). Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlates with risk factors for coronary artery disease. *Circulation research*, 89(1): e1– e7.
166. Vermeulen, M., Le Pesteur, F., Gagnerault, M., Mary, J., Sainteny, F. & Lepault, F. (1998). Role of adhesion molecules in the homing and mobilization of murine hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*, 92(3): 894–900.
167. Wallez, Y., Cand, F., Cruzalegui, F., Wernstedt, C., Souchelnytskyi, S., Vilgrain, I. & Huber, P. (2007). Src kinase phosphorylates vascular endothelialcadherin in response to vascular endothelial growth factor: identification of tyrosine 685 as the unique target site. *Oncogene*, 26(7): 1067–1077.
168. Wang, D. and Tarbell, J. (1995). Modeling interstitial flow in an artery wall allows estimation of wall shear stress on smooth muscle cells. *Journal of biomechanical engineering*, 117(3): 358-363.
169. Wang, L., Benedito, R., Bixel, G., Zeuschner, D., Stehling, M., Savendahl, L., Haigh, J., Snippert, H., Clevers, H., Breier, G., Kiefer, F. & Adams, R. (2012). Identification of a clonally expanding haematopoietic compartment in bone marrow. *The EMBO journal*, 32(2): 219-230.
170. Werner, N., Junk, S., Laufs, L., Link, A., Walenta, K., Bohm, M. & Nickenig, G. (2003). Intravenous transfusion of endothelial progenitor cells reduces neointima formation after vascular injury. *Circulation research*, 93(2): e17– e24.
171. Willert, K., Brown, J., Danenberg, E., Duncan, A., Weissman, I., Reya, T., Yates, J. & Nusse, R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature*, 423(6938): 448–452.

172. Wright, D., Wagers, A., Gulati, A., Johnson, F. & Weissman, I. (2001). Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science*, 294(5548): 1933–1936.
173. Xie, J., Wang, W., Si, J., Miao, X., Li, J., Wang, Y., Wang, Z., Ma, J., Zhao, X., Li, Z., Yi, H. & Han, H. (2013). Notch signaling regulates CXCR4 expression and the migration of mesenchymal stem cells. *Cellular Immunology*, 281(1): 68–75.
174. Yamaguchi, J., Kusano, K., Masuo, O., Kawamoto, A., Silver, M., Murasawa, S., Bosch-Marce, M., Masuda, H., Losordo, D., Isner, J. & Asahara, T. (2003). Stromal cell derived factor-1 effects on ex vivo expanded endothelial progenitor cell recruitment for ischemic neovascularization. *Circulation*, 107(9):1322-1328.
175. Yamamoto K, Sokabe T, Watabe T, Miyazono K, Yamashita JK, Obi S, et al. Fluid shear stress induces differentiation of Flk-1-positive embryonic stem cells into vascular endothelial cells *in vitro*. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H1915-24.
176. Yamamoto, K., Takahashi, T., Asahara, T., Ohura, N., Sokabe, T., Kamiya, A. & Ando, J. (2003). Proliferation, differentiation, and tube formation by endothelial progenitor cells in response to shear stress. *Journal of applied physiology*, 95(5): 2081- 2088.
177. Yang, L., Guan, H., He, J., Zeng, L., Yuan, Z., Xu, M., Zhang, W., Wu, X. & Guan, J. (2012), VEGF increases the proliferative capacity and eNOS/NO levels of endothelial progenitor cells through the calcineurin/NFAT signalling pathway. *Cell Biology International*, 36: 21-27.
178. Yang, Z., Xia, W., Zhang, Y., Xu, S., Liu, X., Zhang, X., Yu, B., Qiu, Y. & Tao, J. (2012). Shear stress-induced activation of Tie2-dependent signaling pathway enhances reendothelialization capacity of early endothelial progenitor cells. *Journal of molecular and cellular cardiology*, 52(5): 1155-1163.
179. Yoo, E., Ahn, J., Bae, Y., Lee, S., Lee, S. M., Mun, Y., Lee, K., & Seong, C. (2005). Characterization of ‘Early’ vs ‘Late’ Endothelial Progenitor Cells (EPCs) Which Are Derived from Human Umbilical Cord Blood (HCB) during Ex Vivo Expansion. *Blood*, 106(11): 1706.
180. Yoon, K., Cho, H., Shin, H. and Cho, J. (2012). Differential regulation of CXCL5 by FGF2 in osteoblastic and endothelial niche cells supports hematopoietic stem cell migration. *Stem Cells and Development*, 21(18): 3391–3402.



181. Zanetta L, Marcus SG, Vasile J, Dobryansky M, Cohen H, Eng K, Shamamian P, Mignatti P: Expression of Von Willebrand factor, an endothelial cell marker, is up-regulated by angiogenesis factors: a potential method for objective assessment of tumor angiogenesis. *Int J Cancer* 2000, 85:281-8.
182. Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J., Harris, S., Wiedemann, L., Mishina, Y. & Li, L. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature*, 425(6960): 836–841.
183. Zhang, S., Zhang, H., Wei, Y., Su, W., Liao, Z., Hou, M., Zhou, J. & Hu, S. (2006). Adult endothelial progenitor cells from human peripheral blood maintain monocyte/macrophage function throughout *in vitro* culture. *Cell Journal*, 16(6): 577-584.