



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA I  
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

“ESTUDIO DE LA ACTIVACION ENDOTELIAL INDUCIDA POR TNF- $\alpha$  EN UN  
MODELO EX VIVO DE VENAS HUMANAS EN PRESENCIA DE FUERZAS  
HEMODINAMICAS”

T E S I S

Que para obtener el grado académico de Doctor en Biología Experimental

P R E S E N T A

Maestro en Ciencias Bioquímicas Ambar López Macay

COMITÉ TUTORAL:

Dra. Mina Konigsberg Fainstein

Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

México D.F., 25-02-2015

Comité Tutorial de Tesis

“ESTUDIO DE LA ACTIVACION ENDOTELIAL INDUCIDA POR TNF- $\alpha$  EN UN MODELO EX VIVO DE VENAS HUMANAS EN PRESENCIA DE FUERZAS HEMODINAMICAS

Realizada por M en CB Ambar López Macay El día 2015 en las Instalaciones de la Universidad autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

Co-Director: Mina Königsberg Fainstein

Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular

Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, correo : [mkf@xanum.uam.mx](mailto:mkf@xanum.uam.mx)

Co-Director: Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental

Instituto de Investigaciones Biomédicas

Universidad Nacional Autónoma de México

[azentell@ifc.unam.mx](mailto:azentell@ifc.unam.mx)

Asesor: Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz

Laboratorio de Fisiología Celular

Departamento de Ciencias Biológicas y de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa correo: legq@xanum.uam.mx

Asesor: Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Laboratorio de Endocrinología Molecular

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa

pgdm@xanum.uam.mx

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Bioenergética y Envejecimiento Celular del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, bajo la dirección de la Dra. Mina Königsberg Fainstein y en el laboratorio de Bioquímica del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Subirán bajo la supervisión del Dr. Alejandro Zentella Dehesa.

SOLICITUD EXAMEN DE GRADO  
POSGRADO EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL  
FORMATO DE SOLICITUD - JURADO DE EXAMEN DE GRADO

NIVEL: MAESTRÍA  DOCTORADO

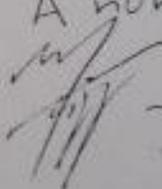
FECHA: 13-01-2015

Por este conducto, se hace constar que hemos leído y aprobado el manuscrito de tesis, que se anexa, del alumno : Ambar López Macay (Matrícula: 208383365 ). Por lo anterior, emitimos nuestra autorización para que se inicien los trámites para la obtención del grado correspondiente y proponemos a los siguientes especialistas en la línea de investigación de la tesis para que funjan como Jurado en el examen de grado.

Titulo de la tesis: " ESTUDIO DE LA ACTIVACION ENDOTELIAL INDUCIDA POR TNF EN UN MODELO EX VIVO DE VENAS HUMANAS EN PRESENCIA DE FUERZAS HEMODINAMICAS ".

JURADO PROPUESTO (Nombre, adscripción y correo electrónico de al menos 5 especialistas. Anexar curriculum vitae de cada uno, excepto miembros del Comité Tutoral o profesores del núcleo básico del posgrado; el director o los codirectores de la tesis no pueden formar parte del jurado):

- 1.- Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz Depto. Ciencias de la Salud, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. Correo: legq@xanum.uam.mx
- 2.- Dra. Rebeca López Marure Depto de Fisiología, Instituto Nacional de Cardiología Correo: rmarure@yahoo.com.mx
- 3.- Dr. Armando Luna López Instituto Nacional de Geriátria, SSA, México, D.F. correo: spideralbioexp@yahoo.com
- 4.- Dra. Rocío Alcántara Hernández "Departamento de Bioenergética, Instituto de Fisiología Celular, UNAM. CORREO: ralcanta@correo.ifc.unam.mx
- 5.- Dra. Karina Martínez Flores Depto Líquido Sinovial, Instituto Nacional de Rehabilitación correo: karinabiologist@hotmail.com

A nombre del comité tutorial  
  
Dra. Mina Königsberg F.

## **AGRADECIMIENTOS**

A los codirectores de tesis: Dra. Mina Konigsberg y al Dr. Alejandro Zentella Dehesa. Muchas gracias por permitirme trabajar y aprender de ustedes, por su apoyo y guía en este largo trayecto.

Al comité tutorial: A Dr. Luis Enrique Gómez Quiroz, A la Dra. Rebeca López Marure y al Dr. Pablo Damian Matzumura. Muchas gracias por guiarme en mi formación dentro del doctorado por su paciencia y por ser muy buenos investigadores capaces de transmitir el conocimiento de una forma clara.

A los grupos de trabajo: Al laboratorio de bioquímica del INCMNSZ, el laboratorio de bioenergética y envejecimiento celular de la UAM-I y al laboratorio de líquido sinovial del INR: a todos mis compañeros de maestría y doctorado, a la gente de base y compañeros de otros laboratorios “refugiados”. Muchas gracias por compartir su conocimiento y amistad.

A mi familia y a mi esposa: A mis padres y a mi hermana y su familia, Los amo y muchas gracias por su amor y apoyo en todas las situaciones.

A mi esposa Leonor, muchas gracias por tu amor y apoyo en la vida y tu compañía también en este camino de la investigación, te amo.

A mis amigos: A mis suegros y amigos de toda la vida, perdón de no mencionarlos a todos pero ustedes saben quiénes son, muchas gracias por su apoyo y comprensión en las experiencias compartidas, los quiero mucho.

## INDICE

1 ABREVIATURAS	9
2 RESUMEN	12
3 ABSTRACT	13
4 INTRODUCCION	14
5 Respuesta inflamatoria	14
6 Tipos de inflamación	15
8 Biología del endotelio vascular	28
9 Endotelio Vascular	28
10 Funciones del endotelio	32
11 La activación del endotelio	38
12 El fenotipo activado	38
13 La adhesión leucocitaria al endotelio vascular	41
14 Moléculas de adhesión	42
15 Modelos de estudio in vitro del endotelio vascular	45
16 Modelos de estudio ex vivo e in vivo	46
17 ANTECEDENTES	48
18 JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	50
19 HIPOTESIS	51
20 OBJETIVO GENERAL	52
21 OBJETIVOS PARTICULARES	52
22 MATERIAL Y MÉTODOS	52
23 Obtención de los cordones umbilicales	53
24 Cultivos de células U937	54
25 Sistema de perfusión	55
26 Ensayos de histoquímica e inmunofluorescencia	56
27 Ensayos de viabilidad, apoptosis y de liberación de Lactato Deshidrogenasa (LDH)	57
28 Medición de la producción de óxido nítrico	59
29 Determinación de citocinas por ensayo de ELISA	59
30 Ensayos de adhesión	60
31 Análisis de los datos	61

32 RESULTADOS-----62  
33 DISCUSION-----78  
34 CONCLUSIONES-----87  
35 PERSPECTIVAS-----87  
36 REFERENCIAS-----88

## ABREVIATURAS

ATCC	American Type Culture Collection
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
CD31	Platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM-1)
CD44	Antígeno de superficie asociada a interacciones entre células
CD62E	Selectina E
COX	Cicloxigenasa
ELAM-1	Molécula de adhesión de ligando a endotelio
eNOS	Oxido nítrico sintasa endotelial
FVW	Factor de Von Willebrand
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
HUVEC's	Células endoteliales de cordón umbilical humano
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular
IgG	Inmunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IFN- $\gamma$	Interferón gamma

I3P	Inositol 3- fosfato
LDH	Enzima lactato deshidrogenasa
LPS	Lipopolisacarido
LFA-1	Antígeno asociado a la función de linfocitos
MAC1	Macrophage 1 antigen
MAPK	Mitogen-activated protein kinases
MHC´s	Moléculas de histocompatibilidad
NK	Natural killers
NFκB	Factor de transcripción nuclear Kapa de células B
ON	Óxido nítrico
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
PAI-1	Inhibidor del activador del plasminógeno-1
PAF	Factor activador de plaquetas
PD-ECFG	Factor de crecimiento celular endotelial derivado de las plaquetas
PDFG	Factor de crecimiento derivado de las plaquetas
PECAM-1	Molécula de adhesión endotelio-plaquetaria
PGI1	Prostaciclina 1

PLA2	Fosfolipasa A2
TGF- $\beta$	Transforming growth factor beta
TH1	T helper cells, Th cells 1
TLR	Toll-like receptor
TNF $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alfa
t-PA	Activador tisular del plasminogeno
TxA2	Tromboxano A2
VCAM-1	Molécula de adhesión celular vascular 1
VEFG	Factor de crecimiento vascular endotelial
VLA-4	Antígeno de activación tardía 4

## RESUMEN

El proceso inflamatorio agudo o crónico es parte importante durante la etiología de una gran cantidad de enfermedades crónico-degenerativas. Las interacciones entre las células del sistema inmune con las células de su microambiente son fundamentales en la activación celular y en la amplificación de la respuesta inflamatoria. Actualmente se reconoce la importancia de factores hemodinámicos del microambiente como son el flujo vascular y las fuerzas de rozamiento presentes en vasos y arterias. En este trabajo se desarrolló un modelo ex-vivo de vena humana umbilical que permitió estudiar las interacciones de leucocito al endotelio activado con TNF- $\alpha$  por 2 horas en condiciones de flujo laminar a 1 ml/min y 2.2 dinas/cm<sup>2</sup>. Se utilizaron venas con alta viabilidad e integridad celular del endotelio en un lapso no mayor a 5 horas (tinciones vitales y por la liberación de lactato deshidrogenasa (LDH)), la funcionalidad del endotelio se midió por el incremento en el óxido nítrico (reacción de Griess) en respuesta a TNF-  $\alpha$ , y por la producción de IL8, TNF-  $\alpha$  e IL-4 identificadas en el medio de perfusión (ensayo de inmunoabsorción, ELISA). Las venas activadas incrementaron su capacidad adhesiva de células monocíticas U937 circulantes al endotelio por 1 hora y marcadas con carboxifluoresceína (microscopía confocal), sin embargo en ese tiempo no hubo expresión significativa de moléculas de adhesión asociadas a las zonas de células adheridas. Solo el caso de ICAM-1 hubo un incremento en la expresión determinada por inmunofluorescencia en las venas activadas. Este tipo de modelo permitió evaluar en la respuesta endotelial en condiciones más cercanas al microambiente inflamatorio.

## ABSTRACT

Acute or chronic inflammatory process is an important part in the etiology of a host of chronic degenerative diseases. Interactions between immune cells with their microenvironment cells are critical in cell activation and amplification of the inflammatory response. The importance of hemodynamic microenvironment factors are now recognized as vascular flow and the frictional forces present in vessels and arteries. In this work an ex-vivo human umbilical vein model that allowed studying the interactions of leukocytes to activated endothelium with TNF- $\alpha$  for 2 hours under laminar flow 1 ml / min and 2.2 dyne / cm<sup>2</sup> was developed. Veins with high viability and integrity of endothelial cell were used in a period no longer than 5 hours (vital stains and the release of lactate dehydrogenase (LDH)), the functionality of the endothelium was measured by the increase in nitric oxide (reaction Griess) in response to TNF- $\alpha$ , and IL8 production, TNF- $\alpha$  and IL-4 identified in the perfusion medium (immunosorbent assay, ELISA). Veins activated increased their adhesive capacity circulating U937 monocytic cells to the endothelium for 1 hour and labeled with carboxyfluorescein (confocal microscopy), but at that time there was no significant expression of adhesion molecules associated with adherent cells areas. Only the case of ICAM-1 was an increase in the expression determined by immunofluorescence on activated veins. This type of model allowed assessing endothelial response in conditions closer to the inflammatory microenvironment.

## INTRODUCCION

### Respuesta inflamatoria

Al producirse una herida de la piel o de las mucosas, los microorganismos pueden pasar del medio externo al interno. En un intento de localizar al agente invasor se produce una reacción en el tejido conectivo vascularizado que se denomina inflamación. La inflamación puede ser originada por factores endógenos (necrosis tisular o rotura ósea) o factores exógenos como lesiones por agentes mecánicos (corte, etc), físicos (quemaduras), químicos (corrosivos), biológicos (microorganismos) e inmunológicos (reacciones de hipersensibilidad). En algunos casos como la hipersensibilidad, la inflamación puede tener consecuencias nocivas, sin embargo en general es una respuesta protectora que trata de restaurar los tejidos lesionados.

En la respuesta inflamatoria participan componentes del plasma sanguíneo, células circulantes, vasos sanguíneos y constituyentes celulares y extracelulares del tejido conectivo. Entre las células circulantes que participan durante la inflamación se incluyen los neutrófilos, monocitos, eosinófilos, linfocitos, basófilos y plaquetas. Las células del tejido conectivo son los mastocitos, que rodean los vasos sanguíneos y los fibroblastos. La matriz extracelular consiste en proteínas fibrosas estructurales (colágeno, elastina), glicoproteínas adherentes (fibronectina, laminina, entactina, tenascina entre otras) y proteoglicanos. La membrana basal es un componente especializado de la matriz extracelular que consiste en glicoproteínas adhesivas y proteoglicanos [1].

## Tipos de inflamación

La inflamación puede ser aguda y crónica. La aguda es de duración relativamente corta (minutos, horas o unos pocos días), se inicia muy rápidamente y se caracteriza por el exudado de fluidos plasmáticos y la migración de leucocitos predominantemente neutrófilos. La inflamación crónica dura semanas, meses o incluso años y se caracteriza histológicamente por el infiltrado de linfocitos y macrófagos con la proliferación de vasos sanguíneos y tejido conectivo

### Inflamación aguda

Los cambios que se producen tras la lesión tisular se deben a tres procesos:

- Cambios en el flujo y calibre vascular que hacen que aumente el flujo sanguíneo
- Cambios estructurales en los vasos sanguíneos que aumentan la permeabilidad vascular e inducen la formación de exudado inflamatorio
- Movimiento de los leucocitos del espacio vascular al extravascular alcanzando así el foco de las lesiones.

El resultado de todo ello es el acumulo de un fluido rico en proteínas, fibrina y leucocitos en el sitio afectado. En los primeros 10-15 minutos se produce una hiperhemia por dilatación de arteriolas y vénulas y apertura de los vasos de pequeño calibre. Posteriormente aumenta la viscosidad de la sangre, lo que reduce la velocidad del flujo sanguíneo. Al disminuir la presión hidrostática en los capilares, la presión

osmótica del plasma aumenta y en consecuencia un líquido rico en proteínas sale de los vasos sanguíneos originando el exudado inflamatorio.

### Inflamación crónica

Si la inflamación dura semanas o meses se considera crónica, y tiene dos características importantes:

- El infiltrado celular se compone sobre todo por macrófagos, linfocitos y células plasmáticas
- La reacción inflamatoria es más productiva que exudativa, es decir, que la formación de tejido fibroso prevalece sobre el exudado de líquidos.

La inflamación crónica puede producirse por diversas causas: a) progresión de una inflamación aguda; b) episodios recurrentes de inflamación aguda; c) inflamación crónica desde el comienzo asociada frecuentemente a infecciones intracelulares (tuberculosis, lepra, etc). Microscópicamente la inflamación crónica se caracteriza por la presencia de macrófagos y sus derivados (células epitelioides y gigantes), linfocitos, células plasmáticas, neutrófilos, eosinófilos y fibroblastos [2].

### Migración leucocitaria

Inicialmente, en la inflamación aguda se acumulan predominantemente los leucocitos neutrófilos polimorfonucleares y en las fases tardías, los monocitos y macrófagos. Hay tres fases para el reclutamiento de las células en la región dañada, es decir, la extravasación o salida de las células desde la luz del vaso al espacio

intersticial. En el capítulo dedicado al estudio de las moléculas adhesión se analiza la función de las mismas en los procesos de migración leucocitaria.

Normalmente las células ocupan la parte central del torrente sanguíneo teniendo muy poco contacto con el endotelio. Al aumentar la permeabilidad vascular, el flujo sanguíneo disminuye, lo que permite a los leucocitos acercarse al endotelio vascular. Este proceso se denomina marginación y se debe a los cambios hemodinámicos producidos en la inflamación [3]. Los leucocitos escapan del torrente circulatorio mediante un movimiento ameboide activo. Cuando los leucocitos entran en contacto con la célula endotelial, proyectan pseudópodos y migran por la superficie hasta que detectan una unión celular inter-endotelial (Figura 1). Durante su paso desde la luz vascular al tejido extravascular, el leucocito rompe las uniones inter-endoteliales y la membrana basal probablemente a través de la secreción de colagenasa [4].

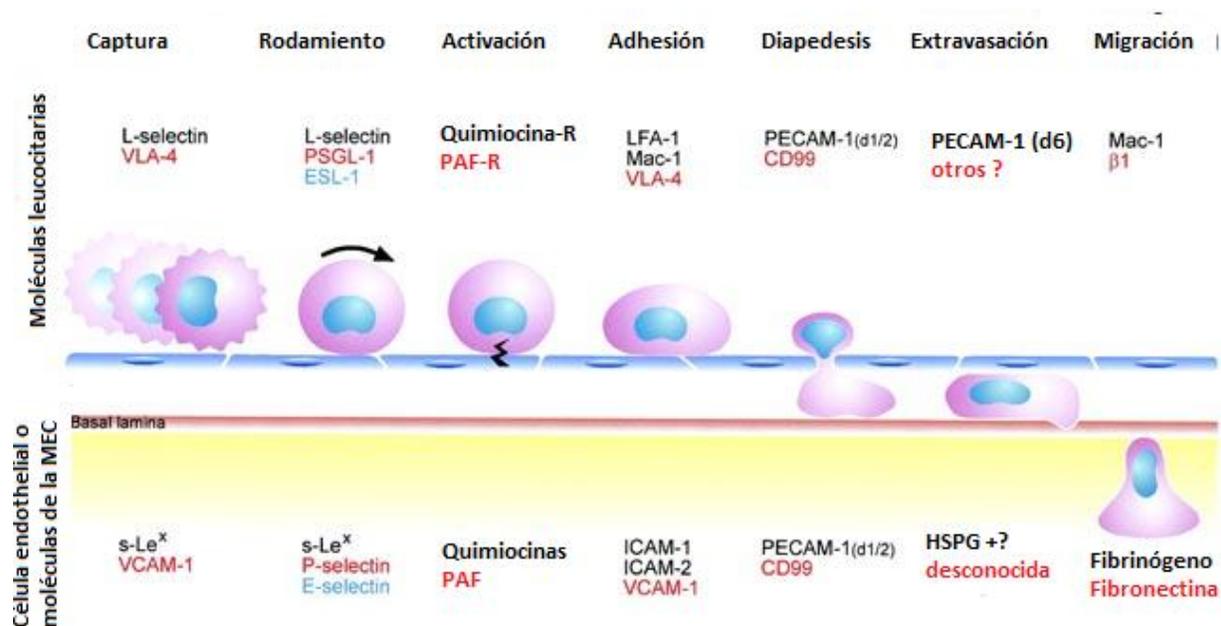


Figura 1.- Etapas de la migración leucocitaria y el papel de moléculas de adhesión y quimiocinas en el endotelio vascular y leucocitos. Modificada de William A Mullery, Lab. Invest 2002.

El tipo de leucocito que migra depende mucho del tiempo que dura la inflamación y del tipo de estímulo. En la mayoría de los casos, en la inflamación aguda los neutrófilos son las células predominantes durante las primeras 24 horas. Estas células empiezan a acumularse en los primeros minutos tras la lesión, mientras que los monocitos y macrófagos se acumulan más tarde. Una vez llevada a cabo la extravasación, los leucocitos migran en los tejidos a los lugares donde se ha producido la lesión mediante el proceso de quimiotaxis [5-7].

## Componentes moleculares de la inflamación

En la inmunidad innata intervienen las barreras físicas y químicas, tales como: el epitelio y las sustancias antimicrobianas producidas en las superficies epiteliales (ej. criptidinas en el intestino delgado). Las proteínas plasmáticas, las cuales incluyen miembros del sistema de complemento, proteínas de fase aguda y otros mediadores de inflamación. Las células NK (natural killers), linfocitos T y células B-1, neutrófilos, macrófagos y leucocitos granulares. Los fagocitos realizan una labor de gran importancia, ya que son los principales productores de las citocinas IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 y TNF- $\alpha$  y además liberan otras moléculas como la enzima activadora de plasminógeno, fosfolipasas, especies reactivas de oxígeno, el factor activador de plaquetas, óxido nítrico y mediadores lipídicos de inflamación, tales como prostaglandinas y leucotrienos.

## Mediadores Químicos

Estos mediadores se encuentran en el plasma y deben ser activados para ejercer su función. También pueden estar en las células donde permanecen almacenados siendo secretados o sintetizados de novo en respuesta a un estímulo. Las células que los almacenan son principalmente las plaquetas, los polimorfonucleares, monocitos, macrófagos y mastocitos. Estas sustancias pueden tener efectos autócrinos, parácrinos o endócrinos; una vez liberados y activados tienen una vida media muy corta debido a su efecto tóxico. La mayoría tienen efectos secundarios perjudiciales

como son la destrucción de tejidos, convirtiendo así la inflamación en una autoagresión.

## Citocinas

Las citocinas son proteínas solubles de bajo peso molecular, mediadoras de crecimiento celular, inflamación, inmunidad, diferenciación y reparación, entre otras actividades. Además de las células del sistema inmune, las citocinas son producidas por diferentes tipos celulares durante la activación de la inmunidad innata y adquirida. Son el principal medio de comunicación intracelular ante una invasión microbiana. Las citocinas sirven para iniciar la respuesta inflamatoria, y para definir la magnitud y naturaleza de la respuesta inmune específica [8]. Algunos de los receptores para reconocimiento del patrón, activan vías de transducción de señal que inducen la expresión de una gran variedad de genes de la respuesta inmune, donde se incluyen los genes para citocinas inflamatorias. Los receptores de la familia toll (TLR), se identificaron recientemente y sus vías de transducción de señal conducen a la activación de factores de transcripción de la familia del factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). La liberación de citocinas también es inducida por pequeños péptidos liberados en la cascada del complemento, como es el caso de los macrófagos al liberar citocinas determinan la forma de la respuesta inmune [9].

Las endotoxinas, tales como LPS, estimulan también la producción de citocinas por parte de los macrófagos y otras células. Las citocinas IL-1 y TNF- $\alpha$  promueven la expresión de moléculas de superficie tales como ICAM y selectinas sobre células

endoteliales, para contribuir a la acumulación de leucocitos en sitios locales de inflamación. Igualmente, provocan que fagocitos mononucleares y células endoteliales sintetizen quimiocinas activadoras de leucocitos. Además, el TNF- $\alpha$  activa al endotelio vascular e incrementa su permeabilidad, lo cual provoca un incremento en la entrada de IgG, complemento y células a los tejidos e incrementa el fluido de drenaje hacia los nódulos linfoides. Una vez atraídas las células, el TNF- $\alpha$  estimula a neutrófilos, eosinófilos y fagocitos mononucleares para lisar microorganismos. Los neutrófilos son la principal línea de defensa contra hongos, ya que además de la fagocitosis presumiblemente liberan especies reactivas de oxígeno y enzimas lisosomales para ocasionar la eliminación del patógeno.

Los microorganismos intracelulares o sus productos inducen la producción de IL-12 por monocitos y neutrófilos. La IL-12 en colaboración con la IL-18, incrementan la función citolítica de células NK y linfocitos T CD8+ activados (CTLs), estimulan la secreción de IFN- $\gamma$  por células T y NK, y el desarrollo de respuestas tipo Th1. La IL-12 se puede clasificar como un regulador de inmunidad innata, debido a que los macrófagos activados por microorganismos la secretan con la finalidad de desarrollar las funciones efectoras de las células NK. Al mismo tiempo es un importante vínculo entre inmunidad natural e inmunidad adaptativa contra virus y bacterias [10, 11].

Las citocinas antivirales por excelencia son los interferones tipo I. Inhiben la replicación viral debido a que inducen en las células la síntesis de enzimas, tales como la 2'-5' oligoadenilato sintetasa, que colectivamente interfieren la replicación del ARN y ADN [12]. Esta actividad antimicrobiana puede ser parácrina. Incrementan el

potencial lítico de células NK infectadas viralmente en etapas tempranas de una enfermedad, antes del inicio de la respuesta inmune específica. Las citosinas pueden modular la expresión de moléculas de histocompatibilidad MHC, aumentan la expresión de MHC clase-I y reducen la de MHC clase-II, lo cual aumenta la eficiencia de lisis mediada por linfocitos T citotóxicos. Además, los IFNs tipo I promueven la liberación de interleucinas pro-inflamatorias y óxido nítrico por células dendríticas y macrófagos. Algunas, citocinas incluyendo IL-12, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  son importantes activadores de la respuesta de fase aguda.

La regulación de esta intrincada red de citocinas está controlada principalmente por la IL-10. Su función es interferir la síntesis de las citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6 y GM-CSF por células T y regular negativamente la síntesis de IL-1, IL-6, IL-8 y TNF por macrófagos. Sin embargo, puede potenciar la expresión de IL-15 en macrófagos murinos activados, lo cual de acuerdo a su efecto regulador negativo sobre IL-2 sugiere un soporte paradójico para la respuesta inmune mediada por células. La IL-10, sobrerregula la expresión de MHC clase II, soporta el crecimiento y la producción de inmunoglobulinas en células B. La IL-10 inhibe las funciones accesorias de los macrófagos en la activación de las células T, este efecto se debe a la expresión reducida de las moléculas MHC clase-II y de las moléculas coestimuladoras B7-1 y B7-2. El efecto total de estas acciones es inhibir la respuesta inespecífica y la mediada por células [13-15].

El factor de transcripción NF $\kappa$ B es el corazón central en el control de la inflamación mediada por citocinas. La rápida inducción de citocinas y moléculas de adhesión por este factor es importante en el proceso inflamatorio mediante la vía de activación dependiente de TNF- $\alpha$  [16, 17]. La sobreproducción de TNF- $\alpha$  se presenta en distintas enfermedades que incluyen choque séptico, aterosclerosis, artritis reumatoide, diabetes, cáncer, etc [18, 19].

#### NF- $\kappa$ B En la respuesta inflamatoria

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B fue inicialmente identificado como un regulador de la expresión de la cadena ligera kappa de linfocitos B murinos. Subsecuentemente se ha encontrado que es un regulador de genes de respuesta temprana involucrados en la comunicación intercelular, reclutamiento o trasmigración, amplificación de señales patogénicas y en la aceleración de la tumorigenesis (Figura 2) [20].

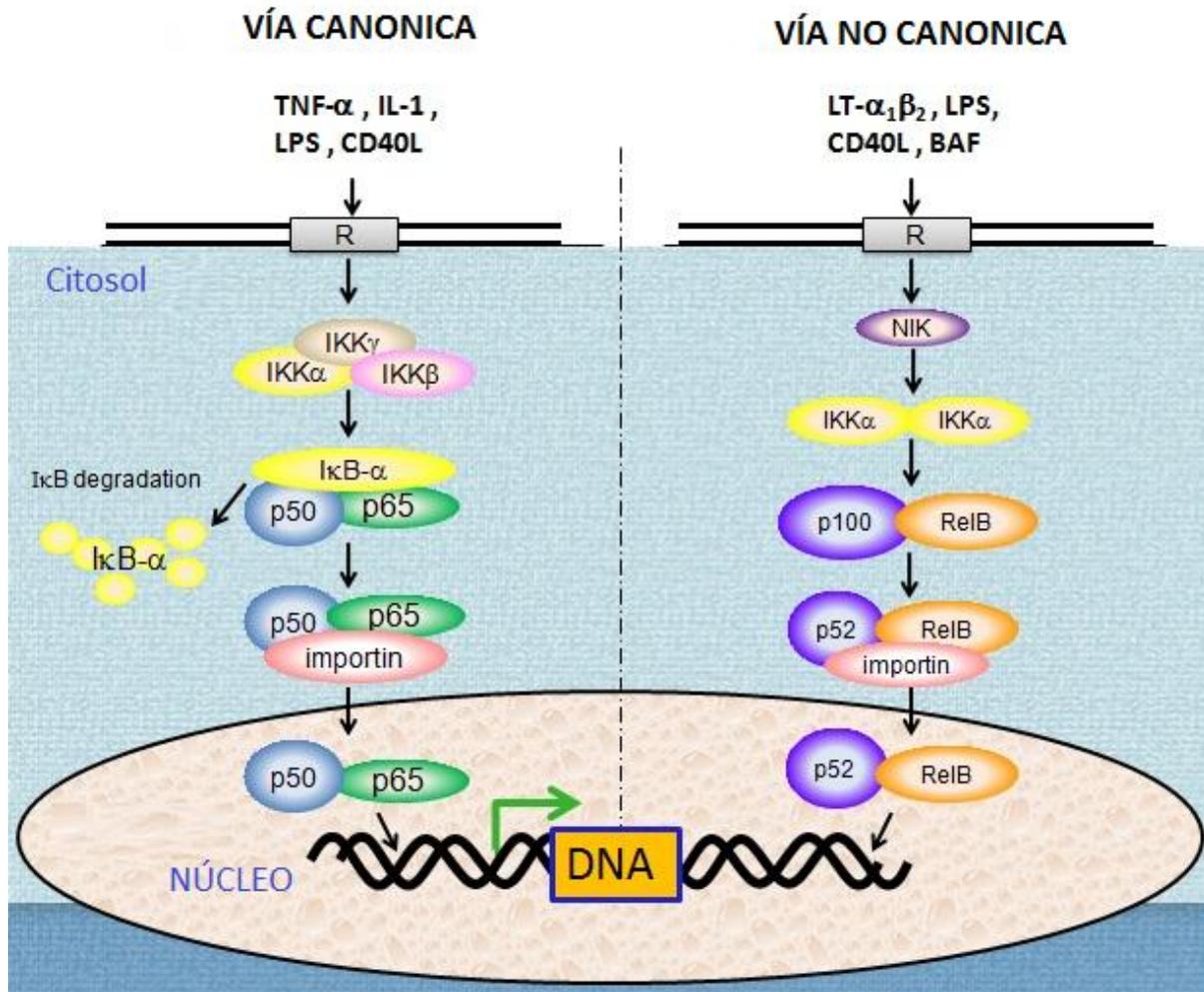


Figura 2.- La imagen muestra las dos vías de activación más frecuentes a nivel de membrana del factor de transcripción NFκB. La activación del factor permite que en forma de dímero se trasloque al núcleo para inducir la expresión génica de moléculas pro-inflamatorias principalmente en leucocitos. Modificada de

Actualmente se han identificado cinco miembros de la familia NF-κB en mamíferos, estos incluyen: NF- Kb1 (p50/p105), NF- κB2 (p52/p100), RelA , p65, p62, y c-Rel. Todos ellos comparten un dominio de homología Rel altamente conservado, el cual es

responsable de la unión al ADN, dimerización e interacción con los inhibidores intracelulares de NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ Bs) [21, 22].

La expresión de genes de respuesta temprana mediada por miembros de la familia de factores de transcripción NF- $\kappa$ B es inducida por una amplia variedad de señales. Entre estas se incluyen citocinas, mitógenos, partículas ambientales, metales tóxicos, estrés intracelular, productos virales o bacterianos y luz UV.

En las células en reposo, el factor NF- $\kappa$ B, se encuentra secuestrado en forma inactiva en el citoplasma a través de su asociación con una de varias moléculas inhibitoras de la familia I $\kappa$ B. Todas las proteínas I $\kappa$ B contienen dos residuos conservados de serina (Ser 32 y Ser 36) en su dominio N-terminal. La fosforilación de estos residuos, en respuesta a los inductores, permite la inmediata poliubiquitinación de la proteína I $\kappa$ B por el complejo SCF- $\beta$ -TrCP que actúa como ubiquitin-transferasa tipo 3. Esta modificación convierte a la proteína en un blanco para la rápida degradación por parte del proteosoma 26 S. La degradación de los I $\kappa$ Bs puede ser completa o parcial, como el procesamiento del carboxilo terminal en p105 y p100. La degradación del inhibidor permite la liberación y translocación del NF- $\kappa$ B al núcleo, donde se une a secuencias específicas en regiones reguladoras del ADN (designados como elementos  $\kappa$ B).

La unión a los elementos  $\kappa$ B resulta en la activación de la transcripción de genes mediadores de la inflamación, carcinogénesis y reacciones pro o anti apoptóticas. Para

algunas formas de NF- $\kappa$ B como el heterodimero p50/p50 también se ha reportado un efecto inhibitorio de la transcripción [23, 24].

## Enfermedades inflamatorias

La inflamación es un componente secundario importante de muchas enfermedades humanas, incluyendo el asma, la enfermedad de Crohn, la artritis reumatoide, la polimialgia reumática, tendinitis, bursitis, laringitis, gingivitis, gastritis, otitis, enfermedad celíaca (intolerancia al gluten), diverticulitis (infección de los divertículos en el colon), y enfermedad inflamatoria intestinal. Además, un número de enfermedades crónicas tienen componentes inflamatorios, tales como la aterosclerosis, obesidad, diabetes, cáncer, e incluso la enfermedad de Alzheimer. Las causas de varias de estas enfermedades son desconocidas y el papel de la inflamación en la patogénesis de muchas enfermedades está todavía en investigación. Por ejemplo, se sabe que el tejido adiposo secreta varios factores inflamatorios (adipocitocinas) y que la obesidad está asociada con la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo; sin embargo, el papel exacto de la inflamación en la patogénesis de la obesidad es actualmente desconocido. La correlación entre la diabetes tipo 2 y la obesidad está muy bien estudiada, la inflamación promueve la resistencia a la insulina, una característica central de la diabetes y el síndrome metabólico que le precede. Un ejemplo más es la aterosclerosis, la cual implica un endurecimiento de las arterias,

donde la inflamación puede causar más daño a las arterias en un fallido intento de sanar la pared de la arteria [25-27].

Las enfermedades reumáticas forman un grupo de patologías cuyos elementos comunes son la producción de auto-anticuerpos o anticuerpos frente a organelos de las células del propio individuo, así como de complejos inmunes y la presencia de mecanismos anómalos de inmunidad celular. La evolución clínica de este conjunto de enfermedades puede variar ampliamente a lo largo del tiempo y desarrollarse siguiendo pautas muy individualizadas. Las formas más comunes son la esclerodermia, el lupus sistémico eritematoso, la esclerosis sistémica progresiva, el síndrome de Sjögren, la enfermedad mixta del tejido conectivo y, especialmente, la artritis reumatoide. A pesar de la reciente e inminente introducción de nuevas y poderosas drogas para la artritis reumatoidea todavía no existe una mejora completa del paciente aun cuando surgen constantemente nuevos tratamientos. Los investigadores al menos ya saben desde hace algún tiempo que las metaloproteinasas matrices desempeñan un papel principal en la destrucción de las articulaciones en la artritis reumatoidea [28-30].

## Biología del endotelio vascular

### Endotelio Vascular

La formación del endotelio se inicia temprano durante la embriogénesis. El endotelio vascular es responsable de la circulación del torrente sanguíneo, la fluidez de la sangre, el tono vascular y los mecanismos de defensa del organismo tan importantes como el fenómeno inflamatorio y la respuesta inmune. El endotelio, por su localización estratégica, separa el medio exterior agresivo del intersticio tisular cumpliendo una función de defensa del huésped a nivel del tegumento mucocutáneo, el pulmón, el tracto gastrointestinal y el sistema cardiovascular. Anteriormente se le consideraba como un recubrimiento inerte de los vasos sanguíneos. En las últimas décadas se han descubierto otras funciones cruciales del endotelio vascular, se sabe que el endotelio es capaz de sintetizar, almacenar y liberar moléculas especiales que inciden en el funcionamiento normal de órganos diferentes. El endotelio cumple una función de “esponja” al almacenar moléculas producidas por él mismo y sustancias no endoteliales. El manto endotelial provee una superficie activa para el intercambio gaseoso, acuoso, macromolecular y para el tráfico celular [31]. El endotelio constituye una capa unicelular continua que sirve de interfase estructural y funcionalmente entre el torrente circulatorio y la pared vascular. Por su localización especial, capta señales químicas, físicas e inmunológicas y de acuerdo con éstas cumple funciones específicas en salud y enfermedad [32].

Las señales son reconocidas por el endotelio y traducidas en mensajes intracelulares, dando como resultado la activación de genes que llevan a la síntesis de autacoides (histamina, serotonina, entre otros) que actúan sobre la pared vascular y la población celular intravascular. El endotelio comanda los procesos de antitrombogenicidad, vasoconstricción y vasodilatación, éxodo de la población blanca intravascular y angiogénesis. Es el responsable de la aterosclerosis y de la hipertensión arterial al regular la composición de la matriz extracelular, la acumulación lipídica y el comportamiento de la célula muscular lisa de la pared vascular. El endotelio es un órgano ubicuo, de espesor mínimo (unicelular), anti y pro adhesivo, tromborresistente, con características anticoagulantes y fibrinolíticas y comportamiento multifuncional, bifásico, paraneuronal y circadiano [33].

El endotelio constituye una interfase unicelular, dinámicamente mutable y bioquímicamente activa, entre el torrente circulatorio y la intimidad de los tejidos y de los órganos de la economía animal, cumpliendo función de “portero”. El endotelio es un órgano de espesor unicelular, pero sorprendentemente multifuncional y de gran plasticidad.

La célula endotelial (CE) reposa sobre una membrana basal sintetizada por ella misma, en directo contacto con una estructura delgada, la íntima, de linaje hematopoyético, cuya población mesenquimal indiferenciada se aprecia inmersa en una matriz extracelular sui generis. Esta población mesenquimal indiferenciada debe ser considerada como predeterminada, competente, pluripotente, capaz de diferenciarse en CE, macrófago de íntima, linfocito, dendrocito, mastocito, fibroblasto,

célula muscular lisa de la íntima y aun osteoblasto (Figura 3). La matriz extracelular subendotelial es una superficie trombogénica que favorece la adhesión plaquetaria y la activación del sistema de la coagulación. La íntima separa el recubrimiento endotelial de la media, teniendo como límite externo la túnica o lámina elástica interna, representada por una pared agujereada de tejido elástico que por su aspecto morfológico se ha comparado con la “red del pescador” [34, 35].

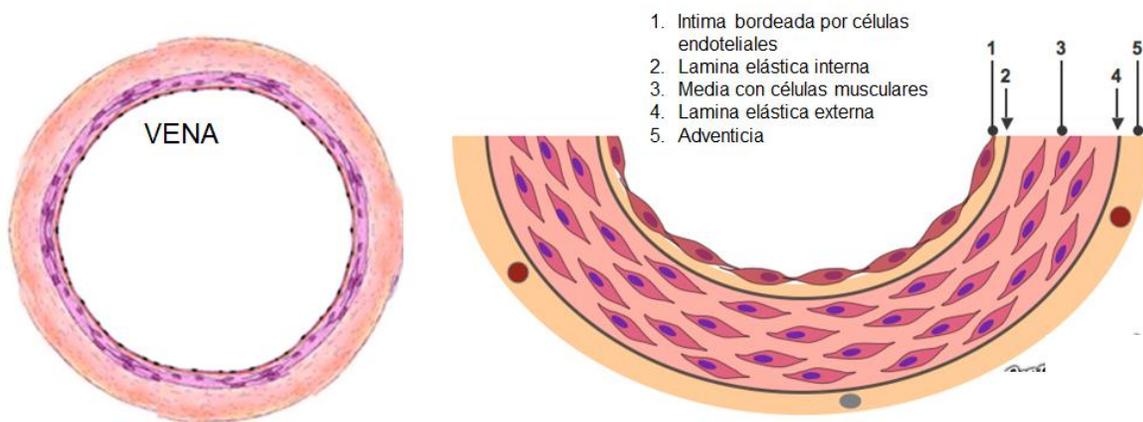


FIGURA 3.- Composición de una vena humana. La imagen muestra los componentes celulares de una vena humana y la ubicación del endotelio en la cara interna de la vena. Modificada de D. Souza, 2009.

El endotelio, localizado estratégicamente, capta toda clase de estímulos intravasculares y los transmite a la íntima y a la media. La fuerza hemodinámica de un estrés por fricción (shear stress) de 10 dinas/cm<sup>2</sup> es captada por el recubrimiento

endotelial, orquestando el comportamiento y la regulación genética del endotelio y de la población celular de la íntima con la respectiva activación transcripcional y traduccional. Las arterias y venas se caracterizan por poseer tres capas o tunicas: íntima, media y adventicia, claramente distinguibles en los vasos de mayor calibre. La íntima se encuentra en de los vasos de gran calibre como son la aorta y sus grandes ramas, está revestida por las células endoteliales y por el tejido conjuntivo sub-endotelial subyacente, éste último constituido por colágeno, proteoglicános, elastina y otras glicoproteínas de la matriz intracelular. Las células endoteliales son esenciales en la vascularización y cubren cerca de 1000 m<sup>2</sup> en promedio en humanos adultos. El endotelio, componente principal de la pared arterial, reviste arterias y venas formando la interfase antitrombótica entre la sangre y los tejidos subendoteliales potencialmente trombogénicos. Es por eso, que la integridad del endotelio es un requerimiento fundamental para considerar la estructura y función normales de la pared vascular. El endotelio es una membrana semipermeable que controla el paso de moléculas pequeñas y grandes a la pared arterial. A pesar de tener una estructura aparentemente simple, es un tejido con múltiples funciones sintéticas y metabólicas.

Las células endoteliales se unen a través de receptores de superficie, a un número de proteínas en la matriz interna incluyendo a la fibronectina, la vitronectina, las colágenas, la laminina y FVW. Estas interacciones tienen una importancia particular en la cicatrización, la respiración vascular y la angiogénesis [36]. Las células endoteliales a su vez expresan sobre su superficie a distintas  $\beta 1$  integrinas, la integrina  $\alpha\beta 3$  y receptores de vitronectina. Estos últimos son importantes en la adhesión de

células endoteliales, la extensión y formación de contacto focal sobre una variedad de proteínas de la matriz que parecen ser importantes componentes de la metástasis y la angiogénesis [37].

El estudio del órgano endotelial ha llevado a lo que hoy se conoce con el nombre de Medicina Vascular y se hace referencia a enfermedades vasculares, desórdenes vasculares, biología vascular y enfermedades angiogénicas. En igual forma, se ha concluido que el endotelio funciona sincrónicamente con la pared vascular y la adventicia, y por eso se habla del órgano endotelial. Éste conforma trece barreras que coordinan todo el funcionamiento del organismo humano y por esta razón se considera que el endotelio es la vida y la muerte del organismo animal. La información sobre la fisiopatología de las diferentes enfermedades, actualmente se abarca con un amplio conocimiento del órgano endotelial.

#### Funciones del endotelio

Hace tan solo unas décadas se pensaba que el endotelio vascular era inerte, sin embargo, actualmente se ha demostrado que las células endoteliales intervienen activamente en los fenómenos de coagulación, regulación del tono vascular, inflamación, neo-vascularización en algunos estados patológicos como los tumores o la retinopatía diabética, y posiblemente en la presentación antigénica. Asimismo, el endotelio vascular es determinante en la patogénesis de ciertas entidades reumáticas como la esclerosis sistémica progresiva, tanto la forma difusa como la variante localizada.

## Regulación del tono vascular

Una de las funciones del endotelio consiste en regular el tono vascular a través de sustancias vasoactivas como el óxido nítrico (NO) y el factor polarizante derivado del endotelio [38]. Entre tales compuestos existe un delicado equilibrio que permite mantener la presión arterial y el tono vascular dentro de los límites normales, así como definir el comportamiento de las citocinas y las selectinas que son moléculas de adhesión. Por otra parte, también sintetizan compuestos vasoconstrictores como endotelina 1, tromboxano A<sub>2</sub>, prostaglandina F<sub>2</sub> alfa y anión superóxido. De allí su importancia actual en la patogenia de la aterosclerosis, la hipertensión arterial y los trastornos hemodinámicos de la sepsis. Esta función determina aspectos como la reacción de los vasos sanguíneos ante las variaciones del flujo y el control de la resistencia vascular, por lo que es uno de los contribuyentes principales en el mantenimiento de la tensión arterial.

La enzima óxido nítrico-sintasa (NOS) lleva a cabo la síntesis del NO a partir del aminoácido L-arginina, que a su vez, difunde hacia el músculo liso de la túnica media de la vena y activa a los miocitos a través de la guanilato ciclasa, ocasionando un incremento en los niveles de cGMP. Entre las sustancias que estimulan la producción de NO se encuentran la bradicinina, la trombina y la acetilcolina, pero de igual manera las fuerzas de tensión sobre la pared vascular que se generan por el aumento de flujo sanguíneo, estimulan la producción de este compuesto. Es importante mencionar que el ON es un mediador inflamatorio en estado gaseoso [39, 40]. El ON difunde hacia las células del músculo vascular liso, originando vasodilatación. En algunas

situaciones, la NOS inducible de los macrófagos, produce grandes cantidades de NO, que inhiben la producción de ATP [41], por consiguiente impide la proliferación patógena de bacterias, hongos y parásitos. El ON puede inhibir la adhesión plaquetaria al endotelio vascular dañado, contribuyendo a la trombosis arterial, y a su vez, el paso inicial que con lleva a la activación, y con ello a la agregación o liberación plaquetaria [42, 43]. Como ya se ha mencionado el endotelio puede producir NO en cantidades variables dependiendo del estímulo, el cual ejerce funciones anti-inflamatorias y antiaterogénicas de primer orden. Por ejemplo, inhibe la expresión de P-selectina, ICAM-1 y VCAM-1, mediante mecanismos intracelulares que implican el bloqueo de proteínas cinasas C y del factor NFκB. Además, bloquea la NOX, enzima esencial para la producción de radicales superóxido por parte de los leucocitos. Por último, disminuye la síntesis y liberación de la proteína quimiotáctica de monocitos tipo 1, que es el principal factor atrayente para dichas células [44-46].

### Vasoconstricción

Las endotelinas son polipéptidos de 21 aminoácidos sintetizadas en el endotelio a partir de un precursor conocido como preproendotelina. Aunque existen tres variedades diferentes, tan solo la endotelina-1 es producida por la íntima vascular, bajo el influjo de diferentes factores como la angiotensina II, catecolaminas, lipoproteínas e insulina, y de fenómenos como la hipoxia e isquemia tisular. De igual manera, factores como prostaglandinas o la hormona natriurética auricular tienden a inhibir su producción. Se han descrito dos receptores (tipo A y B) que son los responsables de la acción biológica de la endotelina, sin embargo, el receptor tipo A, localizado en los

miocitos de la pared vascular y las fibras del miocardio, es el que tiene mayor importancia. La síntesis de estos receptores se incrementa por acción del AMPc, factor de crecimiento epidérmico y estrógenos y se inhibe cuando se expone a la endotelina-1, angiotensina II y al factor de crecimiento derivado de las plaquetas. La activación de estos receptores induce fenómenos de vasoconstricción mediados por fosfolipasa C, enzima que degrada los lípidos de membrana generando diacilglicerol e inositol trifosfato (IP3); este a su vez incrementa la concentración citosólica de calcio, favoreciendo la contracción del músculo liso; además el calcio y el diacilglicerol poseen acciones mitógenicas, por lo cual la liberación sostenida de endotelina-1, es capaz de producir hiperplasia de la capa media de los vasos sanguíneos ocasionando vasoconstricción.

### Coagulación y fibrinólisis

Durante muchos años la incapacidad del endotelio de activar la cascada de coagulación y fomentar la adhesión de plaquetas se consideró una función pasiva relacionada con ciertas carencias más que como resultado de su participación activa en la hemostasia. Esta idea cambió al descubrirse que las CE producían prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), un extraordinario inhibidor de la agregación plaquetaria. Posteriormente, se descubrió que el ON actúa sinérgicamente con la prostaciclina como antiagregante plaquetario. De hecho, el ON inhibe la adhesión, la activación, la secreción y la agregación plaquetaria. El endotelio ejerce un papel central en la regulación de la hemostasia ya que aporta importantes elementos de los sistemas de coagulación, trombosis y fibrinólisis del organismo. Además de ON y PGI<sub>2</sub>, las CE producen

trombomodulina, moléculas con actividad heparina-like y ADPasa, que hidroliza el ADP (agregante plaquetario). El endotelio también regula la fibrinólisis, ya que produce activador tisular del plasminógeno (t-PA), urocinasa e inhibidor-1 del t-PA (PAI-1). La susceptibilidad individual a la alteración de esta función endotelial por la hipertrigliceridemia parece ligada a la presencia de ciertas variantes polimórficas en el gen del PA-1, como el polimorfismo Hindi que se ha asociado con diferencias en la actividad y la capacidad de las VLDL de modular la producción de PAI-140. Algunos estudios epidemiológicos han encontrado una asociación entre los valores elevados de colesterol en plasma y tiempo prolongado de euglobina, lo que sugiere una alteración del equilibrio entre la liberación de activadores del plasminógeno y sus inhibidores por el endotelio [47, 48].

## Angiogenésis

Las células endoteliales producen un grupo de factores de crecimiento que son mitógenicos para el endotelio y pueden inducir la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso conocido como angiogénesis. Este estímulo angiogénico dentro de los varios efectos que tiene, produce alargamiento y proliferación de las células endoteliales así como la reparación de nuevos vasos sanguíneos [49]. Durante la embriogénesis, el desarrollo de nuevos vasos por medio de la diferenciación de las células endoteliales se denomina vasculogénesis, y el proceso morfogénico mediante el cual se forman nuevos microvasos por ramificación de los preexistentes

se denomina angiogénesis, y ocurre durante toda la vida. En el cerebro, la angiogénesis se presenta en respuesta a una variedad de daños tales como eventos isquémicos e infarto, infección, tumores y trauma. Esta respuesta estrictamente regulada contrasta con la angiogénesis incontrolada y persistente que sucede durante el crecimiento tumoral [50].

Los estímulos angiogénicos convierten a las células endoteliales en un fenotipo proliferativo y migratorio que expresa factores de crecimiento, proteasas e inhibidores de proteasas, moléculas de adhesión y receptores. Para iniciar el proceso de migración de las células endoteliales, se requieren enzimas proteolíticas que rompan la continuidad de la lámina basal. En modelos experimentales se ha observado la activación de células endoteliales a las 48 horas de la isquemia y la formación de nuevos capilares a los siete días [51]. El VEGF es una proteína angiogénica que juega un rol importante en la homeostasis y al mismo tiempo es un regulador de la embriogénesis, el ciclo menstrual y la cicatrización [52-54], tanto VEGF como proteínas semejantes estimulan la formación de nuevos vasos sanguíneos o neovascularización, estando este proceso presente en la carcinogénesis y metástasis. VEGF y otros factores angiogénicos se sobre expresan en múltiples tipos de tumores y frecuentemente sirven como marcadores negativos de pacientes con cáncer [55, 56].

## La activación del endotelio

La adquisición del fenotipo activado es similar a la diferenciación de las células hematopoyéticas, con la diferencia de que éste último evento es unidireccional; esto es, las células se comprometen a un cierto linaje y no pueden revertir su fenotipo. En cambio, si bien el fenotipo constitutivo de las células endoteliales puede pasar a un estado activado, después de 12 a 24 h dependiendo del estímulo las células endoteliales regresan al fenotipo constitutivo.

## El fenotipo activado

La habilidad de diferentes tipos celulares para trans-diferenciarse muestra la capacidad para adaptarse a los requerimientos locales y así ampliar el rango de funciones metabólicas y fisiológicas que pueden realizar. La activación endotelial está asociada a distintos cambios fenotípicos que, de una manera semejante al proceso de trans-diferenciación del fenotipo constitutivo, sirve para que la célula se adapte localmente a los requerimientos funcionales que se necesitan, durante condiciones como daño tisular, la presencia local de agentes infecciosos o cambios en las condiciones de perfusión. Normalmente, se considera que las células endoteliales están activadas cuando están proliferando o cuando permiten la adhesión de células sanguíneas.

El fenómeno de activación se lleva a cabo principalmente en la microvasculatura (precapilares, capilares y venas postcapilares) e involucra la expresión de genes de

"activación" en células endoteliales de diferentes tejidos y órganos, que por sí son heterogéneas en su morfología, fisiología y función. Sin embargo, la mayor parte de los estudios realizados in vitro para analizar la activación endotelial se han efectuado con células endoteliales primarias derivadas de grandes vasos como la aorta de bovino o la vena umbilical de humanos. Los 'genes de activación' se expresan sin afectar a los genes de diferenciación que distinguen a las células endoteliales maduras de sus precursores [57, 58]. Sin embargo, una clara diferencia entre los genes que se expresan en el estado activado y aquellos que definen el estado diferenciado de las células endoteliales radica en que la expresión de los primeros es un fenómeno transitorio en donde la magnitud y la duración de su expresión es dependiente de señales micro ambientales, como puede ser la presencia de citocinas pro-inflamatorias. En algunos casos patológicos, como la formación de placas ateroscleróticas, la constante presencia de señales pro-inflamatorias transforman una respuesta endotelial transitoria en permanente.

Actualmente se sabe que son muchos los elementos de regulación transcripcional que participan en la transición del estado endotelial quiescente al estado activado, se ha reconocido que uno de los encargados centrales de encender los genes que caracterizan al estado activado en un proceso inflamatorio es el factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B del cual depende la expresión de diversas moléculas de adhesión, citocinas y algunos factores de crecimiento.

Un tercer fenotipo endotelial se presenta durante la angiogénesis disparada por mecanismos parácrinos y autocrinos, que permite a las células endoteliales separarse

de vasos pre-existentes y entrar a una cascada morfogénica que lleva a la formación de nuevos vasos con células endoteliales maduras. Estas células que estén migrando sufren varios cambios entre los que se encuentran alteraciones de sus propiedades adhesivas, los patrones de glicosilación de sus antígenos de superficie, la producción de citocinas, la expresión de los receptores de factores de crecimiento, un incremento en su capacidad de inducir proteólisis diferentes componentes de la matriz extracelular y suspenden sus uniones comunicantes [59].

La capacidad de respuesta de las células endoteliales a los factores de crecimiento angiogénicos depende de la expresión de los receptores para cada uno de ellos. Se ha demostrado que receptores, que son fosforilados en residuos de tirosina, se expresan diferencialmente en las células endoteliales durante la angiogénesis [60, 61].

En años recientes, el fenotipo de activación endotelial Inducido por citocinas durante la inflamación, ha sido caracterizado extensamente tanto in vivo como in vitro. Uno de los primeros pasos en la cascada inflamatoria es la expresión de moléculas de adhesión como la selectina-E (CD62E), selectina-P , VCAM-1 CD1 e ICAM-1 .

El endotelio participa en los mecanismos de la inflamación, incluyendo los procesos inflamatorios crónicos relacionados por ejemplo con el fenómeno de Raynaud primario y / o secundario asociado a las enfermedades reumáticas, posiblemente mediadas por la liberación de citosinas y por mecanismos de presentación antigénica aún no bien caracterizados para que las células circulantes como neutrófilos y monocitos puedan llegar al tejido blanco, deben atravesar la barrera

impuesta por la pared vascular. En este punto intervienen las moléculas de adhesión intercelular, localizadas en la superficie endotelial, las cuales favorecen procesos de marginamiento, rodamiento, infiltración y diapédesis. La P-selectina y la E-selectina son un ejemplo de estas moléculas, los cuales son reconocidos por secuencias específicas de proteoglicanos ubicados en la membrana del neutrófilo. Otros agentes incluyen la molécula de adhesión intercelular tipo 1 (ICAM-1) y la molécula de adhesión celular vascular 1 (VCAM -1) [62].

La adhesión leucocitaria al endotelio vascular

Las interacciones matriz extracelular-célula y célula –célula juegan un papel muy importante en la migración y la activación de leucocitos durante el proceso inflamatorio. La adhesión de leucocitos a las células endoteliales y el reclutamiento al tejido extravascular son eventos fundamentales en la patogénesis de una enfermedad inflamatoria. Existen diferentes eventos durante la cascada de reclutamiento que son dirigidos por moléculas de adhesión como las CAM's expresadas tanto en ambos leucocitos como en células endoteliales. La expresión de dichas moléculas de adhesión es inducida por varios estímulos incluyendo citocinas como  $TNF\alpha$ ,  $IL1\beta$ , quimiocinas como IL8 y mediadores lipídicos y peptídicos.

## Adhesión firme

El fenómeno de activación leucocitaria es aparentemente muy rápido y resulta en la generación de señales que inducen la activación de las integrinas de la membrana (integrinas beta-2 en el caso de los neutrófilos e integrinas beta-1, beta-2 y beta-7 en el caso de los linfocitos); como ya se ha expuesto, la activación de integrinas en la membrana resulta en un incremento significativo en su afinidad por sus ligandos, VCAM 1 para las integrinas alfa4/beta7 y alfa4/beta1 e ICAM 1 y 2 para las integrinas leucocitarias beta-2. El mismo proceso de activación leucocitaria resulta en una redistribución de las integrinas en la membrana celular y este fenómeno, aunado a la activación de las mismas, incrementa la avidéz de las integrinas del leucocito y permite la adhesión firme al endotelio. En consecuencia la redistribución de integrinas y su activación son fenómenos esenciales en la formación de las adhesiones y contactos focales y por lo tanto en la generación de señales de activación celular a través de integrinas [63, 64].

## Moléculas de adhesión

Con el término moléculas de adhesión se designa a un grupo diverso de moléculas protéicas involucradas en procesos biológicos de vital importancia como la embriogénesis; la reparación tisular; la diferenciación, crecimiento, comunicación y movilización celular. Estas moléculas se unen a contra-receptores específicos ubicados en otras células o la matriz extracelular, facilitando las interacciones celulares y la migración de ellas por los diferentes tejidos y transducen señales reguladoras de

la transcripción celular luego de la interacción con sus ligandos. Las más importantes se describen a continuación.

ICAM-1.- (Molécula de Adhesión Intercelular 1) y VCAM-1 (Molécula de Adhesión Celular Vascular 1) son miembros de la familia de inmunoglobulinas involucradas en la adhesión celular. ICAM -1 es normalmente encontrada sobre la superficie de las células endoteliales, pero su expresión puede incrementar por activación endotelial debida a citocinas o endotoxinas. La ICAM-1 se une a un miembro de integrinas de la subfamilia 1 beta como por ejemplo LFA-1 (Antígeno asociado a la función de linfocitos, también conocido CD11a/CD18) y Mac1 (Antígeno de macrófagos-1 también llamado CD11b/CD18). La adhesión de leucocitos a ICAM-1 se realiza por LFA-1 así como la movilización de Mac-1 a la superficie de la célula por fusión de los gránulos almacenados a la membrana celular [65-67].

VCAM-1.- Es una proteína endotelial transmembranal y su receptor es VLA-4 (Antígeno muy tardío-4 también conocido como CD49d/CD29). Esta integrina  $\beta$ -1 tardía media la adhesión de linfocitos, monocitos, eosinofilos y células asesinas naturales (NK) a células endoteliales activadas. Esta molécula juega una función importante en la inflamación vascular y su expresión es regulada por el factor de transcripción NF $\kappa$ B, por activación del endotelio por citocinas inflamatorias [68, 69].

SELECTINA E.- LEC-CAM-2 o ELAM-1, se expresa de manera transitoria en los endotelios vasculares en respuesta a IL1 o TNF- $\alpha$  en los procesos inflamatorios. Ella permite la adhesión de macrófagos y neutrófilos al endotelio inflamado. Esta se expresa por estimulación de citocinas inflamatorias, por lo que se piensa que es la responsable de la acumulación de leucocitos de la sangre en el sitio de inflamación por medio de la adhesión de las células a la superficie celular [70-72].

P-Selectina ó LEC-CAM-3.- Está presente en la plaquetas y células endoteliales. Mediante esta MAC se adhieren los fagocitos a las plaquetas activadas y a las células endoteliales. Las selectinas tienen relación con la interacción célula-célula entre leucocitos y células endoteliales. Su rol más importante está en la adhesión inicial, de neutrófilos y monocitos al endotelio activado por citocinas, lo que permite posteriormente la quimiotaxis mediada por Integrinas y la migración transendotelial [73].

Extravasación y migración en tejidos.

La extravasación de leucocitos y posterior migración a través del tejido se asocian a fenómenos de adhesión dinámicos que permiten simultáneamente el movimiento de la célula y su adherencia. No se conoce con precisión el mecanismo de la extravasación y migración de leucocitos, pero las integrinas alfa4/beta1, alfa5/beta1 y LFA 1, así como las moléculas CD44 y CD31 parecen estar involucradas. Se ha propuesto que estas moléculas interaccionan con ligandos localizados en los sitios de unión de las células endoteliales (por ejemplo. moléculas de CD31), así como con proteínas de la

membrana basal y matriz extracelular (por ejemplo: laminina y colágeno), haciendo posible la migración a través del endotelio. A este respecto, resulta fácil comprender que la migración de leucocitos implica que el polo de la célula que avanza establezca nuevos contactos de adhesión, en tanto que el polo opuesto los pierda; lo que no se conoce hasta el momento es cómo el leucocito coordina dichos fenómenos de adhesión y desunión, y qué moléculas exactamente están involucradas. Sin embargo, la capacidad que tienen las integrinas para modificar en forma rápida y reversible su afección, así como su íntima asociación con el citoesqueleto, sugieren que estas moléculas tienen un papel fundamental en la migración de leucocitos a través del endotelio y la matriz extracelular.

#### Modelos de estudio in vitro del endotelio vascular

La gran variedad de funciones que involucran a las células endoteliales en diversos eventos biológicos como lo que se han expuesto anteriormente, obliga a estudiarlas con más detalle por lo que, además de los estudios realizados in vivo, se les ha aislado y cultivado para estudios in vitro, los cuales permiten conocer varias de las funciones difíciles de investigar in vivo. Los cultivos de células endoteliales tiene algunas desventajas, como la incapacidad de mantenerlas en cultivos puros en periodos de tiempo largos, así como la incapacidad para identificar las células cultivadas como

endotelio; por lo que algunos investigadores como Jaffe caracterizaron los cultivos de células endoteliales derivadas de cordones umbilicales humanos, manteniendo vigente hasta el día de hoy el estudio de las células endoteliales (CE) de cordón umbilical in vitro [74]. Así mismo se han estudiado las vellosidades sinoviales, el prepucio, la placenta y el tejido adiposo de la mama y del abdomen. El endotelio del cerdo ha sido utilizado como modelo animal debido a su semejanza con el de humanos. Después de dos décadas de investigación se ha llegado a la conclusión de que el endotelio, lejos de ser un órgano pasivo, tiene funciones vitales que hacen sospechar que esta estructura es la vida y la muerte del organismo animal [75, 76].

#### Modelos de estudio ex vivo e in vivo

Los modelos ex vivo implican el paso intermedio entre los modelos in vitro e in vivo, en ellos el uso de explantes de tejidos, órganos completos de animal u otro organismo funcionan como el contexto biológico de estudio, por lo tanto se deben mantener viables en las condiciones más cercanas a las fisiológicas para que conserven su funcionalidad durante el desarrollo experimental. Las aplicaciones en la investigación científica de estos modelos se dirigen principalmente a la farmacología y toxicología para evaluar el daño al tejido por agente químicos o fármacos. En enfermedades cardiovasculares para estudiar la fisiología de venas y arterias, en enfermedades musculo-esqueléticas y medicina del deporte para evaluar cambios físico-químicos en tejido muscular de animales y en cáncer para estudiar el movimiento y migración de células metastásicas de tumores sólidos [77]. Un ejemplo de la aplicación de los modelos ex vivo es en el estudio del cáncer de mama donde en algunos reportes toman

en cuenta el microambiente del tumor, utilizando explantes en cortes de tejido de tumores o tejido normal, manteniéndolos viables. Este modelo de explantes crecidos ex vivo conservan la heterogeneidad del tumor y la estructura 3D. Sus autores han podido analizar la expresión génica de quimiocinas y probar estrategias de posibles blancos terapéuticos en carcinomas de mama [78-80].

En los modelos in vivo se utilizan comúnmente murinos como ratones, ratas, gerbos, cobayos entre otros para una gran diversidad de estudios en inmunología y otras áreas. En el caso de los dos primeros estos pueden ser modificados genéticamente para silenciar o sobreexpresar citocinas, quimiocinas, receptores de membrana implicados en inflamación. A pesar de ello los animales inmunosuprimidos o inmunocomprometidos se siguen usando a la par o combinados con los modificados para evaluar los aspectos moleculares de la inflamación. En los animales transgénicos o knock out se modifica la expresión génica o se pueden utilizar solo células de estos o líneas celulares modificadas para inocularse en animales y evaluar su efecto, tal es el caso de células tumorales o leucocitos modificados en inflamación asociada a cáncer y otros modelos inflamatorios.

La transfección mediante plásmidos o virus ha permitido tener una gran cantidad de líneas tumorales humanas o murinas para estudios sobre diferentes tipos de tumores. El incremento en la eficiencia de la transfección es esencial para cada tipo celular utilizado en estudios in vivo. Las observaciones se pueden llevar a cabo en cortes de tejido fresco y utilizar microscopía de fluorescencia óptica, confocal o citometría de flujo para el análisis cualitativo o cuantitativo [81, 82]. Sin embargo, a pesar de las

ventajas de los nuevos modelos in vivo con animales modificados, estas herramientas siguen teniendo inconvenientes como el estrés oxidativo de las células transfectadas o inclusive el uso del mismo ratón inmunodeficiente en lugar de tejido normal , o el inconveniente de no saber qué tipo celular responde ante un estímulo específico en comparación a otros como en modelos animales de osteoartritis que afecta a sinoviocitos y condrocitos articulares [83, 84]. Los estudios in vivo aportan, a diferencia de los cultivos celulares, datos moleculares tejido-específicos de la expresión de proteínas; por ejemplo, en la metástasis dirigida a hueso se expresan integrinas  $\beta 3$  en los epitelio pero a cerebro esto no sucede como lo muestran estudios en cáncer de mama [85, 86].

## ANTECEDENTES

El fenómeno de adhesión endotelial inflamatoria se lleva a cabo principalmente en la microvasculatura (precapilares, capilares y venas postcapilares) e involucra la expresión de genes para la activación de células endoteliales las cuales son heterogéneas en su morfología, fisiología y función. Sin embargo, una diferencia entre los genes que se expresan en el estado activado y aquellos que definen el estado diferenciado de las células endoteliales radica en que la expresión de los primeros es un fenómeno transitorio en donde la magnitud y la duración de su expresión es dependiente de señales micro ambientales, como puede ser la presencia de citocinas pro inflamatorias. Estudios previos que incluyen a nuestro grupo de trabajo han evaluado la expresión de moléculas de adhesión endotelial inducida por citocinas recombinantes como TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , interferon- $\gamma$ , entre otras en modelos in vitro de células endoteliales (HUVEC's). La expresión de Selectina-E o VCAM-1 incrementa en tiempo de 2-6 horas de activación junto a una adhesión significativa de células monocíticas de la línea U937 o monocitos de sangre periférica. Adicionalmente algunas isoformas de ICAM-1 pueden ser expresadas de forma diferencial dependiendo del estímulo de activación [87, 88]. Aunque se tienen bien caracterizadas varias de las moléculas que intervienen en la adhesión firme de leucocitos al endotelio vascular (selectinas E y P, VCAM-1, ICAM-1, PCAM-1, etc), los modelos in vitro solo reproducen las condiciones de activación sin un flujo continuo y sobre una monocapa de células. Los modelos en animales utilizan venas o perfunden a través de ellas células leucocitarias o tumorales para estudiar las interacciones in vivo con la presencia de un flujo laminar o turbulento y cambios en las fuerzas de rozamiento o shear stress dentro de la arquitectura irregular de un vaso [89, 90]. Estudios en

modelos in vivo e in vitro sugieren que las fuerzas de rozamiento o el tipo de flujo no solo afectan la morfología del endotelio sino su fenotipo y por lo tanto su comunicación física y química con células circulantes [91]. Por ejemplo en modelos animales in vivo, al disminuir el flujo vascular se favorece el rodamiento y adhesión laxa al sitio de daño o infección, pero también se sabe que cambio en un flujo laminar a turbulento incrementan el tiempo de una célula circulante en la superficie del endotelio y por el contrario, la disminución del diámetro de los vasos incrementa la velocidad de flujo afectando la adhesión antes descrita pero sin conocer muchos de los mecanismos moleculares y de las vías de señalización participantes [92-94].

#### JUSTIFICACIÓN Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La interacción célula-célula es un evento de contacto físico y químico importante en muchos procesos biológicos y su alteración puede favorecer muchas patológicas como es el caso en enfermedades inflamatorias, infecciosas, aterosclerosis, diabetes, entre otras. La caracterización de la comunicación química y las uniones de moléculas de superficie entre leucocitos y células endoteliales de los vasos sanguíneos está muy bien establecida en modelos in vitro, sin embargo in vivo no es muy clara, especialmente la referente a la adhesión leucocitaria al endotelio activado en condiciones de flujo por estímulos inflamatorios; debido a esto los modelos animales son los que mejor han permitido conocer parte de las condiciones fisiológicas de estas interacciones pero no permite saber de los mecanismos moleculares implicados por la complejidad del número de variables presentes.

Los estudios sobre el papel de las fuerzas hemodinámicas como la velocidad de flujo y las fuerzas de rozamiento, así como la estructura anatómica de los vasos han mostrado que estos pueden ser solo algunos de los componentes importantes para el éxito de la adhesión al foco infeccioso o inflamatorio. Los nuevos modelos in vitro consideran ya la presencia de fuerzas hemodinámicas pero no conservan otros componentes celulares como fibroblasto y células musculares y la arquitectura vascular. Es por ello que al desarrollar un modelo ex vivo con venas humanas que permita controlar las condiciones hemodinámicas, la comunicación o interacción de por lo menos dos estirpes celulares, así como los estímulos inflamatorios nos permitirá entender mejor a nivel molecular y morfológico los mecanismos presentes en patologías inflamatorias específicas.

## HIPOTESIS

El endotelio vascular humano de cordón umbilical responde a citocinas inflamatorias como el TNF- $\alpha$  y factores solubles secretados por macrófagos incrementando su capacidad de secreción y expresión de moléculas inflamatorias favoreciendo la adhesión monocítica en presencia de un flujo laminar.

## OBJETIVO GENERAL

Estudiar la activación endotelial basal e inducida de venas humanas en condiciones de flujo en un modelo ex vivo de vena de cordón umbilical

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Diseñar un sistema de perfusión de vena humana que permita mantener la viabilidad e integridad de la vena por lo menos 6 horas, para evaluar la activación endotelial ex vivo inducida por citocinas inflamatorias y factores solubles de macrófagos.
- Evaluar la activación endotelial de la vena de cordón umbilical en condiciones de flujo y sin flujo mediante la determinación de moléculas inflamatorias, así como por su capacidad de adhesión de células monocíticas U937.

## MATERIAL Y MÉTODOS

## Obtención de los cordones umbilicales

Las venas umbilicales se obtuvieron a partir de partos o cesáreas eutócicos sin complicaciones en el hospital de Ginecología y Obstetricia "Dr. Luis Castelazo Ayala-IMSS" en la Ciudad de México. Bajo un protocolo clínico previamente aprobado por el comité de ética del hospital. Una vez recogidas, las venas se seccionaron en fragmentos de 5 cm, con el fin de realizar tratamientos distintos con la misma longitud. Las venas se colocaron en recipientes con PBS suplementado con antibiótico-antimicótico (1.5 %). El tiempo de obtención de la muestra hasta el inicio del experimento nunca superó las 3 h.

## Cultivo de células endoteliales de vena umbilical humana

Las células endoteliales de venas de cordones umbilicales humanas (HUVECs) fueron obtenidas de acuerdo al procedimiento descrito por Jaffe en 1973 [74]. Los cordones umbilicales se lavaron y limpiaron con solución salina fisiológica (SSF) estéril. Después de canular la vena umbilical, el endotelio vascular se sometió a disgregación enzimática agregando 10 ml de colagenasa (tipo 4, Worthington Biochemical Corporation) al 0.02 %, disuelta en solución salina amortiguada con fosfatos (PBS). Las venas umbilicales ya cargadas con colagenasa se incubaron por 15 min a 37 °C. Al terminar esta incubación los cordones se frotaron para despegar las células endoteliales de la lámina basal de la vena, y posteriormente se cortó el

cordón cargado para recolectar las células endoteliales disociadas en un tubo estéril con suero fetal bovino (In vitro, México) [74].

Las células obtenidas por la digestión enzimática se centrifugaron a 1,200 rpm (800 x g), por 5 min en una centrífuga Labofuge 400 Heraeus Instruments, rotor 8179. La pastilla se resuspendió en medio M199 (GIBCO, USA) suplementado con glutamina (GIBCO BRL) al 1%, 0.1 mg/ml de factor de crecimiento endotelial (Biomedical Technologies Inc.), 0.1 mg/ml de heparina (Sigma, USA) y 10% de suero fetal bovino (SFB). Al medio se le adicionó una dilución del 1% de una preparación comercial de estreptomicina y penicilina (GIBCO BRL). Las células se mantuvieron a 37 °C con humedad relativa del 100% y 5% de CO<sub>2</sub>. El primer pasaje se realizó sembrando las células al 80% de confluencia en botellas de cultivo T-125 (Corning, USA). Las células HUVECs fueron incubadas y mantenidas en confluencia hasta antes de ser empleadas para los experimentos. Dependiendo del tipo de experimento, las células endoteliales se despegaron de la caja de cultivo con una solución de tripsina/verseno (GIBCO/BRL) por 2 min y se resembraron en placas de 48 pozos o en placas de 6 pozos a una densidad de 30,000 a 50,000 células por pozo para las cajas de 48 y de 250,000 para las de 6 pozos en medio M-199 suplementado como se mencionó anteriormente. Los experimentos se realizaron 24 ó 48 h después.

Cultivos de células U937

Las células de la línea promielocítica humana U937 se obtuvieron de la ATCC (Manassas, VA, EUA) y fueron mantenidas en medio RPMI-1640 (GIBCO, Rockville MD, USA) suplementado con 10% de SFB (GIBCO, Rockville MD, USA) y una dilución al 1% de una preparación comercial de antibiótico/antimicótico (GIBCO Rockville MD, USA). Las células se mantuvieron a 37 °C con humedad relativa del 100% y 5% de CO<sub>2</sub>. Para prevenir su activación por endotoxinas sólo se empleó material plástico nuevo para el cultivo de estas células.

#### Sistema de perfusión

El sistema de perfusión se diseñó utilizando recipientes de vidrio con doble fondo (Imparlab, Ciudad de México, México), para permitir el flujo de agua (baño de agua, PolyScience, Illinois EUA). Las mangueras de perfusión fueron de 3 mm de diámetro para el medio de perfusión RPMI-1640 y se acoplaron a los reservorios de vidrio. Las condiciones de presión y velocidad de flujo se controlaron mediante una bomba peristáltica (Masterflex 7015-20, Cole-Parmer Chicago, IL, EUA).

#### Determinación de las fuerzas de rozamiento y flujo

Para determinar las fuerzas de rozamiento y el tipo de flujo (laminar o turbulento) dentro de la vena durante los ensayos de adhesión, fue necesario establecer los valores de la viscosidad ( $\mu$ ) y la densidad ( $\rho$ ) de los medios completos en ausencia y presencia de células. Para los ensayos se emplearon 30 ml de RPMI-1640 suplementado, con o sin células U-937 ( $3 \times 10^6$  células/ml). La viscosidad del medio RPMI-1640 completo se determinó usando un reómetro PSV002AB (Brockfield Engineering Laboratories, Inc. EUA), y se analizó la dependencia de la viscosidad en función de la temperatura. La velocidad angular fue 100g a partir de 10 alícuotas tomadas durante 2 min, 20 seg cada uno desde 8-30 °C. Los datos se capturaron usando el programa Rheovision 32v 2.0 y se analizaron con Origen v 7.0. La densidad media del medio RPMI-1640 se determinó pesando 1 ml de medio a 25°C y fue 1,007 g/ml con suero bovino fetal y se utilizaron para obtener el número de Reynolds ( $NR = \rho Dv/\mu$  (Vogel, 1996). El valor obtenido fue de  $NR \leq 2,000$ , lo que indica que la velocidad de flujo dentro de la vena se comporta como un flujo laminar. El flujo usado fue de  $900 \pm 100 \mu\text{l}/\text{min}$ , que es la condición fisiológica en vénulas humanas de diámetro 1 mm. La fuerza de rozamiento se calculó usando la ecuación para flujos newtonianos:  $\tau = 6\mu Q/h^2w = (6\mu/h^2w) Q$  donde  $\tau$  es la fuerza de rozamiento o shear stress (dinas/cm<sup>2</sup>);  $\mu$  el coeficiente de viscosidad del fluido; h la altura de la vena; w el ancho de la vena y Q la velocidad del flujo y se fijaron a  $\tau = 1,8 \pm 0,2$  y  $\tau = 2,2 \pm 0,2$  dinas/cm<sup>2</sup> con la presencia y sin células U937 circulantes respectivamente [95].

Ensayos de histoquímica e inmunofluorescencia

Para observar la anatomía de la vena humana perfundida desde 0 hasta 6 h en condiciones hemodinámicas, se seccionaron venas perfundidas y se fijaron en isopentano (Sigma Aldrich, EUA), para realizar cortes de 7 micras con un criostato (CM-18950 Sistemas de Leica, EUA) y posteriormente se congelaron a -20 °C. Se realizaron tinciones con hematoxilina/eosina (HE) y las muestras se observaron utilizando un microscopio óptico Axioscop40 (Carl Zeiss, Jena, Alemania). Simultáneamente se realizaron tinciones para inmunofluorescencia con anticuerpos específicos afines a los componentes de la estructura vascular, como el factor de Von Willebrand o beta sarcoglicanos, esto se realizó con anti-cuerpos primarios anti-ratón y conejo (Santa Cruz, CA, EUA) diluidos 1:100 y acoplados posteriormente a anticuerpos secundarios Alexa Fluor 647 (Molecular Probes, Oregon, EUA). Las muestras se observaron en un microscopio confocal LSM-510, (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

#### Ensayos de viabilidad, apoptosis y de liberación de Lactato Deshidrogenasa (LDH)

El daño a la membrana y la muerte celular inducida por la perfusión durante los ensayos se determinó por la cantidad de LDH liberada en el medio de perfusión después de una hora de recirculación de células U937 en la vena humana, ya sea pre-activada por 2h con TNF- $\alpha$  a una concentración de 5 ng/ml o sin estímulo. Como control, se comparó el valor obtenido, con el valor de LDH liberada en el medio de cultivos estáticos (sin recirculación) de células endoteliales de cordón umbilical

humano (HUVEC's) en las mismas condiciones. En ambos casos las muestras se centrifugaron durante 5 min a 100 x g y se congelaron a -70 °C hasta su determinación. La actividad de LDH se cuantificó utilizando la metodología descrita por Berry et al. (1991), utilizando NADH (0.24 mM) y piruvato (9.76 mM) como sustratos y la absorbancia a 340 nm se cuantificó cada 15 seg durante 2 min en un espectrómetro DU 640 (Beckman, EUA).

La medición de la viabilidad celular de las venas perfundidas en el sistema de perfusión fue esencial para los ensayos de funcionalidad y activación del endotelio por lo que se midió de forma cualitativa la viabilidad y apoptosis en venas obtenidas (N= 20 en menos de 3 horas antes de colocarse en el sistema de perfusión y en las demás determinaciones por lo que el flujo se mantuvo a 1 ml/min en diferentes tiempos de 0-24 Horas en medio RPMI. Al terminar las venas se lavaron y cortaron horizontalmente como se muestra en la figura 6C y se incubaron con una solución de Azul Trypan al 0.4% por 5 minutos y después se lavaron 3 veces con PBS estéril. Las imágenes se tomaron con un aumento de 200x con un microscopio óptico Axioscop 40 de Zeiss.

El ensayo con Anexina V (Molecular Probes, USA.) se utilizó para evaluar las zonas de células necróticas y apoptóticas en el tejido vascular expuesto al flujo de 1 ml/min y por fuerzas de rozamiento de venas obtenidas el mismo día en menos de 3 horas. Se tomaron imágenes por microscopía de fluorescencia en sistema FLOID CELL ( Life Technologies USA ) a 200x de todas las zonas perfundidas de cada vena en un rango de tiempo de 0.5-24H en cortes transversales frescos.

La determinación de la viabilidad de las células U937 recirculantes y sin flujo en el sistema de perfusión por 2 horas se realizó contando el número de células viables y contrastando las células muertas con el colorante de azul de Trypan. Cada 5 min se tomó una alícuota de un ml para contar las células vivas. Las células vivas y muertas se contaron en una cámara de Neubauer y se reportó el resultado en porcentaje con respecto al 100% de células U937 vivas al tiempo inicial.

#### Medición de la producción de óxido nítrico

Para evaluar la respuesta del endotelio a estímulos fisiológicos en nuestro modelo, se midió la concentración de ON en los medios de perfusión y en el sobrenadante de las células cultivadas. El ON se determinó utilizando un ensayo colorimétrico basado en la reacción de Griess [96]. Se determinó la relación de nitritos/nitratos en el medio de perfusión y se cuantificó como una medida indirecta del óxido nítrico producido en respuesta a la activación de TNF- $\alpha$ . La ecuación de la curva se obtuvo por regresión de mínimos cuadrados y se utilizó para calcular los valores de concentración en las muestras. Una curva estándar se realizó con KNO<sub>3</sub>, y se obtuvo una regresión lineal  $R^2 = 0.997$ .

#### Determinación de citocinas por ensayo de ELISA

Se utilizaron venas estimuladas y no estimuladas con TNF- $\alpha$ , las cuales se perfundieron por 2 h, al terminar se lavó la vena por 10 min y se colocó medio RPMI con y sin células U937 ( $1 \times 10^6$  cel/ml), recirculantes por 1 h, al terminar el tiempo se recolectaron los medios y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. Para la determinación de la concentración de citocinas se utilizó el kit de citocinas humanas ELISA Ultrasensitive 10 panel plex (Invitrogen, EUA), así mismo se realizó una curva estándar para intrapolar los resultados de las muestras, como se recomienda en el kit. La concentración se reportó en pg/ml.

### Ensayos de adhesión

La activación endotelial se determinó después de su activación con TNF- $\alpha$  en condiciones de flujo, determinando la adhesión de células monocíticas U937. La concentración de TNF- $\alpha$  seleccionada para utilizarse en los ensayos ex vivo se obtuvo de experimentos previos en los cuales se realizó una curva de concentración de TNF- $\alpha$ , desde 0.5 a 10 ng/ml, en un ensayo de adhesión in vitro de células U937 a las células HUVEC's. Siendo 5 ng/ml la concentración con la más alta adhesión. Al comenzar los experimentos el sistema se lavó con 2% de detergente biológico Extran

MA durante 10 min, después se lavó con etanol al 70% durante 10 min y, finalmente, el sistema se volvió a lavar con PBS estéril durante 10 min. Al iniciar el ensayo se utilizaron dos segmentos de 5 cm a partir de un solo cordón umbilical, cada uno los cuales fue colocado en los reservorios bajos. Un segmento se activó con 5 ng/ml de TNF- $\alpha$  en medio RPMI. El otro segmento de vena se perfundió con medio sin TNF- $\alpha$ . La velocidad de flujo se estableció a 1 ml/min a 37 °C por 2 h. Al terminar este tiempo se lavaron las venas con PBS durante 10 min. Las células U937 se marcaron con succinilimidil-ester-carboxi-fluoresceína (CFSE). Aproximadamente  $1 \times 10^7$  células U937 se incubaron con 5 mM de CFSE en PBS suplementado con 0.5% de albúmina de suero bovino a 37 °C durante 15 min. Posteriormente, las células se lavaron dos veces con medio RPMI y se centrifugaron durante 5 min a 700 x g. Las células se resuspendieron en medio completo y colocado en el depósito para la perfusión de las venas humanas durante 1 h. Después de la perfusión, las venas se lavaron durante 10 min con PBS y se congelaron en isopentano frío para almacenarse a -70 °C hasta su corte por criostato (CM-18950 Leica Systems, USA) en rebanadas transversales de 7 micras de grosor. La adhesión celular se evaluó al contar el número de células en la superficie endotelial en imágenes de la luz del vaso reportadas por mm<sup>2</sup> en 25 campos independientes. La observación se realizó en un microscopio epifluorescencia LSM-510, (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

Análisis de los datos

Los datos se presentan como medias  $\pm$  SD de cinco experimentos independientes realizados por triplicado. Las pruebas de One-Way ANOVA, seguido por el análisis de varianza de Tukey-Kramer se utilizaron para comparar entre las muestras. Un valor de p menor de 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

### Montaje del sistema de perfusión

El diseño de nuestro sistema se basó en los diseños para estudios de la fisiología hepática y su perfusión, pero fue adaptado al tamaño (de los reservorios) de las venas del cordón umbilical humano y al volumen de medio empleado; el esquema en la figura 4A muestra los componentes mínimos que lo constituyen y el sentido del flujo a partir de una bomba peristáltica. A diferencia de cualquier modelo experimental no comercial

conocido, el nuestro como se indica en la figura 4B está constituido de dos depósitos y no uno, que permiten la perfusión independiente de dos segmentos separados de cordón umbilical. Un controlador de flujo permite controlar el paso del medio que viene de los reservorios altos. Los reservorios bajos conservan a 37°C al cordón y un sistema de venoclisis estéril sirve para la circulación del medio.

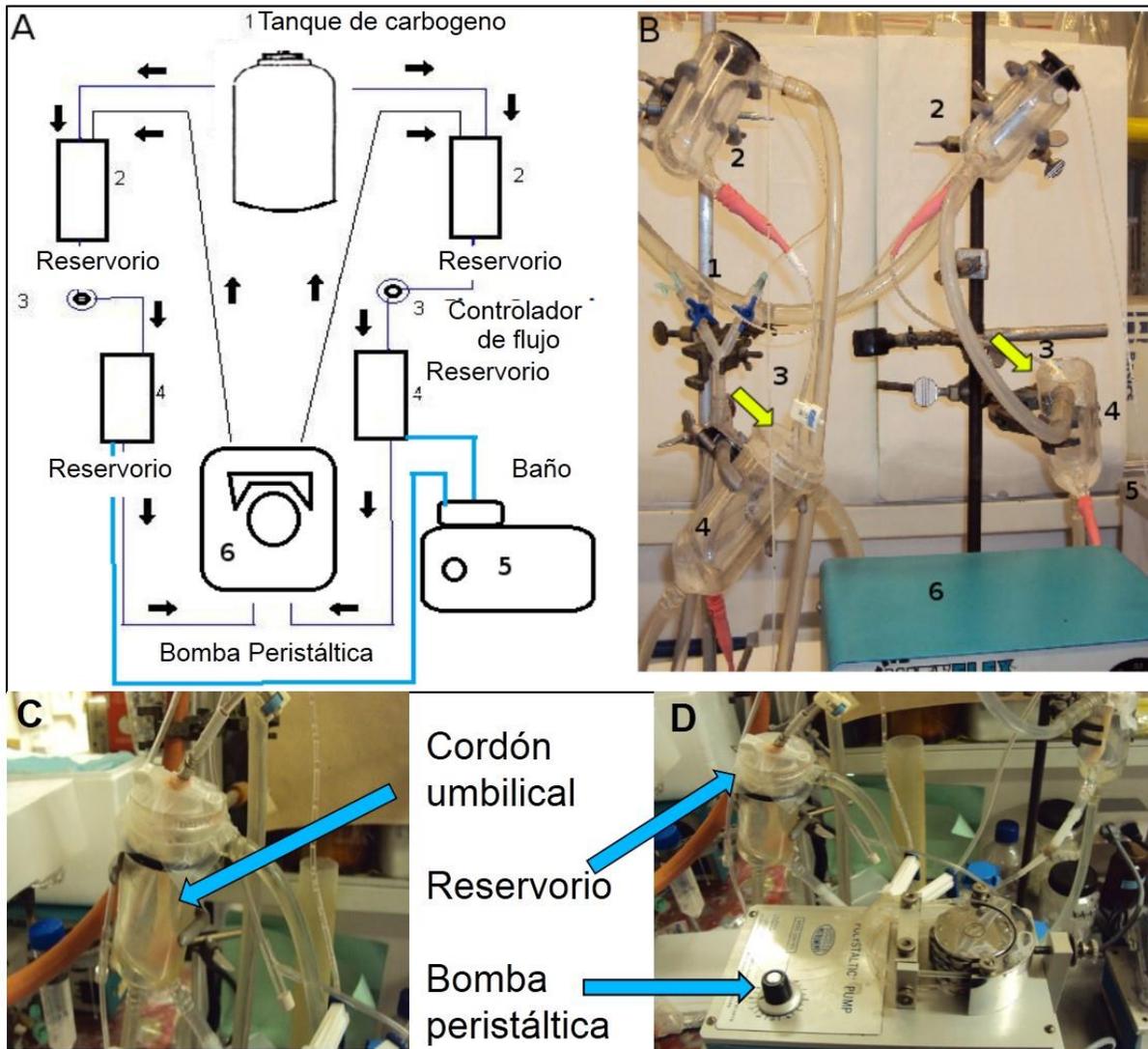


Figura 4.-Sistema de perfusión de venas humanas. A.- Esquema del sistema de perfusión indicando la dirección del flujo a través de sus componentes. B, C y D. Se muestran imágenes de los componentes. Las flechas azules indican el cordón umbilical y la bomba peristáltica. Las flechas amarillas indican los reservorios donde se coloca el cordón umbilical.

### Evaluación de la integridad de la vena umbilical con flujo

La identificación de las estructuras de la vena humana una vez perfundidas en nuestro sistema se evaluó empleando la tinción de Hematoxilina-Eosina (HE) y por inmunofluorescencia. La Figura 5A apoyada de la 5C muestra un corte de vena donde se observan las tres capas consecutivas que constituyen una vena, como son la túnica íntima (TI), la túnica media (TM) y la túnica adventicia (TA). Utilizando la técnica de inmunofluorescencia (IF) se marcó al factor de von Willebrand, específico de células endoteliales (Figura 5B), los núcleos se observan en azul marcados con Hoechst. Estos resultados mostraron que nuestro modelo permite conservar la arquitectura vascular después de la perfusión, lo que es muy importante para los ensayos de adhesión posteriores.

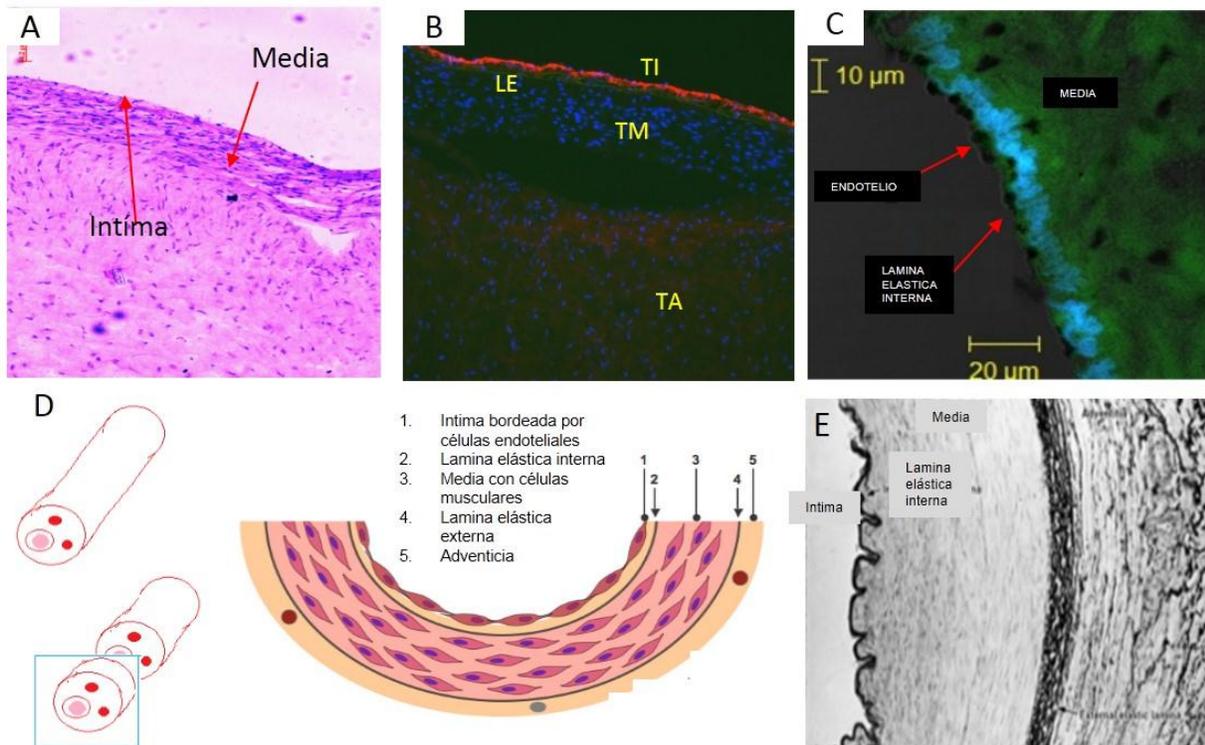


Figura 5. Identificación de componentes de la vena humana. A muestra una imagen de la vena teñida con Hematoxilina-Eosina indicando la túnica íntima y la media. B Muestra un corte transversal de vena humana perfundida teñida con anti-FVW en rojo y los núcleos en azul con Hoeschst. La autofluorescencia de la lámina elástica se observa en verde. C la imagen muestra la sobre posición de la imagen de luz visible y de fluorescencia. La lámina elástica interna se observa en azul. (autofluorescencia) y las células en verde por HE. C y D muestran esquemas de los componentes de la vena en cortes transversales.

Las venas se tiñeron con HE como se describe en material y métodos, para marcar los componentes de las venas perfundidas. TA: túnica adventicia, TM: Túnica media, E: endotelio, TI: Túnica íntima. Se empleó una tinción por IF para el factor de von Willebrand para marcar el endotelio. Los núcleos se marcaron con Hoechst (azul), y las células del músculo liso de la vena se visualizaron con el marcaje de beta sarcoglicanos (rojo). La flecha azul en el esquema indica la zona marcada en cada figura.

Viabilidad, Apoptosis e integridad celular del endotelio vascular y de células U937 circulantes.

La conservación del tejido vascular por las condiciones de perfusión empleadas, debe ir a la par de mantener la integridad celular y su viabilidad durante los ensayos de activación endotelial, por lo que se evaluó el daño celular por efecto del flujo y la activación con TNF- $\alpha$ , en venas perfundidas, activadas o no con TNF- $\alpha$ . Esto se realizó mediante la observación de las células apoptóticas y muertas por un kit de

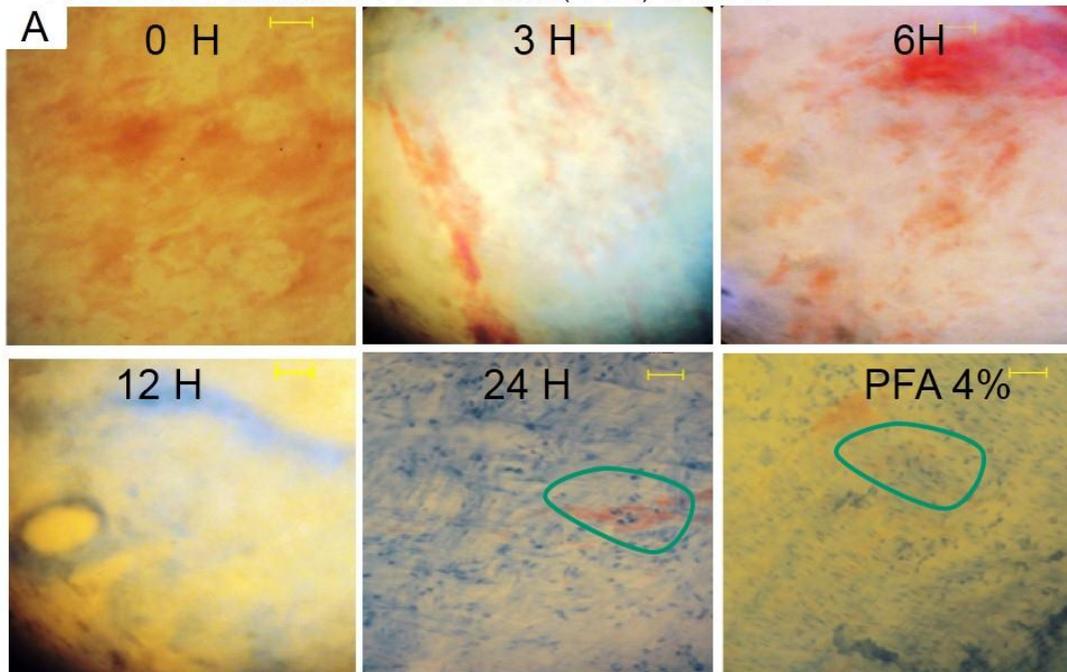
anexina V y por azul de Trypan en diferentes áreas de la vena perfundida de forma cualitativa y como un tercer criterio del daño a las células endoteliales se midió la liberación de Lactato deshidrogenasa (LDH) en el medio de perfusión.

Los resultados del ensayo con azul de Trypan en venas humanas muestran claramente la ausencia de células muertas en el tejido antes de las 6H de perfusión y la presencia de células muertas con coloración azul después este tiempo de perfusión con medio o con TNF- $\alpha$ . Como se observa en la Figura 6A a las 24 horas se observan células bien definidas en azul indicando una zona de células no viables (circulo azul) y de manera similar se observan células muertas en el control de muerte con células fijadas con PFA al 4%.

Los resultados del ensayo de Anexina/Ioduro de propidio mostraron que en un rango de 0.5-24 horas las venas no mostraron células apoptóticas ni necróticas antes de las 6 horas sin embargo después de este tiempo empieza ser frecuente su presencia y abundancia en algunas zonas del tejido, especialmente en zonas cercanas a los extremos del cordón y son muy frecuentes y abundantes de las 12 horas en adelante, estas zonas se muestran en la Figura 6B encerradas en círculos amarillos. En conjunto estos resultados indican que en la mayor parte del cordón umbilical perfundido con y sin TNF en presencia y ausencia de flujo la mayoría de las células se mantienen viables en un lapso de 0-6H ya que a partir de ese tiempo comienza el incremento de zonas necróticas en los extremos de la vena y se vuelven abundantes después de las 24 horas. Por lo tanto los ensayos de activación y adhesión que implican tiempos de 2 y

3 horas más el tiempo de los lavados puede llevar hasta 4 horas por lo que la mayoría de las células de las venas parecen mantenerse viables en este tiempo.

ENSAYO DE VIABILIDAD ENDOTELIAL (AZUL) TRYPAN



ENSAYO DE APOPTOSIS Y NECROSIS ANEXINA

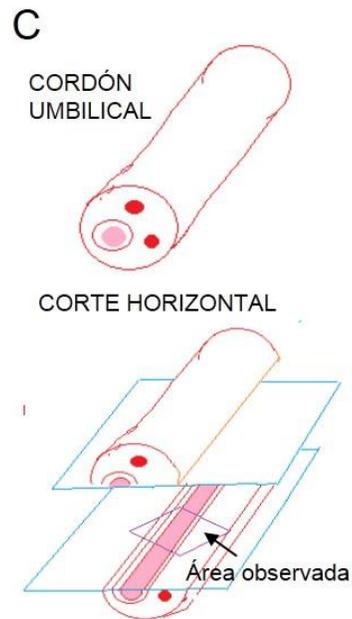
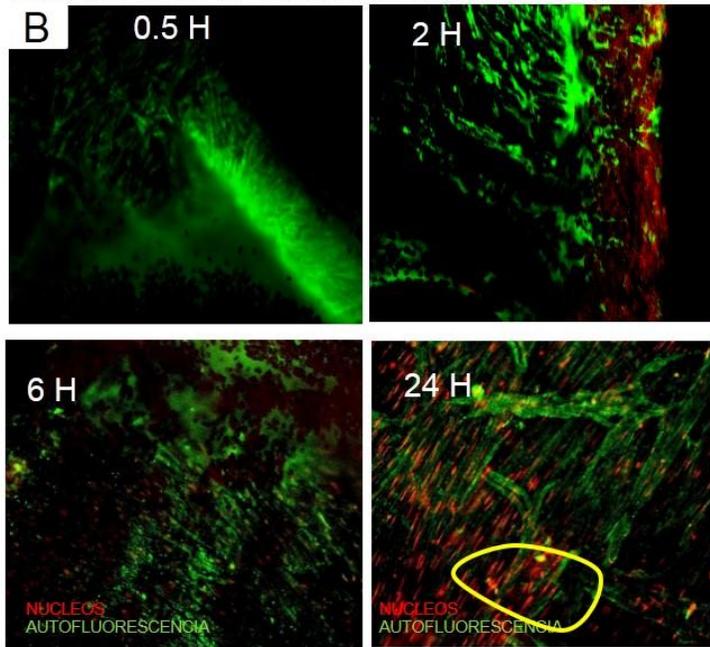


Figura 6.- Viabilidad e integridad del endotelio vascular. A representa una serie de imágenes de venas cortadas horizontalmente con marcaje del azul de trypan con células muertas teñidas de azul de 0 H-24 H y un control con PFA. B se muestra una serie de imágenes de 0.5.H-24H de la vena perfundida y teñida con un kit de apoptosis con anexina (células verdes) y yoduro de propidio (células rojas). El área del círculo amarillo o azul muestra la presencia de células muertas en A y B.

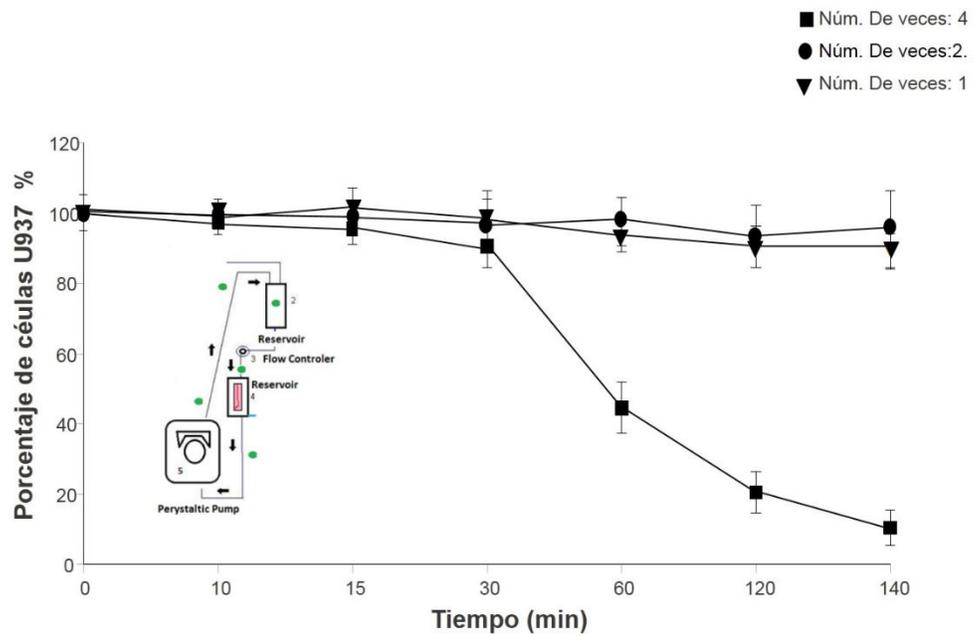
Los resultados del análisis de la liberación de LDH en el medio de perfusión presentados en la Tabla 1, indican que solamente un 15% de LDH fue liberada por las venas perfundidas cuando no están activadas, este valor fue semejante al obtenido para los cultivos de células HUVEC's sin presencia del flujo. Sin embargo, dichos valores fueron mayores a los obtenidos por las venas activadas con TNF- $\alpha$  y a las células activadas *in vitro*. Estos datos muestran que la perfusión a 1 ml/min no afecta la integridad de la membrana del endotelio vascular, mientras que el endotelio activado resiste mejor las condiciones en el sistema de perfusión.

Tabla 2.- Análisis de LDH en el medio de venas perfundidas con y sin TNF- $\alpha$  y con y sin células U937 por 2 horas. Se muestra la desviación estándar ( $\pm$ ). Los asteriscos (\*) indican las diferencias significativas con respecto a su control sin TNF- $\alpha$ , y el doble asterisco con respecto a las células *in vitro* (Anova  $p < 0.05$ ).

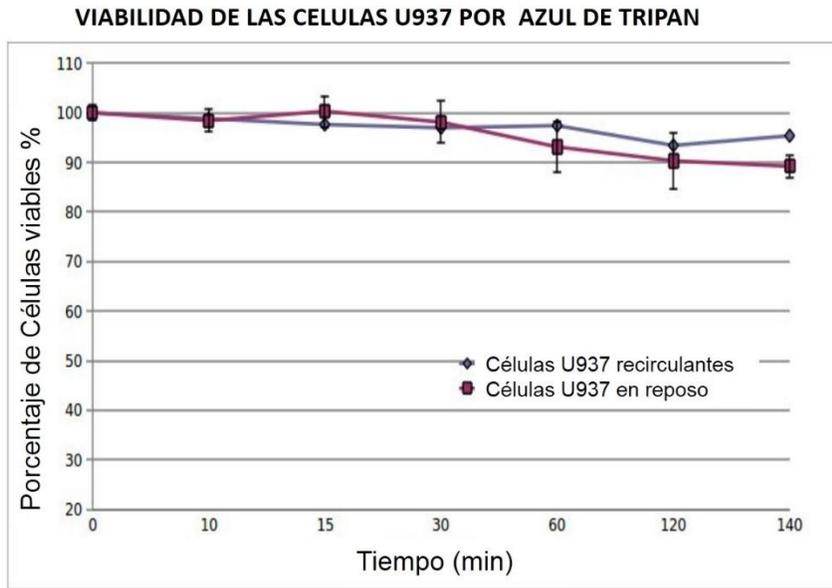
	In vitro	Ex vivo
Sin TNF- $\alpha$	15.4 $\pm$ 0.1	14.7 $\pm$ 6.1
TNF- $\alpha$	3.3 $\pm$ 0.1 *	5.87 $\pm$ 0.9 *
Sin TNF- $\alpha$ + U937	11.4 $\pm$ 3.3	38.2 $\pm$ 2.4* *
TNF- $\alpha$ + U937	11.2 $\pm$ 2.1	38.1 $\pm$ 2.2 * *

En los experimentos donde se recircularon las células U937 a las venas perfundidas o a los cultivos HUVEC's sin activar (para el ensayo de adhesión 2 Horas), se incrementó el nivel LDH en el medio aumentando a 38.2% y 11.4 % respectivamente en presencia de células U937 en comparación a donde están ausentes independientemente si estuvieran activadas las venas o los cultivos *in vitro* (Ver tabla 1). El aumento en la liberación de LDH en los medios de recirculación de células U937 se puede interpretar como el daño de estas células por la perfusión completa en el sistema y no por el daño al endotelio en ambos modelos. En consecuencia a la par de evaluar la viabilidad del tejido vascular por el método de Azul de Trypan, Se midió la viabilidad de las células circulantes en el sistema de perfusión sin venas presentes.

Se evaluó la viabilidad en base al número de veces que recirculaban en el sistema las células y posteriormente se contaron las células viables en los tiempos de los ensayos de 2 y 3 horas. Los resultados se muestra en la Gráfica 1 donde se observa la comparación del porcentaje de número de células al final de cada ensayo y de 1 a 4 vueltas completas en el sistema, mientras que la gráfica 2 muestra que al mantenerse en 2 vueltas únicamente, las células se mantienen arriba del 90% de viabilidad como se observa en ausencia de flujo.



Gráfica 1.- Se muestra la relación del porcentaje de células verdes U937 teñidas con CFSE con respecto al tiempo, después de la recirculación completa (1, 2 y 4 veces) en el sistema de perfusión por dos horas. Se muestra los promedios con las barras de la desviación estándar de 5 experimentos independientes por triplicado cada uno de ellos

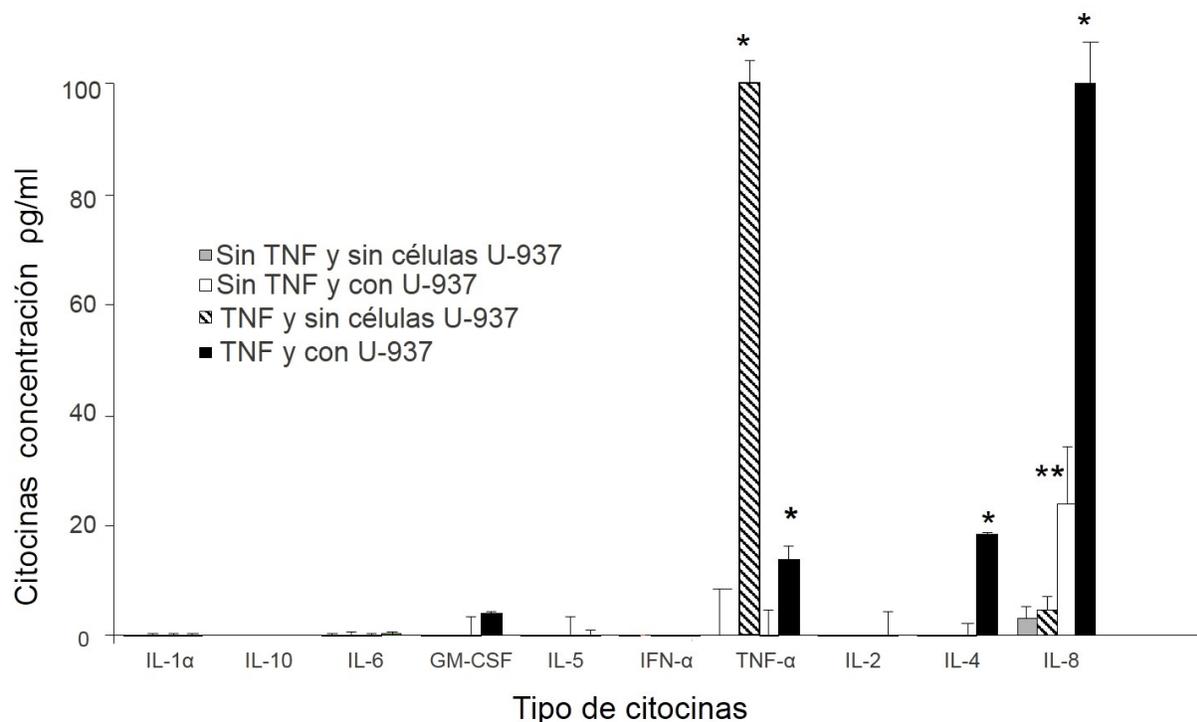


Gráfica 2.- Análisis de la viabilidad por azul de trypan de las células u937 circulantes en el sistema de perfusión por dos horas. Se muestran los promedios de 5 experimentos independientes por triplicado cada uno de ellos con las barras de la desviación estándar.

Determinación indirecta de la producción de óxido nítrico por la reacción de Griess y el análisis de citocinas inflamatorias por ELISA

Para verificar si el endotelio vascular era capaz de responder a los estímulos inflamatorios, se cuantificó la producción de ON y de citocinas inflamatorias. La curva estandar para la cuantificación de nitritos presentó un rango lineal entre 5 y 50  $\mu\text{M}$  de  $\text{KNO}_3$ , con un coeficiente de regresión lineal  $r^2 = 0.997$ . El índice de la concentración basal de nitritos en el medio de la vena perfundida fue  $23.24 \text{ mm} \pm 6.7$ . El medio de perfusión de las venas tratadas con 5 ng/ml de  $\text{TNF-}\alpha$  mostraron un aumento significativo del 50 % ( $p < 0.05$ ) ya que fue de  $39.27 \pm 4.1$ . Así mismo, se cuantificó la producción de citocinas inflamatorias en condiciones de flujo de las venas humanas

con y sin TNF- $\alpha$ , y en presencia o ausencia de células U937 por 2 h de activación y una hora de circulación de células U937. El análisis de citocinas se realizó por un kit multiplex de ELISA en el medio de perfusión de venas activadas. Los resultados mostraron un aumento significativo en pg/ml en la producción de TNF- $\alpha$ , así como IL-4, GM-CSF, IL 6 e IL -8 con respecto a las venas sin TNF- $\alpha$  en condiciones de flujo (Figura 7). Los medios de las venas estimuladas con TNF- $\alpha$  sin células circulantes liberaron IL-8 y TNF- $\alpha$  después de 2 h de activación y 1 h adicional en comparación con las venas sin la citocina circulante.



Gráfica 3.- Determinación de citocinas inflamatorias. Se muestra la concentración con respecto al tipo de citocina en presencia de flujo con y sin TNF- $\alpha$  por dos horas y con o sin células U937 por 1 hora. Los asteriscos \* indican la significancia con respecto a la presencia de esa citocina en venas no estimuladas y sin células circulantes. El doble asterisco \*\* indica la significancia de la vena no activada con células con respecto a la no activada y sin

células U937. Se muestran los resultados de 3 experimentos independientes por triplicado cada uno de ellos ( $p \leq 0.05$ )

## Ensayo de adhesión celular

Se realizaron ensayos de adhesión *in vitro* con la finalidad de estandarizar el conteo de células marcadas con CFSE en lugar de timidina tritiada ( $H^3$ ) como se hace regularmente en ensayos de adhesión de células U937 a HUVEC's, por lo que se realizaron curvas de concentraciones del colorante para homogenizar el marcaje, y posteriormente ensayos de adhesión con diferentes concentraciones de TNF- $\alpha$  para activar el endotelio. Finalmente se realizó un último ensayo para elegir el mínimo tiempo de activación endotelial y de circulación de células U937 para evitar tener mucho tiempo el cordón en el sistema de perfusión y evitar su contaminación por microorganismos. Se eligió el tiempo de 2 horas de activación y 1 hora de adhesión para el ensayo *ex vivo*. La adhesión se cuantificó evaluando el número de células U937 sobre la superficie endotelial en la luz del vaso de cortes horizontales y transversales de venas tratadas y no tratadas con 5 ng/ml de TNF- $\alpha$  (Figura 8). Las imágenes mostradas en la figura representan los ensayos *in vitro* y las imágenes tomadas por microscopía de fluorescencia y confocal para contar las células que permanecen después de los lavados al terminar el ensayo. Los resultados mostraron un aumento significativo de 7.1 veces más células U937 adheridas a las venas perfundidas activadas con TNF- $\alpha$  ( $175.71 \pm 12.3$  cel/mm<sup>2</sup>) en comparación con las venas no activadas ( $15 \pm 6.9$  cel/mm<sup>2</sup>). Los resultados *ex vivo* muestran un menor número de células que en los ensayos *in vitro* debido a la presencia del flujo. Las células contadas

si bien parecen estar adheridas después de ser lavadas con PBS por 10 min (ver figura 8I), no podemos asegurar que el 100% de las células monocíticas están adheridas, ya que la morfología y arquitectura de la vena del cordón puede contribuir a mantenerlas dentro de la vena.

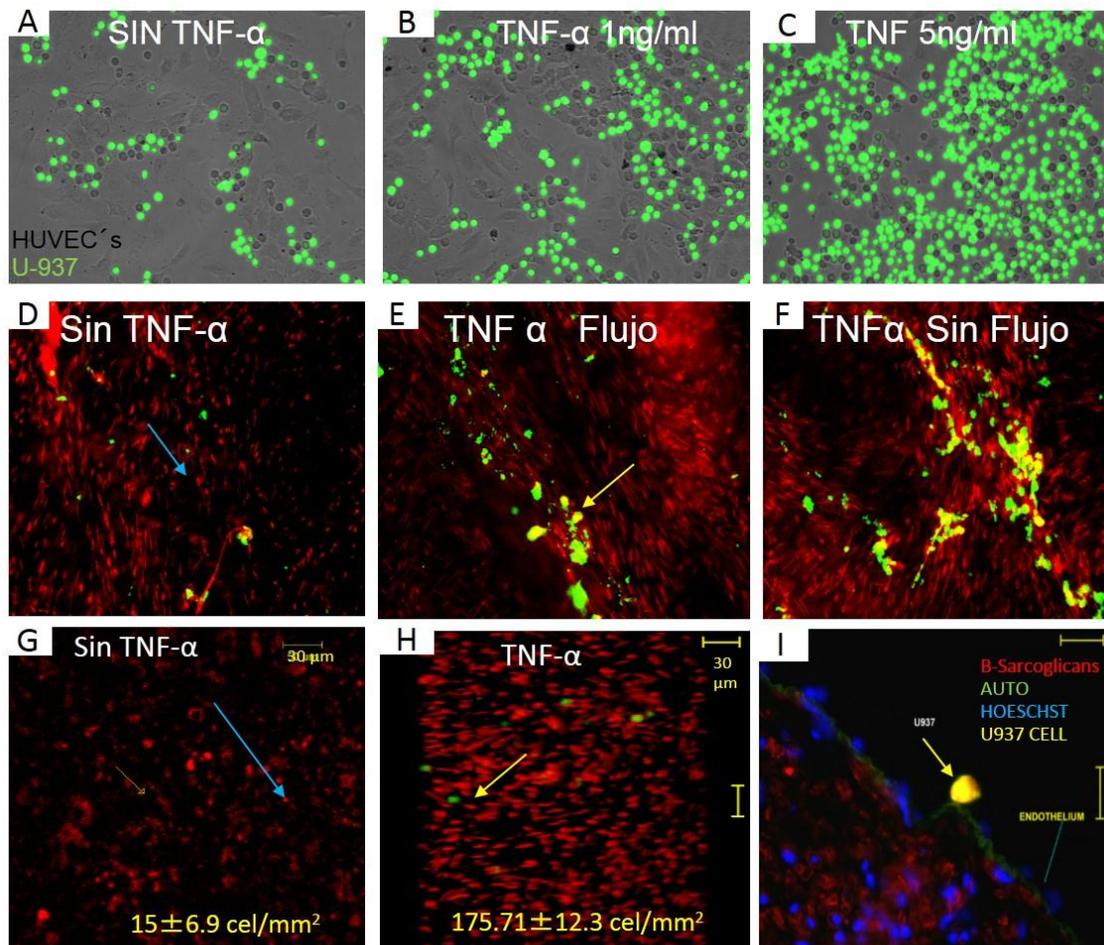


Figura 8.- Ensayos de adhesión de células U937 al endotelio vascular *in vitro* y *ex vivo*. A-C imágenes de fluorescencia y luz visible sobrelapadas para mostrar el incremento de U937 marcadas con CFSE (verdes) en

presencia o ausencia de TNF- $\alpha$  sobre células HUVEC's. D-F imágenes de fluorescencia de cortes longitudinales de venas perfundidas con y sin flujo y con y sin TNF- $\alpha$  más U937 sobre el endotelio vascular (núcleos rojos teñidos con Ioduro de propidio). G-H imágenes de reconstrucción 3D por microscopía confocal para mostrar la adhesión de U937 verdes en el endotelio (núcleos en rojo). I La imagen de fluorescencia muestra la adhesión sobre la superficie endotelial de una célula U937 teñida con CFSE. Las flechas indican a las células U937 en verde o amarillo y a al endotelio en rojo. Los datos muestran el número de células +/- SD de 5 experimentos independientes.  $p < 0,05$ .

La activación endotelial ex vivo por TNF- $\alpha$  debe estar dirigida por diferentes moléculas de adhesión como Selectina E, P, VCAM-1, ICAM-1, PCAM-1 y sus contra receptores en leucocitos, como se ha demostrado in vitro en distintos modelos inflamatorios. Ensayos de activación in vitro y ex vivo se realizaron en tiempos cortos para evaluar la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio. Las venas activadas y no activadas con TNF- $\alpha$  durante 0.5, 1, 2 y 2.5 h se fijaron y se tiñeron por inmunofluorescencia para evaluar la expresión de Selectina E, RAGE, VCAM-1 e ICAM-1. Los resultados completos solo para ICAM-1 se presentan en la Figura 9. Los cambios son visibles en presencia de ICAM-1 hasta las 2 h en el endotelio activado con respecto a las venas perfundidas sin la citocina. Las moléculas Selectina E y RAGE se midieron sin encontrar cambios en estos tiempos con respecto al basal, pero por western blot a 3 horas se observa un incremento en Selectina E y en ICAM-1 (Datos preliminares no mostrados).

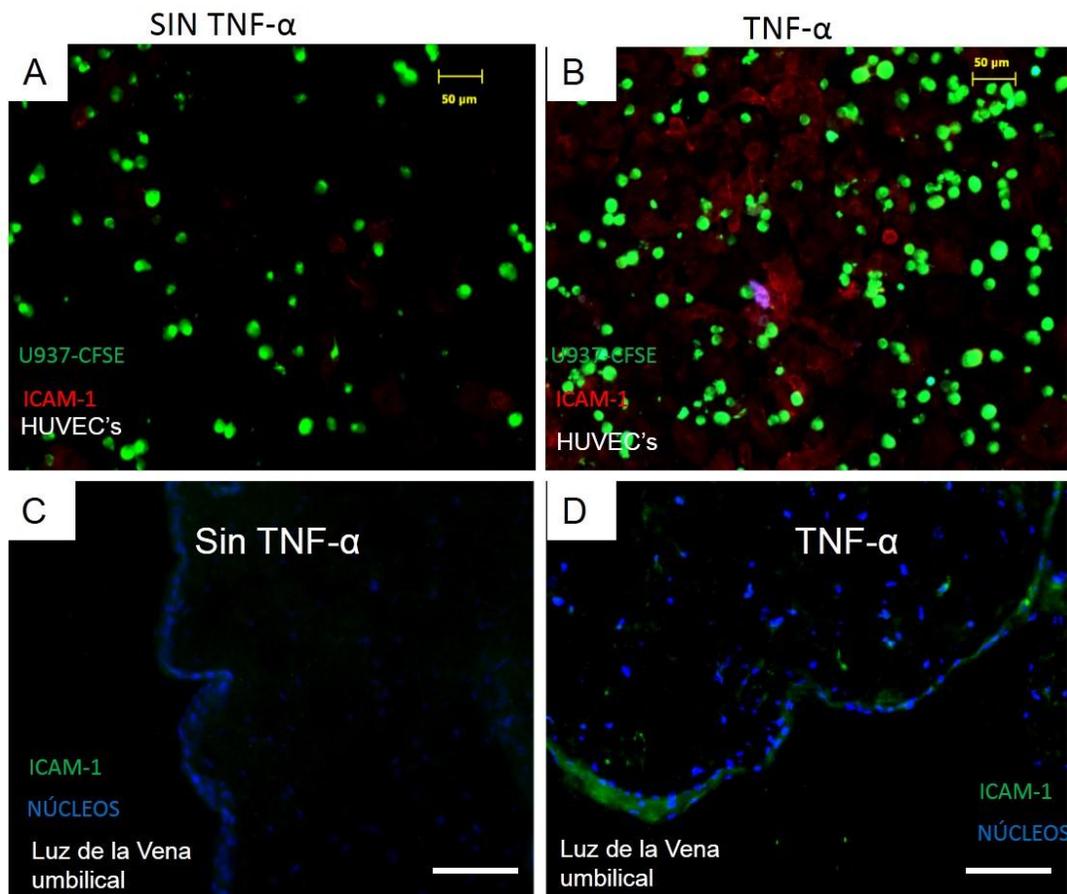


Figura 9.- Ensayo de inmuno-fluorescencia para evaluar la presencia de ICAM-1. A-B imágenes de la adhesión de células U937 con CFSE a células HUVEC's después de dos horas de activación con y sin TNF- $\alpha$  y 1 H e incubadas con anti-ICAM-1 y anticuerpo secundario con Alexa 647 (rojo). C y D imágenes de cortes transversales de venas profundidas con y sin TNF- $\alpha$  marcadas con anti-ICAM-1 y anticuerpo secundario con Alexa 488 (verde). La barra indica la distancia en micrómetros = 100  $\mu$ m.

## DISCUSION

En este trabajo se desarrolló un modelo *ex vivo* de vena de cordón umbilical humano mantenidas viables en condiciones de flujo laminar con la finalidad de estudiar las interacciones célula-célula entre leucocitos y el endotelio vascular en un proceso inflamatorio. El estudio de las interacciones celulares ha sido ampliamente estudiado en modelo *in vitro* sin flujo [97-100], en los últimos 20 años los modelos de inflamación *in vitro* han permitido conocer muchas de las moléculas involucradas en estas interacciones, mientras que los modelos *in vivo* y recientemente *ex vivo*, han permitido conocer la fisiología de los tejidos involucrados y la arquitectura del microambiente inflamatorio [101-103].

Los sistemas *in vivo* y *ex vivo* aportan actualmente un contexto más cercano a las condiciones fisiológicas y patológicas del proceso inflamatorio, ya que comienzan a considerar la presencia de las fuerzas hemodinámicas [104-106]. Las fuerzas de rozamiento, el flujo laminar, turbulento y oscilatorio pueden modificar el fenotipo endotelial favoreciendo o inhibiendo la expresión de moléculas inflamatorias [107-110]. La interacción entre distintos tipos celulares del microambiente también es importante para conocer la activación de células leucocitarias, de células endoteliales, epiteliales, fibroblastos, entre otros que juegan un papel específico dependiendo de la zona de inflamación y de los estímulos inflamatorios.

El diseño de un sistema *ex vivo* de vena humana en condiciones de flujo debe permitir controlar la velocidad de flujo y fuerzas de rozamiento en un medio que mantenga viable la vena a la temperatura fisiológica. La utilización de venas de aorta bovina, caninas o humanas han servido para estudios de aterosclerosis humana, sin embargo estas venas no tienen el tamaño de vénulas más pequeñas que son las que tiene contacto con muchos tipos de leucocitos para adherirse y llevar a cabo la extravasación al sitio de daño. La vena umbilical humana ha sido utilizada para la obtención de cultivos primarios de células endoteliales (HUVEC's) durante mucho tiempo [111, 112]. Los estudios en estas células han aportado conocimiento sobre la función del endotelio vascular, ya que conservan el fenotipo de venas más pequeñas y responden a diferentes estímulos angiogénicos, inflamatorios, etc [113, 114].

Nuestro grupo de trabajo ha trabajado ampliamente con HUVEC's para estudiar la activación y adhesión por citocinas inflamatorias, factores solubles de macrófagos y de células tumorales. Estos estudios muestran fenotipos específicos de las células endoteliales dependiendo del tipo de activación, con incrementos en la expresión de moléculas de adhesión como Selectina E, VCAM-1, ICAM-1 e integrinas en tiempos de 2-12 horas [87, 115]. La activación de estas células ha permitido evaluar cambios significativos en la actividad del factor de transcripción NFκB a través de la vía clásica del dímero P65/P50 [116]. Una pregunta elemental en estos estudios ha sido; si estos eventos reflejan lo que sucede en la activación *in vivo* por factores circulantes sobre el endotelio vascular en el microambiente inflamatorio. Las preguntas siguientes son ¿Las mismas moléculas intervienen para mantener la adhesión leucocitaria y en el

mismo lapso de tiempo ? o bajo diferentes tipos de flujo ¿ Cómo se adhieren las células leucocitaria al endotelio, cambian su morfología ¿y con la presencia de la matriz extracelular y fuerzas de rozamiento cambia su fenotipo ?

#### Sistema de perfusión de venas humanas umbilicales

El sistema de perfusión de cordón umbilical utilizado en este proyecto es semejante a otros desarrollados anteriormente para obtener células de órganos o fijarlos con formalina. El funcionamiento del sistema es similar al de perfusión de órganos animales para estudios fisiológicos de las venas grandes o arterias que utilizan componentes comunes, como son las mangueras de perfusión de sangre o medio con reguladores de flujo, la bomba peristáltica y los medios de perfusión. Los reservorios fueron diseñados para un uso exclusivo en cordones umbilicales, pero podrían modificarse para otro tipo de venas u órganos [117, 118].

Nuestro sistema a diferencia de otros modelos permitió perfundir dos cordones de forma independiente al mismo tiempo. El sistema esta acoplado a una bomba peristáltica que puede desacoplarse para trabajar sin flujo o colocarse otro tipo de bomba solo cambiando los conectores a la misma. Los reservorios pueden cerrarse para evitar perdida de calor y entrada de microorganismos y permiten la entrada de la inyección de una mezcla de oxígeno y bióxido de carbono para controlar la contaminación del medio y el cambio en el pH del medio.

El sistema desarrollado permite fijar diferentes variables como la velocidad de flujo, la temperatura, la viscosidad del medio, las fuerzas de rozamiento, el tiempo de perfusión, el tipo y volumen de medio, así como el tipo de moléculas perfundidas y el tamaño de la vena umbilical.

#### Viabilidad e integridad del endotelio

Nuestros resultados muestran que el porcentaje de viabilidad de la vena umbilical se mantuvo dentro de los rangos reportados en otros modelos de perfusión donde emplean venas safenosas y de aorta bovinas y caninas [104, 105, 119], en los cuales han reportado que se preserva la viabilidad celular desde 1 h hasta cinco días, manteniendo la funcionalidad del endotelio. Para el propósito de este trabajo solo fue necesario mantener la viabilidad e integridad del tejido por un lapso de tiempo no mayor a 5 h, sin embargo el modelo permite aumentar el tiempo para realizar otro tipo de ensayos. Para ello, solo habría que cerrar herméticamente los reservorios, evitando así, una posible contaminación del medio de perfusión por microorganismos.

Las células endoteliales de la zona perfundida de la vena se mantuvieron viables e integras hasta las 6 horas de perfusión con y sin TNF- $\alpha$ . Se identificaron algunas zonas de células necróticas en los extremos del cordón perfundido después de las 6 horas que aumentan después de las 12 horas de perfusión. En el caso de las células U937 perfundidas para los ensayos de adhesión se mantuvieron viables en condiciones de flujo si solo se perfunden menos de 3 veces por el sistema completo. Es decir el paso

de cada célula 3 veces por la vena. En contraste sin flujo las células se mantuvieron 100% viables durante los tiempos de los ensayos.

#### Funcionalidad de la vena umbilical

En las condiciones de flujo laminar de 1ml/min y de fuerzas de rozamiento de 2 dinas/cm<sup>2</sup> el endotelio vascular no induce la producción de óxido nítrico a menos que haya cambios en cualquiera de los dos parámetros que lleven a flujos turbulento o bajas velocidades de flujo [120, 121]. El cordón perfundido con TNF- $\alpha$  por dos horas incremento la presencia en el medio de óxido nítrico de forma significativa siendo un indicador de que el endotelio en condiciones de flujo responde a la presencia de TNF- $\alpha$  más que al flujo o variaciones en el mismo [122]. La liberación de óxido nítrico por citocinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  IL-1 $\beta$  favorece la vasodilatación de la vena permitiendo la adhesión de macrófagos y polimorfonucleares *in vitro* y en modelos animales [123]. Sin embargo mantener el flujo laminar en todo el cordón puede favorecer que la célula no incremente su capacidad adhesiva sin la célula no tiene un contacto directo con la citocina por la presencia del mismo en el lapso de tiempo de activación de 2 horas por lo que posteriormente medimos la producción de citocinas para saber si el endotelio se activa por TNF $\alpha$  incrementando la liberación de factores inflamatorios.

La presencia de TNF- $\alpha$  circulante en la vena endotelial por dos horas incremento la presencia en el medio de perfusión de citocinas como el propio TNF- $\alpha$  y quimiocinas como IL8 las cuales favorecen el reclutamiento de leucocitos *in vivo*. Los medios de

macrófagos activados liberan citocinas como TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL6 e IL8 que favorecen la adhesividad de leucocitos al endotelio *in vitro*, así como la translocación de la subunidad p65 del factor NF $\kappa$ B [124, 125]. En ausencia de células U937 el medio de venas activadas expresó principalmente niveles altos de TNF- $\alpha$  pero bajos de IL8. Se sabe que el TNF- $\alpha$  incrementa la expresión de su propio gen vía NF $\kappa$ B en cuestión de horas y de quimiocinas entre ellas IL8. La presencia de células U937 durante una hora de circulación en las venas activadas mostro niveles menores de TNF- $\alpha$  a las 3 horas de la medición, y mayores de IL8, este incremento puede ocasionarse debido a que al tener contacto físico ambas células se mantiene la producción de IL8 por el endotelio activado, incrementando también su producción por linfocitos y macrófagos activados en circulación y adheridos [126, 127]. Esta quimiocina se expresa por monocitos y linfocitos en tiempos cortos de minutos a horas favoreciendo junto a otras quimiocinas como MIP1- $\alpha$  y  $\beta$  el reclutamiento de más leucocitos al sitio de inflamación [128]. Se sabe que a bajas velocidades de flujo con fuerzas de rozamiento menores a 3 dinas/cm<sup>2</sup>, puede haber producción de IL8 que incrementa con forme pasa el tiempo hasta 8 h en modelos *in vitro*. En las venas activadas con células U937 circulantes se incrementó también la IL-4, Esta citocina puede producirla el endotelio o macrófagos y polimorfonucleares y en estudios *in vitro* favorece la transmigración de eosinofilos incrementando la expresión de moléculas de adhesión como P-selectina, VCAM-1 e ICAM-1 aun en condiciones de fuerzas de rozamiento [129-131]. Finalmente un incremento significativo con respecto al control sin TNF- $\alpha$  de GM-CSF en el medio de las células activadas se observó a la hora de perfusión con U937, sin embargo estas concentraciones no se han asociado a una activación de células endoteliales o de

polimorfonucleares, sin embargo concentraciones más altas (5 ng/ml) pueden favorecer la adhesión al endotelio de eosinófilos en condiciones de flujo con un incremento en la expresión de VCAM-1 [132-134].

#### ADHESION AL ENDOTELIO VASCULAR EX VIVO

La interacción leucocito/endotelio en condiciones de flujo y fuerzas de rozamiento ha sido caracterizada en diferentes tipos celulares sobre el endotelio, por ejemplo monocitos, eosinófilos, neutrófilos, basófilos, linfocitos T o B, células dendríticas, macrófagos locales y sobre células endoteliales de venas, arterias, de microvasculatura, epiteliales, fibroblastos o sobre matrices artificiales [135-137]. Así mismo para cada modelo se utilizan condiciones con bajo flujo o muy alto, es decir menos de 2 dinas/cm<sup>2</sup> o mayores hasta 20 dinas/cm<sup>2</sup>, dependiendo si son en venas o arterias las condiciones del microambiente inflamatorio. La adhesión leucocitaria al endotelio se ha medido en condiciones de flujo, estáticas (sin flujo) o con variaciones del mismo a lo largo del tiempo dependiendo del contexto fisiológico o patológico. Las herramientas empleadas para medir el número de células adheridas, se dirigen principalmente a la microscopía óptica, de fluorescencia, confocal y electrónica.

En nuestro sistema se cuantificó la presencia de células U937 dentro de la vena humana en condiciones de flujo y con TNF- $\alpha$  a las 2 horas, las herramientas empleadas fueron la microscopía confocal utilizando células marcadas con colorantes vitales. Se realizaron experimentos *in vitro* para elegir la cantidad de células U937 a

utilizar y los tiempos y concentraciones de TNF- $\alpha$  para la activación. A diferencia de los ensayos estáticos la adhesión fue menor en los ensayos *ex vivo* con perfusión, pero permitió un fácil conteo por área a lo largo de toda la vena perfundida en cortes horizontales y transversales. La activación a las 2 horas con una hora más de perfusión de células U937 se leigio en base a que después de 5 horas de perfusión (contando los tiempos de lavados de la vena) se contaminaba el emdío con bacterias (datos no mostrados). Al disminuir el tiempo de activación de 3 a 2 horas y de 3 a 1 de circulación de U937 se mantuvo una adhesión significativa donde no influyera la activación por contaminación por la exposición de la vena y el medio al ambiente durante el tiempo del ensayo. Este control mejoro al colocar una tapa al reservorio y cubrirlo para mantenerlo lo más aislado posible, pero no se completaron los demás ensayos en estos tiempos. Experimentos previos con un mayor número de células perfundidas en el cordón y evaluadas por microscopía electrónica mostraron un mayor número de células U937 sobre la superficie endotelial en comparación a los resultados aquí mostrados sin embargo al disminuir el número de células y el uso de la microscopía electrónica, se permitió mayor viabilidad, manejo, fácil conteo del número de células U937 y el costo del uso de este tipo de microscopio. La adhesión *ex vivo* por tanto debe ser monitoreada en tiempo más largos para observar cambios en la adhesión y poder evaluar diferentes tipos de moléculas que puedan estar involucradas en esta adhesión *ex vivo* inducidas por las diferentes citocinas presentes en el medio de perfusión. En trabajos previos de nuestro grupo la adhesión *in vitro* a las 3 horas de activación y de por lo menos 2 horas de presencia estática de monocitos incrementa la adhesión y expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1, ICAM-1 y selectina

E [87], sin embargo en los tiempos del ensayo ex vivo no hubo cambios en la presencia de estas proteínas por inmunofluorescencia y solo mostramos un incremento de la expresión temprana de ICAM-1 la cual tiene un punto máximo de expresión entre 6-12 horas mientras que otras moléculas como VCAM-1 lo hacen hasta las 24 horas dependiendo del estímulo.

Se sabe que otras moléculas como RAGE u otros receptores de la familia de las inmunoglobulinas pueden ayudar a la adhesión de leucocitos o células tumorales en modelos animales y de células HUVEC's [138]. RAGE es una molécula que no lo sirve para unirse a los productos finales de glicosilación avanzadas (AGE's) sino también a moléculas intracelulares o de unión al ADN como S100-1 y HMGB1 respectivamente. La activación de RAGE por estas moléculas favorece la inflamación crónica y la activación de NFκB en modelos de inflamación en aterosclerosis, daño pulmonar, cáncer, entre otros [139-141].

Finalmente se evaluó por Western blot (resultados preliminares) la expresión de ICAM-1 y selectina E en cortes de venas activados con TNF en tiempos de 3h y 4 h observandose cambios en la expresión proteica en condiciones de flujo y con células U937 circulante por 1 y 2 horas. Si estos resultados se mantienen permitirán corroborar el papel de estas moléculas en la adhesión ex vivo con flujo por TNF-α.

## CONCLUSIONES

La activación por TNF- $\alpha$  ex vivo en el endotelio humano en presencia de un flujo laminar semejante al de vénulas humanas indujo la secreción de óxido nítrico y la producción de moléculas pro inflamatorias, así como el incremento en la expresión proteica de la selectina E y de ICAM-1. Estos cambios se asociaron a una mayor presencia de monocitos en la superficie endotelial vascular.

## PERSPECTIVAS

El ajuste de los reservorios para cerrarse completamente permitirá extender los tiempos de los ensayos para evaluar la expresión de moléculas de adhesión evitando problemas de contaminación.

Es necesario completar la determinación de la expresión génica y proteica de ICAM-1 en una curva temporal (0.5, 1, 2, 3, 6 horas) la adhesión de monocitos U937, así como de selectina E y VCAM-1 para asegurarnos que estas moléculas estén implicadas en la adhesión laxa o firme al endotelio ex vivo.

La activación endotelial por factores solubles secretados por macrófagos o linfocitos así como células tumorales, puede ser medida para evaluar cambios en la adhesividad del endotelio en estas condiciones hemodinámicas por varias vías de activación.

## REFERENCIAS

1. Hawiger, J., *Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm*. Immunol Res, 2001. **23**(2-3): p. 99-109.
2. Lintermans, L.L., et al., *T cells in vascular inflammatory diseases*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 504.
3. Stassen, M., et al., *Mast cells and inflammation*. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2002. **50**(3): p. 179-85.
4. Dinauer, M.C., *Disorders of neutrophil function: an overview*. Methods Mol Biol, 2014. **1124**: p. 501-15.
5. Smith, M.D., et al., *Successful treatment of rheumatoid arthritis is associated with a reduction in synovial membrane cytokines and cell adhesion molecule expression*. Rheumatology (Oxford), 2001. **40**(9): p. 965-77.
6. Hanna, S. and A. Etzioni, *Leukocyte adhesion deficiencies*. Ann N Y Acad Sci, 2012. **1250**: p. 50-5.
7. Underhill, D.M. and A. Ozinsky, *Phagocytosis of microbes: complexity in action*. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 825-52.
8. Fal, A.M., *[Cytokines and anti-cytokines in allergic diseases]*. Pol Merkur Lekarski, 2003. **14**(84): p. 613-6.
9. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immune recognition: mechanisms and pathways*. Immunol Rev, 2000. **173**: p. 89-97.
10. Ramirez, K. and B.L. Kee, *Multiple hats for natural killers*. Curr Opin Immunol, 2010. **22**(2): p. 193-8.
11. Spellberg, B. and J.E. Edwards, Jr., *Type 1/Type 2 immunity in infectious diseases*. Clin Infect Dis, 2001. **32**(1): p. 76-102.
12. Fleisher, T.A. and J.J. Bleesing, *Immune function*. Pediatr Clin North Am, 2000. **47**(6): p. 1197-209.
13. Cheng, S.B. and S. Sharma, *Interleukin-10: A Pleiotropic Regulator in Pregnancy*. Am J Reprod Immunol, 2014.
14. Ng, C.T. and M.B. Oldstone, *IL-10: achieving balance during persistent viral infection*. Curr Top Microbiol Immunol, 2014. **380**: p. 129-44.
15. Duo, C.C., et al., *Soluble calreticulin induces tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and interleukin (IL)-6 production by macrophages through mitogen-activated protein kinase (MAPK) and NFkappaB signaling pathways*. Int J Mol Sci, 2014. **15**(2): p. 2916-28.
16. Muenchen, H.J., et al., *Tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis in prostate cancer cells through inhibition of nuclear factor-kappaB by an IkappaBalphalpha "super-repressor"*. Clin Cancer Res, 2000. **6**(5): p. 1969-77.
17. Posadas, I., P. Santos, and V. Cena, *Acetaminophen induces human neuroblastoma cell death through NFkB activation*. PLoS One, 2012. **7**(11): p. e50160.
18. Dobrovolskaia, M.A., et al., *Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR*

- "homotolerance" versus "heterotolerance" on NF-kappa B signaling pathway components. *J Immunol*, 2003. **170**(1): p. 508-19.
19. Chien, W., et al., *Growth inhibition of pancreatic cancer cells by histone deacetylase inhibitor belinostat through suppression of multiple pathways including HIF, NFkB, and mTOR signaling in vitro and in vivo*. *Mol Carcinog*, 2014. **53**(9): p. 722-35.
  20. Bharti, A.C., et al., *Nuclear factor-kappaB and STAT3 are constitutively active in CD138+ cells derived from multiple myeloma patients, and suppression of these transcription factors leads to apoptosis*. *Blood*, 2004. **103**(8): p. 3175-84.
  21. Yamaoka, K., et al., *Selective DNA-binding activity of interleukin-10-stimulated STAT molecules in human monocytes*. *J Interferon Cytokine Res*, 1999. **19**(6): p. 679-85.
  22. Rayet, B. and C. Gelinas, *Aberrant rel/nfkb genes and activity in human cancer*. *Oncogene*, 1999. **18**(49): p. 6938-47.
  23. Huang, D.B., et al., *X-ray crystal structure of proto-oncogene product c-Rel bound to the CD28 response element of IL-2*. *Structure*, 2001. **9**(8): p. 669-78.
  24. Rolova, T., et al., *Complex regulation of acute and chronic neuroinflammatory responses in mouse models deficient for nuclear factor kappa B p50 subunit*. *Neurobiol Dis*, 2014. **64**: p. 16-29.
  25. Wang, X.C., et al., *Effects of glucagon-like peptide-1 receptor agonists on non-alcoholic fatty liver disease and inflammation*. *World J Gastroenterol*, 2014. **20**(40): p. 14821-30.
  26. Bruder-Nascimento, T., M.A. da Silva, and R.C. Tostes, *The involvement of aldosterone on vascular insulin resistance: implications in obesity and type 2 diabetes*. *Diabetol Metab Syndr*, 2014. **6**(1): p. 90.
  27. Attygalle, A.D., et al., *Peripheral T-cell and NK-cell lymphomas and their mimics; taking a step forward - report on the lymphoma workshop of the XVIth meeting of the European Association for Haematopathology and the Society for Hematopathology*. *Histopathology*, 2014. **64**(2): p. 171-99.
  28. Bhattacharyya, S. and S.M. Helfgott, *Neurologic complications of systemic lupus erythematosus, sjogren syndrome, and rheumatoid arthritis*. *Semin Neurol*, 2014. **34**(4): p. 425-36.
  29. Scott, I.C. and D.L. Scott, *Joint counts in inflammatory arthritis*. *Clin Exp Rheumatol*, 2014. **32**(5 Suppl 85): p. S-7-12.
  30. Noy, R. and J.W. Pollard, *Tumor-associated macrophages: from mechanisms to therapy*. *Immunity*, 2014. **41**(1): p. 49-61.
  31. Ryan, U.S. and J.W. Ryan, *Cell biology of pulmonary endothelium*. *Circulation*, 1984. **70**(5 Pt 2): p. III46-62.
  32. Badimon, L. and J. Martinez-Gonzalez, *[Endothelium and vascular protection: an update]*. *Rev Esp Cardiol*, 2002. **55** Suppl 1: p. 17-26.
  33. Ota, G., et al., *[Thromboplastic activity of the vascular endothelium. Basic study and its application to the endothelium of human aorta]*. *Nihon Rinsho*, 1969. **27**(4): p. 1305-11.

34. Mooren, O.L., et al., *Endothelial cells use dynamic actin to facilitate lymphocyte transendothelial migration and maintain the monolayer barrier*. Mol Biol Cell, 2014. **25**(25): p. 4115-29.
35. Alonso-Bouzon, C., et al., *Association between endothelial dysfunction and frailty: the Toledo Study for Healthy Aging*. Age (Dordr), 2014. **36**(1): p. 495-505.
36. Weissmann, N., et al., *Structural and functional prevention of hypoxia-induced pulmonary hypertension by individualized exercise training in mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2014. **306**(11): p. L986-95.
37. Irrthum, A., et al., *Linkage disequilibrium narrows locus for venous malformation with glomus cells (VMGLOM) to a single 1.48 Mbp YAC*. Eur J Hum Genet, 2001. **9**(1): p. 34-8.
38. Andriambeloson, E., et al., *Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta*. Br J Pharmacol, 1997. **120**(6): p. 1053-8.
39. Soszynski, D., *Molecular mechanism of emotional fever--the role of nitric oxide*. J Physiol Pharmacol, 2006. **57 Suppl 8**: p. 51-9.
40. Mattila, J.T. and A.C. Thomas, *Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 478.
41. Binion, D.G., et al., *iNOS expression in human intestinal microvascular endothelial cells inhibits leukocyte adhesion*. Am J Physiol, 1998. **275**(3 Pt 1): p. G592-603.
42. Kang, K.T., *Endothelium-derived Relaxing Factors of Small Resistance Arteries in Hypertension*. Toxicol Res, 2014. **30**(3): p. 141-8.
43. Simmonds, M.J., J.A. Detterich, and P. Connes, *Nitric oxide, vasodilation and the red blood cell*. Biorheology, 2014. **51**(2-3): p. 121-34.
44. Jones-Carson, J., et al., *Nitric oxide from IFN $\gamma$ -primed macrophages modulates the antimicrobial activity of beta-lactams against the intracellular pathogens Burkholderia pseudomallei and Nontyphoidal Salmonella*. PLoS Negl Trop Dis, 2014. **8**(8): p. e3079.
45. Hermida, N. and J.L. Balligand, *Low-density lipoprotein-cholesterol-induced endothelial dysfunction and oxidative stress: the role of statins*. Antioxid Redox Signal, 2014. **20**(8): p. 1216-37.
46. Luo, J., et al., *p85-RhoGDI2, a novel complex, is required for PSGL-1-induced beta1 integrin-mediated lymphocyte adhesion to VCAM-1*. Int J Biochem Cell Biol, 2013. **45**(12): p. 2764-73.
47. Nachman, R.L. and E.A. Jaffe, *Endothelial cell culture: beginnings of modern vascular biology*. J Clin Invest, 2004. **114**(8): p. 1037-40.
48. Jiang, H.H., et al., *[Change of vWF, PAI-1 and t-PA in rats with hyperlipemia and its significance]*. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 2008. **33**(5): p. 415-20.
49. O'Brien, T.S., et al., *Expression of the angiogenic factor thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor in primary bladder cancers*. Cancer Res, 1996. **56**(20): p. 4799-804.
50. Stapor, P., et al., *Angiogenesis revisited - role and therapeutic potential of targeting endothelial metabolism*. J Cell Sci, 2014. **127**(Pt 20): p. 4331-41.

51. Wu, L., et al., *Orosomucoid1: Involved in vascular endothelial growth factor-induced blood-brain barrier leakage after ischemic stroke in mouse*. Brain Res Bull, 2014. **109**: p. 88-98.
52. Guo, Z.H., et al., [*Vascular endothelial growth factor (VEGF) and basic fibroblast growth factor (bFGF) expression in superficial transitional cell bladder carcinoma*]. Ai Zheng, 2003. **22**(3): p. 307-9.
53. Tjwa, M., et al., *VEGF and PlGF: two pleiotropic growth factors with distinct roles in development and homeostasis*. Cell Tissue Res, 2003. **314**(1): p. 5-14.
54. Koczy-Baron, E. and A. Kasperska-Zajac, [*The role of vascular endothelial growth factor in inflammatory processes*]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2014. **68**: p. 57-65.
55. Abdelrahim, M. and S. Safe, *Cyclooxygenase-2 inhibitors decrease vascular endothelial growth factor expression in colon cancer cells by enhanced degradation of Sp1 and Sp4 proteins*. Mol Pharmacol, 2005. **68**(2): p. 317-29.
56. Riabov, V., et al., *Role of tumor associated macrophages in tumor angiogenesis and lymphangiogenesis*. Front Physiol, 2014. **5**: p. 75.
57. Flamme, I., et al., *Overexpression of vascular endothelial growth factor in the avian embryo induces hypervascularization and increased vascular permeability without alterations of embryonic pattern formation*. Dev Biol, 1995. **171**(2): p. 399-414.
58. Menghini, R., et al., *Toll-like receptor 4 mediates endothelial cell activation through NF-kappaB but is not associated with endothelial dysfunction in patients with rheumatoid arthritis*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e99053.
59. Olea, F.D., et al., *Vascular endothelial growth factor overexpression does not enhance adipose stromal cell-induced protection on muscle damage in critical limb ischemia*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2015. **35**(1): p. 184-8.
60. Bereta, J., M.C. Cohen, and M. Bereta, *Stimulatory effect of ouabain on VCAM-1 and iNOS expression in murine endothelial cells: involvement of NF-kappa B*. FEBS Lett, 1995. **377**(1): p. 21-5.
61. Alliegro, M.C. and M.A. Alliegro, *A nuclear protein regulated during the transition from active to quiescent phenotype in cultured endothelial cells*. Dev Biol, 1996. **174**(2): p. 288-97.
62. Jung, C.H., et al., *Vaspin inhibits cytokine-induced nuclear factor-kappa B activation and adhesion molecule expression via AMP-activated protein kinase activation in vascular endothelial cells*. Cardiovasc Diabetol, 2014. **13**: p. 41.
63. Heemskerk, N., J. van Rijssel, and J.D. van Buul, *Rho-GTPase signaling in leukocyte extravasation: an endothelial point of view*. Cell Adh Migr, 2014. **8**(2): p. 67-75.
64. Garrido-Urbani, S., P.F. Bradfield, and B.A. Imhof, *Tight junction dynamics: the role of junctional adhesion molecules (JAMs)*. Cell Tissue Res, 2014. **355**(3): p. 701-15.
65. Garbacki, N., et al., *Proanthocyanidins, from Ribes nigrum leaves, reduce endothelial adhesion molecules ICAM-1 and VCAM-1*. J Inflamm (Lond), 2005. **2**: p. 9.

66. Langston, W., et al., *Regulation of endothelial glutathione by ICAM-1 governs VEGF-A-mediated eNOS activity and angiogenesis*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(5): p. 720-9.
67. Shcheglovitova, O.N., et al., *[Adhesion molecules expressed in vascular endothelial cells in natural immunity against viral infections]*. Vestn Ross Akad Med Nauk, 2011(10): p. 54-60.
68. Zhang, F.L., et al., *Selective inhibition by grape seed proanthocyanidin extracts of cell adhesion molecule expression induced by advanced glycation end products in endothelial cells*. J Cardiovasc Pharmacol, 2006. **48**(2): p. 47-53.
69. Abdala-Valencia, H., S. Berdnikovs, and J.M. Cook-Mills, *Mechanisms for vascular cell adhesion molecule-1 activation of ERK1/2 during leukocyte transendothelial migration*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26706.
70. Watson, M.L., et al., *Genomic organization of the selectin family of leukocyte adhesion molecules on human and mouse chromosome 1*. J Exp Med, 1990. **172**(1): p. 263-72.
71. Collins, T., et al., *Structure and chromosomal location of the gene for endothelial-leukocyte adhesion molecule 1*. J Biol Chem, 1991. **266**(4): p. 2466-73.
72. Mousa, S.A., *Cell adhesion molecules: potential therapeutic & diagnostic implications*. Mol Biotechnol, 2008. **38**(1): p. 33-40.
73. Laferriere, J., F. Houle, and J. Huot, *Adhesion of HT-29 colon carcinoma cells to endothelial cells requires sequential events involving E-selectin and integrin beta4*. Clin Exp Metastasis, 2004. **21**(3): p. 257-64.
74. Jaffe, E.A., et al., *Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria*. J Clin Invest, 1973. **52**(11): p. 2745-56.
75. Virji, M. and D.J. Hill, *In vitro models of infection II--human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) system*. Methods Mol Med, 2003. **71**: p. 297-314.
76. Taubert, H., et al., *Expression of the stem cell self-renewal gene Hiwi and risk of tumour-related death in patients with soft-tissue sarcoma*. Oncogene, 2007. **26**(7): p. 1098-100.
77. Liang, M., et al., *A modified murine model of systemic sclerosis: bleomycin given by pump infusion induced skin and pulmonary inflammation and fibrosis*. Lab Invest, 2014.
78. Hess, A.P., et al., *Expression of the vascular endothelial growth factor receptor neuropilin-1 in the human endometrium*. J Reprod Immunol, 2009. **79**(2): p. 129-36.
79. Jakab, C., et al., *Evaluation of microvessel density (MVD) in canine mammary tumours by quantitative immunohistochemistry of the claudin-5 molecule*. Acta Vet Hung, 2008. **56**(4): p. 495-510.
80. Texido, G., *Genetically engineered animal models for in vivo target identification and validation in oncology*. Methods Mol Biol, 2013. **986**: p. 281-305.
81. Lawson, K.A., et al., *Novel vitamin E analogue decreases syngeneic mouse mammary tumor burden and reduces lung metastasis*. Mol Cancer Ther, 2003. **2**(5): p. 437-44.

82. Hibberd, C., D.A. Cossigny, and G.M. Quan, *Animal cancer models of skeletal metastasis*. Cancer Growth Metastasis, 2013. **6**: p. 23-34.
83. Auguste, P., et al., *The host inflammatory response promotes liver metastasis by increasing tumor cell arrest and extravasation*. Am J Pathol, 2007. **170**(5): p. 1781-92.
84. Liu-Bryan, R., *Synovium and the innate inflammatory network in osteoarthritis progression*. Curr Rheumatol Rep, 2013. **15**(5): p. 323.
85. Cossigny, D. and G.M. Quan, *In vivo animal models of spinal metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 2012. **31**(1-2): p. 99-108.
86. Sehgal, V., et al., *Susceptibility-weighted imaging to visualize blood products and improve tumor contrast in the study of brain masses*. J Magn Reson Imaging, 2006. **24**(1): p. 41-51.
87. Montes-Sanchez, D., et al., *Glycosylated VCAM-1 isoforms revealed in 2D western blots of HUVECs treated with tumoral soluble factors of breast cancer cells*. BMC Chem Biol, 2009. **9**: p. 7.
88. Muro, S., et al., *A novel endocytic pathway induced by clustering endothelial ICAM-1 or PECAM-1*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 8): p. 1599-609.
89. Yang, B.L., et al., *Effect of shunting of collateral flow into the venous system on arteriogenesis and angiogenesis in rabbit hind limb*. Acta Histochem Cytochem, 2013. **46**(1): p. 1-10.
90. Tanaka, K., et al., *In vivo optical imaging of cancer metastasis using multiphoton microscopy: a short review*. Am J Transl Res, 2014. **6**(3): p. 179-87.
91. DeVerse, J.S., et al., *Shear stress modulates VCAM-1 expression in response to TNF-alpha and dietary lipids via interferon regulatory factor-1 in cultured endothelium*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2013. **305**(8): p. H1149-57.
92. Sun, L., N.M. Rajamannan, and P. Sucusky, *Defining the role of fluid shear stress in the expression of early signaling markers for calcific aortic valve disease*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e84433.
93. Gomes, N., et al., *Shear stress modulates tumour cell adhesion to the endothelium*. Biorheology, 2003. **40**(1-3): p. 41-5.
94. Devaraj, S., et al., *CRP promotes monocyte-endothelial cell adhesion via Fc gamma receptors in human aortic endothelial cells under static and shear flow conditions*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006. **291**(3): p. H1170-6.
95. Vogel, J., et al., *Parallel changes of blood flow and heterogeneity of capillary plasma perfusion in rat brains during hypocapnia*. Am J Physiol, 1996. **270**(4 Pt 2): p. H1441-5.
96. Green, L.C., et al., *Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids*. Anal Biochem, 1982. **126**(1): p. 131-8.
97. Shasby, D.M., *Cell-cell adhesion in lung endothelium*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. **292**(3): p. L593-607.
98. Albelda, S.M., *Endothelial and epithelial cell adhesion molecules*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1991. **4**(3): p. 195-203.
99. Rutishauser, U., et al., *Cell-adhesion molecules from neural tissues of the chick embryo*. Birth Defects Orig Artic Ser, 1978. **14**(2): p. 305-16.

100. Katz, D.H. and R.I. Zuberi, *Cell interaction (CI) and anti-CI molecules: experiments and concepts on cell/cell interactions in the immune system*. Ann Immunol (Paris), 1984. **135D**(1): p. 95-8.
101. Kaminska, K., et al., *The role of the cell-cell interactions in cancer progression*. J Cell Mol Med, 2015. **19**(2): p. 283-96.
102. Ng, M.R., et al., *Mapping the dynamics of force transduction at cell-cell junctions of epithelial clusters*. Elife, 2014. **3**: p. e03282.
103. Suzuki, H., et al., *Model for the Architecture of Claudin-Based Paracellular Ion Channels through Tight Junctions*. J Mol Biol, 2015. **427**(2): p. 291-7.
104. Saucy, F., et al., *Ex vivo pulsatile perfusion of human saphenous veins induces intimal hyperplasia and increased levels of the plasminogen activator inhibitor 1*. Eur Surg Res, 2010. **45**(1): p. 50-9.
105. Dummler, S., et al., *Pulsatile ex vivo perfusion of human saphenous vein grafts under controlled pressure conditions increases MMP-2 expression*. Biomed Eng Online, 2011. **10**: p. 62.
106. Kim, K.H., A. Barazia, and J. Cho, *Real-time imaging of heterotypic platelet-neutrophil interactions on the activated endothelium during vascular inflammation and thrombus Formation in live mice*. J Vis Exp, 2013(74).
107. Brooks, A.R., P.I. Leikes, and G.M. Rubanyi, *Gene expression profiling of vascular endothelial cells exposed to fluid mechanical forces: relevance for focal susceptibility to atherosclerosis*. Endothelium, 2004. **11**(1): p. 45-57.
108. Burns, M.P. and N. DePaola, *Flow-conditioned HUVECs support clustered leukocyte adhesion by coexpressing ICAM-1 and E-selectin*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(1): p. H194-204.
109. Ando, J. and A. Kamiya, *Flow-dependent regulation of gene expression in vascular endothelial cells*. Jpn Heart J, 1996. **37**(1): p. 19-32.
110. Zhou, J., Y.S. Li, and S. Chien, *Shear stress-initiated signaling and its regulation of endothelial function*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2014. **34**(10): p. 2191-8.
111. Shimada, Y., et al., *Growth-inhibiting effect of tumor necrosis factor on human umbilical vein endothelial cells is enhanced with advancing age in vitro*. J Cell Physiol, 1990. **142**(1): p. 31-8.
112. Ley, K., et al., *Shear-dependent inhibition of granulocyte adhesion to cultured endothelium by dextran sulfate*. Blood, 1989. **73**(5): p. 1324-30.
113. Zhao, Q., C. Gao, and Z. Cui, *Ginkgolide A reduces inflammatory response in high-glucose-stimulated human umbilical vein endothelial cells through STAT3-mediated pathway*. Int Immunopharmacol, 2015.
114. Feng, N., et al., *miR-487b promotes human umbilical vein endothelial cell proliferation, migration, invasion and tube formation through regulating THBS1*. Neurosci Lett, 2015. **591C**: p. 1-7.
115. Estrada-Bernal, A., et al., *NF-kappaB dependent activation of human endothelial cells treated with soluble products derived from human lymphomas*. Cancer Lett, 2003. **191**(2): p. 239-48.
116. Lopez-Bojorquez, L.N., et al., *NF-kappaB translocation and endothelial cell activation is potentiated by macrophage-released signals co-secreted with TNF-alpha and IL-1beta*. Inflamm Res, 2004. **53**(10): p. 567-75.

117. McConnell, K.I., et al., *Enhanced gene delivery in porcine vasculature tissue following incorporation of adeno-associated virus nanoparticles into porous silicon microparticles*. J Control Release, 2014. **194**: p. 113-21.
118. Mavromatis, K., et al., *Early effects of arterial hemodynamic conditions on human saphenous veins perfused ex vivo*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2000. **20**(8): p. 1889-95.
119. Makkar, R.R., et al., *Effects of clopidogrel, aspirin and combined therapy in a porcine ex vivo model of high-shear induced stent thrombosis*. Eur Heart J, 1998. **19**(10): p. 1538-46.
120. Yurdagul, A., Jr., et al., *Altered nitric oxide production mediates matrix-specific PAK2 and NF-kappaB activation by flow*. Mol Biol Cell, 2013. **24**(3): p. 398-408.
121. Dixit, M., et al., *Gab1, SHP2, and protein kinase A are crucial for the activation of the endothelial NO synthase by fluid shear stress*. Circ Res, 2005. **97**(12): p. 1236-44.
122. Rosenthal-Allieri, M.A., et al., *Influence of beta 1 integrin intracytoplasmic domains in the regulation of VLA-4-mediated adhesion of human T cells to VCAM-1 under flow conditions*. J Immunol, 2005. **175**(2): p. 1214-23.
123. Marczin, N., et al., *Monocyte-induced downregulation of nitric oxide synthase in cultured aortic endothelial cells*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1996. **16**(9): p. 1095-103.
124. Sun, Y., et al., *alpha-Naphthoflavone modulates inflammatory response in adipocytes-macrophages interaction through NFkappaB signaling*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(11): p. 7768-74.
125. den Hartigh, L.J., et al., *Postprandial VLDL lipolysis products increase monocyte adhesion and lipid droplet formation via activation of ERK2 and NFkappaB*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014. **306**(1): p. H109-20.
126. Xu, H., et al., *Tumor-associated macrophage-derived IL-6 and IL-8 enhance invasive activity of LoVo cells induced by PRL-3 in a KCNN4 channel-dependent manner*. BMC Cancer, 2014. **14**: p. 330.
127. Zhang, W. and H. Chen, *[The study on the interleukin-8 (IL-8)]*. Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi, 2002. **19**(4): p. 697-702.
128. Dixit, N. and S.I. Simon, *Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest*. Front Immunol, 2012. **3**: p. 188.
129. Patel, K.D., *Eosinophil tethering to interleukin-4-activated endothelial cells requires both P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1*. Blood, 1998. **92**(10): p. 3904-11.
130. Konstantopoulos, K., et al., *Endothelial P-selectin and VCAM-1 each can function as primary adhesive mechanisms for T cells under conditions of flow*. J Leukoc Biol, 1997. **61**(2): p. 179-87.
131. Cuvelier, S.L. and K.D. Patel, *Shear-dependent eosinophil transmigration on interleukin 4-stimulated endothelial cells: a role for endothelium-associated eotaxin-3*. J Exp Med, 2001. **194**(12): p. 1699-709.
132. Robinson, A.J., et al., *Montelukast inhibition of resting and GM-CSF-stimulated eosinophil adhesion to VCAM-1 under flow conditions appears independent of cysLT(1)R antagonism*. J Leukoc Biol, 2008. **83**(6): p. 1522-9.

133. Robinson, A.J., et al., *Fluvastatin and lovastatin inhibit granulocyte macrophage-colony stimulating factor-stimulated human eosinophil adhesion to inter-cellular adhesion molecule-1 under flow conditions*. Clin Exp Allergy, 2009. **39**(12): p. 1866-74.
134. Sheikh Bahaie, N., et al., *GM-CSF differentially regulates eosinophil and neutrophil adhesive interactions with vascular endothelium in vivo*. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2010. **9**(4): p. 207-17.
135. Liu, Y., et al., *Reconstruction of hematopoietic inductive microenvironment after transplantation of VCAM-1-modified human umbilical cord blood stromal cells*. PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31741.
136. Ishibazawa, A., et al., *Effects of shear stress on the gene expressions of endothelial nitric oxide synthase, endothelin-1, and thrombomodulin in human retinal microvascular endothelial cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(11): p. 8496-504.
137. Chiu, J.J., et al., *Shear stress inhibits adhesion molecule expression in vascular endothelial cells induced by coculture with smooth muscle cells*. Blood, 2003. **101**(7): p. 2667-74.
138. Sessa, L., et al., *The receptor for advanced glycation end-products (RAGE) is only present in mammals, and belongs to a family of cell adhesion molecules (CAMs)*. PLoS One, 2014. **9**(1): p. e86903.
139. Buschmann, K., et al., *RAGE controls leukocyte adhesion in preterm and term infants*. BMC Immunol, 2014. **15**(1): p. 53.
140. Braach, N., et al., *Anti-inflammatory functions of protein C require RAGE and ICAM-1 in a stimulus-dependent manner*. Mediators Inflamm, 2014. **2014**: p. 743678.
141. Frommhold, D., et al., *RAGE and ICAM-1 differentially control leukocyte recruitment during acute inflammation in a stimulus-dependent manner*. BMC Immunol, 2011. **12**: p. 56.

Caracterización de un modelo hemodinámico ex vivo, para el estudio de la activación endotelial por TNF- $\alpha$  en venas humanas perfundidas.

Título corto: Adhesión endotelial en vena humana (35 caracteres)

Ambar López-Macay<sup>1,4,5,6</sup>, Edgar Josué Ruiz-Medina<sup>2</sup>, José Luis Ventura-Gallegos<sup>2,5</sup>, Fabián Arechavaleta-Velasco<sup>3</sup>, Luis Enrique Gómez-Quiroz<sup>1</sup>, Mina Konigsberg-Fainstein<sup>1</sup>, Alejandro Zentella-Dehesa<sup>2,5</sup>, \*.

1 Depto. Ciencias de la Salud, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México D.F.

2 Depto. Medicina Genómica y Toxicología Ambiental. IIB, UNAM.

3 Unidad de investigación Médica en Medicina Reproductiva, Hospital de Gineco-obstetricia n. 4 “Dr. Rafael Castelazo Ayala”, IMSS, México, D.F.

4 Laboratorio de Líquido Sinovial, Instituto Nacional de Rehabilitación, D.F

5 Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”, México, D.F.

6 Posgrado en Biología Experimental, UAMI.

\*Autor correspondiente: [azentell@biomedicas.unam.mx](mailto:azentell@biomedicas.unam.mx)

Autor correspondiente: Dr. Alejandro Zentella Dehesa

Dirección: Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán (INCMNSZ)

Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, Col. Sección XVI, C.P.14000, Mexico D.F.

1er. piso, Lab.2 de la Unidad de Bioquímica

Teléfonos: 5487-0900 ( Exts. 2606 y 2607)

Correo electrónico: [azentell@biomedicas.unam.mx](mailto:azentell@biomedicas.unam.mx)

Este trabajo fue financiado por la UNAM y por el INCMNSZ. A. López-Macay fue apoyado por el CONACyT con una beca para estudios de posgrado (200845).

## RESUMEN

Los procesos inflamatorios son reconocidos como parte de la etiología de una gran cantidad de enfermedades crónico-degenerativas. La interacción entre las células del sistema inmunológico con las células locales, y moléculas como citosinas y quimiocinas, permiten la activación celular y la amplificación de la respuesta. Actualmente se reconoce la importancia de factores fisicoquímicos como el flujo vascular, fuerzas de rozamiento y presión, durante este evento, puesto que modulan expresión génica y activación endotelial; pero existen pocos estudios que recreen dicho microambiente celular. Por ello, surge la necesidad de diseñar nuevos modelos que simulen condiciones cercanas a las fisiológicas. Nuestro objetivo fue establecer un modelo ex-vivo de vena humana, que permitiera activar al endotelio en condiciones de flujo, para estudiar los componentes moleculares de la adhesión, considerando parámetros fisicoquímicos como flujo y rozamiento. Se empleó la vena endotelial umbilical humana, la cual se activó con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), para determinar la adhesión de células monocíticas U937 circulantes, así como la secreción de citocinas y la expresión de la molécula de adhesión ICAM-1. Este modelo permitirá estudiar la adhesión leucocitaria en condiciones de flujo empleando distintos estímulos inflamatorios, así como las vías de señalización implicadas en diversas patologías.

**PALABRAS CLAVE:** Endotelio, adhesión, inflamación, flujo vascular, perfusión.

## ABSTRACT

Characterization of an hemodynamic ex vivo model, to study endothelial activation by TNF- $\alpha$  in prefunded human veins.

Inflammation is recognized as part of the etiology of numerous diseases. The interaction among cells of the immunological system with local cells and molecules such as cytokines and chemokines, allows cellular activation and response amplification. The importance of several physicochemical factors like frictional force, vascular flow, shear stress and pressure, is now recognized because they are known to modulate genetic expression and endothelial activation; however, they are very rare studies that recreate such cellular microenvironments. Hence, it is of paramount importance to develop new models that will mimic physiological conditions. Our aim was to improve a human vein ex-vivo model that would allow endothelial activation in flow conditions, to study the molecular components during adhesion, taking into consideration physicochemical parameters such as flow and shear stress. Endothelial umbilical human vein was used and activated with TNF- $\alpha$  in order to determine U937 monocytic cells adhesion, as well as cytokines secretion and ICAM-1 expression. This model will allow leukocytary adhesion studies, using different inflammatory stimulus, along with the signaling pathways involved in several pathologies.

KEY WORDS: Endothelium, adhesion, inflammation, vascular flow, perfusion.

## INTRODUCCIÓN

En la actualidad, los procesos inflamatorios son reconocidos como parte de la etiología de una gran variedad de enfermedades crónico-degenerativas como la diabetes y el cáncer. Este tipo de procesos involucran no solo a leucocitos y monocitos residentes de los tejidos, sino también otros tipos celulares como los fibroblastos, las células epiteliales, musculares y endoteliales. De manera que comprender la interacción de las células del sistema inmune con su microambiente se ha convertido en un requisito para entender el proceso inflamatorio a nivel celular y molecular (1,2). En este contexto, la adhesión leucocitaria al endotelio vascular es elemental para el advenimiento de los distintos tipos celulares al sitio de daño o infección. Actualmente ya han sido identificadas distintas moléculas involucradas en este proceso, tales como factores de crecimiento, quimiocinas y citosinas, entre las que destacan VEGF, IL8, MIP-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , INF- $\gamma$ . Además de moléculas de adhesión como selectinas, integrinas, inmunoglobulinas y cadherinas, etc (3-5). No obstante, es importante mencionar que muy pocos de los estudios actuales sobre la adhesión leucocitaria y la comunicación con el endotelio, consideran ciertos factores importantes como el flujo vascular, que juega un papel primordial en este tipo de fenómenos.

El flujo vascular y las fuerzas de rozamiento, así como la presión, son importantes en procesos endoteliales como la vasodilatación, el paso de nutrientes y la coagulación; incluso en la formación de micropartículas y en focos inflamatorios durante algunas enfermedades, como la aterosclerosis y el lupus, entre otras (6,7). En los últimos años se ha demostrado que este tipo de factores físicos o físico-químicos, pueden llegar a modular la expresión génica endotelial. Se ha demostrado que las fuerzas de rozamiento pueden alterar la expresión de genes como p53, que con lleva a la detención el ciclo celular en neutrófilos (8), o bien proteínas como Hur, involucradas en la regulación de moléculas como TLR4 e ICAM-1 (9). De modo que, los cambios en la velocidad de flujo puede favorecer o afectar la adhesión leucocitaria al cambiar la morfología y activación del endotelio (10, 11).

La inflamación aguda o crónica tradicionalmente se ha estudiado en modelos in vitro empelando líneas celulares o leucocitos de sangre periférica, o bien in vivo, usando roedores inmunosuprimidos o transgénicos (12,13), sin embargo, la mayoría de estos modelos no consideran los parámetros de flujo vascular y fuerza de rozamiento antes mencionados. Algunos estudios con células humanas crecidas en monocapa, a las que se sometió a condiciones de flujo, expresaron moléculas distintas a las del endotelio dentro de la vena (14). Asimismo, modelos murinos demostraron que no todas las células endoteliales tienen la misma capacidad para adherir leucocitos, aun y cuando expresen moléculas de adhesión, ya que se ha visto que pueden expresar

distintas moléculas, dependiendo de las células involucradas (15). Tal es el caso de ICAM-1 apoyada por el receptor de productos de glicosilación avanzada (RAGE), que mantiene la adhesión de neutrofilos in vivo (16-18).

Por todo lo anterior, surge la necesidad de diseñar nuevos modelos que permitan estudiar a los componentes moleculares que regulan la adhesión en condiciones de flujo dentro de venas humanas. Es por ello que el objetivo de este trabajo fue el diseñar un modelo ex vivo de vena humana, que permitiera activar el endotelio humano en condiciones de flujo de venas pequeñas, para poder estudiar los componentes molecular de la adhesión, considerando también a los parámetros fisicoquímicos de flujo y rozamiento.

Para ello, se empleó como modelo la vena endotelial umbilical humana, la cual se activó con el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), para poder determinar la adhesión de células U937 circulantes, y algunos de los componentes moleculares asociados a este evento.

## MATERIAL Y METODOS

### Obtención de células y tejidos

Las venas umbilicales se obtuvieron a partir de partos o cesáreas eutócicos sin complicaciones en el hospital de Ginecología y Obstetricia "Dr. Luis Castelazo Ayala-IMSS" en la Ciudad de México. Bajo un protocolo clínico previamente aprobado por el comité de ética del hospital. Una vez recogidas, las venas se seccionaron en fragmentos de 5 cm, con el fin de realizar tratamientos distintos con la misma longitud. Las venas se colocaron en recipientes con PBS suplementado con antibiótico-antimicótico (1.5 %). El tiempo de obtención de la muestra hasta el inicio del experimento nunca superó las 3 h.

La línea celular de leucemia promonocítica U937, se obtuvo de la ATCC (Manassas, VA, EUA). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 (6408-02, (Cole-Parmer Chicago, IL, EUA) suplementado con 10% de suero bovino fetal (FBS; GIBCO-BRL, Rockville, MD, EUA), 1% de aminoácidos no esenciales, penicilina 100 U/ml y estreptomina 100 µg/ml (GIBCO-BRL, Rockville, MD, EUA), los medios suplementados se refieren aquí como medios completos. El medio se sustituyó cada dos días o tres. Las células se cultivaron a 37 °C, en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%.

### Sistema de perfusión

El sistema de perfusión se diseñó utilizando recipientes de vidrio con doble fondo (Imparlab, Ciudad de México, México), para permitir el flujo de agua (baño de agua, PolyScience, Illinois EUA). Las mangueras de perfusión fueron de 3 mm de diámetro para el medio de perfusión RPMI-1640 y se acoplaron a los reservorios de vidrio. Las condiciones de presión y velocidad de flujo se controlaron mediante una bomba peristáltica (Masterflex 7015-20, Cole-Parmer Chicago, IL, EUA).

### Determinación de las fuerzas de rozamiento y flujo

Para determinar las fuerzas de rozamiento y el tipo de flujo (laminar o turbulento) dentro de la vena durante los ensayos de adhesión, fue necesario establecer los valores de la viscosidad ( $\mu$ ) y la densidad ( $\rho$ ) de los medios completados en ausencia y presencia de células. Para los ensayos se emplearon 30 ml de RPMI-1640 suplementado, con o sin células U-937 ( $3 \times 10^6$  células/ml). La viscosidad del medio RPMI-1640 completo se determinó usando un reómetro PSV002AB (Brockfield Engineering Laboratories, Inc. EUA), y se analizó la dependencia de la viscosidad en función de la temperatura. La velocidad angular fue 100g a partir de 10 alícuotas tomadas durante 2 min, 20 seg cada uno desde 8-30 °C. Los datos se capturaron usando el programa Rheovision 32v 2.0 y se analizaron con Origen v 7.0. La densidad media del medio RPMI-1640 se determinó pesando 1 ml de medio a 25°C y fue 1,007

g/ml con suero bovino fetal y se utilizaron para obtener el número de Reynolds ( $NR = \rho Dv/\mu$ ) (Vogel, 1996). El valor obtenido fue de  $NR \leq 2,000$ , lo que indica que la velocidad de flujo dentro de la vena se comporta como un flujo laminar. El flujo usado fue de  $900 \pm 100 \mu\text{l}/\text{min}$ , que es la condición fisiológica en vénulas humanas de diámetro 1 mm. La fuerza de rozamiento se calculó usando la ecuación para flujos newtonianos:  $\tau = 6\mu Q/h^2w = (6\mu/h^2w) Q$  donde  $\tau$  es la fuerza de rozamiento o shear stress (dinas/cm<sup>2</sup>);  $\mu$  el coeficiente de viscosidad del fluido;  $h$  la altura de la vena;  $w$  el ancho de la vena y  $Q$  la velocidad del flujo (Vogel, 1996) y se fijaron a  $\tau = 1,8 \pm 0,2$  y  $\tau = 2,2 \pm 0,2$  dinas/cm<sup>2</sup> con la presencia y sin células U937 circulantes respectivamente.

### Ensayos de histoquímica e inmunofluorescencia

Para observar la anatomía de la vena humana perfundida desde 0 hasta 6 horas en condiciones hemodinámicas, se seccionaron venas perfundidas y se fijaron en isopentano (Sigma Aldrich, EUA), para realizar cortes de 7 micras con un criostato (CM-18950 Sistemas de Leica, EUA) y posteriormente se congelaron a  $-20^\circ\text{C}$ . Se realizaron tinciones con hematoxilina/eosina (HE) y las muestras se observaron utilizando un microscopio óptico Axioscop40, (Carl Zeiss, Jena, Alemania). Simultáneamente se realizaron tinciones para inmunofluorescencia con anticuerpos específicos afines a los componentes de la estructura vascular, como el factor de Von Willebrand o beta sarcoglicanos, esto se realizó con anti-cuerpos primarios anti-ratón y conejo (Santa Cruz, CA, EUA) diluidos 1:100 y acoplados posteriormente a anticuerpos secundarios Alexa Fluor 647 (Molecular Probes, Oregon, EUA). Las muestras se observaron en un microscopio confocal LSM-510, (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

### Ensayo de Lactato Deshidrogenasa (LDH)

El daño a la membrana y la muerte celular inducida por la perfusión durante los ensayos, se determinó por la cantidad de LDH liberada en el medio de perfusión después de una hora de recirculación de células U937 en la vena humana, ya sea pre-activada por 2h con TNF- $\alpha$  a una concentración de 5 ng/ml o sin estímulo. Como control, se comparó el valor obtenido, con el valor de LDH liberada en el medio de cultivos estáticos (sin recirculación) de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC's) en las mismas condiciones. En ambos casos las muestras se centrifugaron durante 5 min a  $100 \times g$  y se congelaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su determinación. La actividad de LDH se cuantificó utilizando la metodología descrita por Berry et al. (1991), utilizando NADH (0.24 mM) y piruvato (9.76 mM) como sustratos y la absorbancia a 340 nm se cuantificó cada 15 seg durante 2 min en un espectrómetro DU 640 (Beckman, EUA). Asimismo, se realizó la determinación de la viabilidad de las células U937 recirculantes y estáticas en el sistema de perfusión, después de perfundirlas por 2 h utilizando el ensayo de azul de tripán. Cada 5 min se tomó una

alícuota de un ml para contar las células vivas. Las células se incubaron con una solución de azul de tripán 0.4% (Life tech, EUA) por 7 min y posteriormente se lavaron 3 veces con PBS por 1 min. Las células vivas y muertas se contaron en una cámara de Neubauer y se reportó el resultado en porcentaje con respecto al 100% de células U937 vivas al tiempo inicial.

#### Medición de la producción de óxido nítrico

Para evaluar la respuesta del endotelio a estímulos fisiológicos en nuestro modelo, se midió la concentración de NO en los medios de perfusión y en el sobrenadante de las células cultivadas. El NO se determinó utilizando un ensayo colorimétrico basado en la reacción de Griess. Se determinó la relación de nitritos/nitratos en el medio de perfusión y se cuantificó como una medida indirecta del óxido nítrico producido en respuesta a la activación de TNF- $\alpha$ . La ecuación de la curva se obtuvo por regresión de mínimos cuadrados y se utilizó para calcular los valores de concentración en las muestras. Una curva estándar se realizó con un rango de 5 a 5 nM de KNO<sub>3</sub>, y se obtuvo una regresión lineal  $R^2 = 0.997$ .

#### Determinación de citocinas por ensayo de ELISA

Se utilizaron venas estimuladas y no estimuladas con TNF- $\alpha$  perfundidas por 2 h, al terminar se lavó la vena por 10 min y se colocó medio RPMI nuevamente con y sin células U937 ( $1 \times 10^6$  cel/ml) recirculantes por 1 h, al terminar el tiempo se recolectaron los medios y se congelaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su utilización. Se utilizó el kit de citocinas humanas ELISA Ultrasensitive 10 panel plex (Invitrogen, EUA). Para la determinación de la concentración de citocinas se realizó una curva estándar para intrapolar los resultados de las muestras, como se recomienda en el kit. La concentración se reportó en pg/ml.

#### Ensayos de adhesión

La activación endotelial se determinó después de su activación con TNF- $\alpha$  en condiciones de flujo, determinando la adhesión de células monocíticas U937. La concentración de TNF- $\alpha$  seleccionada para utilizarse en los ensayos ex vivo se obtuvo de experimentos previos en los cuales se realizó una curva de concentración de TNF- $\alpha$ , desde 0.5 a 10 ng/ml, en un ensayo de adhesión in vitro de células U937 a las células HUVEC's. Siendo 5ng/ml la concentración con la más alta adhesión. Al comenzar los experimentos el sistema se lavó con 2% de detergente biológico Extran MA durante 10 min, después se lavó con etanol al 70% durante 10 min y, finalmente, el sistema se volvió a lavar con PBS estéril durante 10 min. Al iniciar el ensayo se utilizaron dos segmentos de 5 cm a partir de un solo cordón umbilical, cada uno los

cuales fueron colocados en los reservorios bajos. Un segmento se activo con 5 ng/ml de TNF- $\alpha$  en medio RPMI. El otro segmento de vena se perfundi3 con medio sin TNF- $\alpha$ . La velocidad de flujo se estableci3 a 1 ml/ml a 37 3C por 2h. Al termino de este tiempo las venas se lavaron con PBS durante 10 min. Las c3lulas U937 se marcaron con succinilimidil-ester-carboxi-fluoresce3na (CFSE). Aproximadamente  $1 \times 10^7$  c3lulas U937 se incubaron con 5 mM de CFSE en PBS suplementado con 0.5% de alb3mina de suero bovino a 37 3C durante 15 min. Posteriormente, las c3lulas se lavaron dos veces con medio RPMI y se centrifugaron durante 5 min a 700 x g. Las c3lulas se resuspendieron en medio completo y colocado en el dep3sito para la perfusi3n de las venas humanas durante 1 h. Despu3s de la perfusi3n, las venas se lavaron durante 10 min con PBS y se congelaron en isopentano fr3o para almacenarse a -70 3C hasta su corte por criostato (CM-18950 Leica Systems, USA) en rebanadas transversales de 7 micras de grosor. La adhesi3n celular se evalu3 al contar el numero de c3lulas en la superficie endotelial en im3genes de la luz del vaso reportadas por mm<sup>2</sup> en 25 campos independientes. La observaci3n se realizo en un microscopio epifluorescencia LSM-510, (Carl Zeiss, Jena, Alemania).

#### An3lisis de los datos

Los datos se presentan como medias  $\pm$  SD de cinco experimentos independientes realizados por triplicado. Las pruebas de One-Way ANOVA, seguido por el an3lisis de varianza de Tukey-Kramer se utilizaron para comparar entre las muestras. Un valor de p menor de 0.05 fue considerado estad3sticamente significativo.

## RESULTADOS

### Montaje del sistema de perfusi3n y evaluaci3n de la integridad de la vena umbilical en condiciones de flujo

El dise1o de nuestro sistema se basa en los modelos de perfusi3n hep3tica, pero fue adaptado al tama1o de las venas del cord3n umbilical humano y al volumen de medio empleado; el esquema en la figura 1A indica los componentes m3nimos que lo constituyen y el sentido del flujo a partir de una bomba perist3ltica. La figura 1B muestra el sistema de perfusi3n de la vena humana, el cual est3 constituido de dos dep3sitos que permiten la perfusi3n independiente de dos segmentos separados de cord3n umbilical. Un controlador de flujo permite controlar el paso del medio que viene de los reservorios altos. Los reservorios bajos conservan a 37 3C al cord3n y un sistema de venoclisis est3ril sirve para la circulaci3n del medio.

La identificaci3n de la estructura de la vena perfundida para este sistema se evalu3 empleando la tinci3n de HE. La Figura 1C muestra im3genes representativas de HE donde se observan las tres capas consecutivas que constituyen una vena, como son la t3nica 3ntima (TI), la t3nica media (TM) y la t3nica adventicia (TA). Utilizando la

técnica de inmunofluorescencia (IF) se marcó al factor de von Willebrand, específico de células endoteliales (Figura 1D), los núcleos se observan en azul marcados con Hoechst, mientras que la presencia de células del musculo liso de la vena se visualizaron con el marcaje de beta sarcoglicanos teñidos en rojo Estos resultados mostraron que este modelo permite conservar la arquitectura vascular después de la perfusión, lo que es muy importante para los ensayos de adhesión posteriores.

Además de la arquitectura de la vena, se evaluó el daño celular por efecto del flujo, en venas perfundidas, ya sea estimuladas o no con TNF- $\alpha$ . Los resultados presentados en la Tabla 1, demuestran que solamente un 15% de LDH es liberada por las venas perfundidas cuando no están activadas, este valor fue semejante al obtenido para los cultivos de células HUVEC's sin perfusión. Sin embargo, estos valores fueron mayores a los obtenidos por las venas activadas con TNF- $\alpha$  y a los cultivos no perfundidos, pero que si fueron activados. Lo anterior muestra que la perfusión no afecta la integridad de la membrana del endotelio vascular, mientras que el endotelio activado resiste mejor al daño celular. En los experimentos donde se recircularon las células U937 a las venas perfundidas o a los cultivos HUVEC's sin activar (tercera y cuarta filas), se incrementó el nivel LDH en el medio aumentando a 38.2% y 11.4 % respectivamente. Los resultados de las venas y HUVEC's activadas fueron muy similares, por lo que la diferencia en la muerte celular solo se encontró en presencia de las células U937 pero no por la activación de los endotelios. El aumento en la liberación de LDH en los medios donde se recircularon células U937 se puede interpretar como el daño de estas células por la perfusión y no por el daño al endotelio. Por esto, y para disminuir el daño celular y comprobar la viabilidad de las células U937 por efecto de la circulación, se redujo el número de veces que las células pasan a través de la bomba peristáltica de 4 a 2 veces. Así mismo, se aumentó el volumen del medio de perfusión de 9 a 12 ml, para evitar cambios en el volumen del flujo que pasa por la vena en cada vuelta completa. Estos cambios redujeron la integridad y muerte de las células U937, manteniendo la viabilidad celular por encima de 90 % (Figura 2) después de 2.5 h. Estas condiciones se utilizaron para los ensayos de adhesión.

Medición de la respuesta endotelial en condiciones de flujo:

Determinación indirecta de la producción de óxido nítrico (NO)

Para verificar si el endotelio vascular era capaz de responder a los estímulos inflamatorios, se cuantificó la producción de NO y de citocinas pro-inflamatorias. La curva estandar para la cuantificación de nitritos/nitratos presentó un rango lineal entre 5 y 50  $\mu$ M de KNO<sub>3</sub>, con un coeficiente de regresión lineal  $r^2 = 0.997$ . El índice de la concentración basal de nitritos/nitratos en el medio de la vena perfundida fue  $23.24 \pm 6.7$ . El medio de perfusión de las venas tratadas con 5 ng/ml de TNF- $\alpha$  mostraron un aumento significativo del 50 % ( $p < 0.05$ ) ya que fue de  $39.27 \pm 4.1$ . Así

mismo, se cuantificó la producción de citocinas inflamatorias en condiciones de flujo de las venas humanas con y sin TNF- $\alpha$ , y en presencia o ausencia de células U937 por 2 h de activación y una hora de circulación de células U937. El análisis de citocinas por ELISA en el medio de perfusión de venas activadas mostró un aumento significativo de en pg/ml en la producción de mayores niveles de TNF- $\alpha$ , así como IL-4, GM-CSF, IL-6 e IL-8 con respecto a las venas no estimuladas en condiciones de flujo (Figura 3). Los medios de las venas estimuladas con TNF- $\alpha$  sin células circulantes liberaron IL-8 y TNF- $\alpha$  después de 2 horas de la activación de la vena y una hora adicional y sin células en comparación con las venas no estimuladas.

### Ensayo de adhesión celular

La adhesión se cuantificó evaluando a las células U937 sobre la superficie endotelial en la luz del vaso de venas tratadas y no tratadas con TNF- $\alpha$  (Figura 4). Los resultados mostraron un aumento significativo de 7.1 veces más células U937 adheridas a las venas perfundidas activadas con TNF- $\alpha$  ( $175.71 \pm 12.3$  cel/mm<sup>2</sup>) en comparación con las venas no activadas ( $15 \pm 6.9$  cel/mm<sup>2</sup>). Posteriormente también se activaron las venas por 0.5 y 1 hora, y se cuantificaron las células U937 después de 1 h de perfusión sin mostrar cambios significativos en la adhesión. Las venas activadas y no activadas con TNF- $\alpha$  durante 0.5, 1, 2 y 2.5 h se fijaron y se tiñeron por inmunofluorescencia para evaluar la expresión de ICAM-1. Los resultados se presentan en la Figura 5. Los cambios son visibles en presencia de ICAM-1 hasta las 2 h en el endotelio activado con respecto a las venas perfundidas sin la citocina y con los tratamientos a tiempos anteriores (datos no mostrados).

## DISCUSION

En este trabajo se desarrolló un nuevo sistema de perfusión ex vivo que simula las condiciones de flujo laminar y la presencia de flujo vascular, equivalente al que se encuentra en las vénulas humanas en un cordón umbilical. Es por ello, que nuestro primer objetivo fue la conservación de la viabilidad del tejido, así como la estructura vascular y arquitectura del sistema. Nuestros resultados muestran que el porcentaje de viabilidad de la vena umbilical se mantiene dentro de los rangos reportados en otros modelos de perfusión donde emplean venas safenosas y de aorta (21-22), en los cuales han reportado que se preserva la viabilidad celular desde 1 h hasta cinco días, manteniendo la funcionalidad del endotelio. Para el objetivo de este trabajo solo fue necesario mantener la viabilidad e integridad del tejido por un lapso de tiempo no mayor a 5 h, sin embargo el modelo permite aumentar el tiempo para realizar otro tipo

de ensayos. Para ello, solo habría que cerrar herméticamente los reservorios, evitando así una posible contaminación del medio que pasa por la vena.

El uso del modelo de vena umbilical permite analizar un tejido humano, que por estar vivo, se acerca más al contexto biológico y provee un modelo para la realización de estudios experimentales de enfermedades humanas. En particular para procesos agudos, en intervalos de tiempo que van desde minutos hasta horas o días. En contraste, los modelos murinos para estudios de inflamación crónica realizan estudios con rangos de hasta meses, sin embargo, tienen la desventaja de utilizar animales genéticamente o fisiológicamente modificados (inmunodeprimidos, inmunodeficientes o transgénicos) y no reproducen los mecanismos celulares y moleculares que suceden en vasos humanos. La vena umbilical conserva una morfología diferenciada, como la que tienen las venas pequeñas o la aorta de adultos, y desde el punto de vista funcional, responde a los mismos factores que las venas y las arterias como estímulos biomecánicos o inflamatorios (23,24). Esto significa que también expresan moléculas de superficie características del endotelio y responden ante estímulos mecánicos como la presión, el tipo de flujo y fuerzas de rozamiento.

Como se mencionó al principio, las fuerzas hemodinámicas son esenciales para la adhesión leucocitaria, es por ello que recientemente se ha prestado atención a la presión y a las fuerzas de rozamiento, ya que ambos pueden modular diversos aspectos de la fisiología y la morfología de las células endoteliales (25,26). Estas fuerzas, junto con la velocidad y el tipo de flujo del medio, pueden regular también la expresión de diversos genes relacionados con la coagulación, la vasodilatación, y la inflamación, afectando el fenotipo endotelial de manera local o sistémica. En general es poco común encontrar estudios en modelos estáticos que empleen este tipo de parámetros durante el estudio de la activación endotelial en el proceso inflamatorio, como los cultivos de células endoteliales obtenidas de cordón umbilical o HUVEC's (27-29), y solo en los últimos años se han empezado a considerar para estudiar la activación endotelial y la adhesividad de leucocitos (30,31).

El modelo que presentamos aquí, responde a estímulos que afectan la vaso dilatación y la vaso constricción, como es la activación de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que se activa por TNF- $\alpha$  en durante proceso inflamatorio. De la misma manera, el endotelio activado responde a través de la vía de señalización del factor de transcripción NF $\kappa$ B para inducir la producción de citocinas y quimiocinas como el propio TNF- $\alpha$  o INF $\gamma$ , IL1- $\beta$ , IL8, MIP-1 $\alpha$ , entre otras por la activación de TNF- $\alpha$  como se demostró en las venas perfundidas en nuestro modelo.

Se sabe que las células monocíticas U937 solo se adhieren al endotelio bajo previa activación, por lo que el estímulo para ello dependerá de factores del microambiente (vena) que faciliten su adhesividad. Por lo que el contar con un modelo en el cual se puedan fijar las condiciones hemodinámicas para mantener el flujo, permite analizar si éste facilita o restringe la activación del endotelio; y no solo por el estímulo químico o

celular que genera, sino incluso por la presencia del estrés reológico sobre las células circulantes empleadas.

En nuestro modelo ex-vivo, se logró incrementar significativamente la capacidad adhesiva del endotelio para unir a las células monocíticas U937, a un flujo de 1 ml/min después de la activación con TNF- $\alpha$ , lo cual sugiere fuertemente que se activa la vía clásica de inflamación controlada por NF $\kappa$ B, que ya ha sido demostrada in vitro. Sin embargo, es posible que participen otras vías, ya que el flujo puede inducir cambios en el endotelio que podrían activar vías alternativas como la de AP-1 o STAT-3; ello puesto que observamos una menor adhesión en comparación con ensayos en monocapas estáticos, pero una mayor cantidad de células monocíticas adheridas entre ellas y a su vez a células endoteliales. El haber encontrado una menor adhesión de células U937 al endotelio, a diferencia de los ensayos en monocapas, puede deberse al retraso en el contacto entre las diferentes células adherentes, si no a el retardo en la unión del TNF- $\alpha$  recombinante con su receptor de superficie, debido a la presencia del flujo vascular; sin embargo el haber encontrado un incremento en la citocina IL8 en presencia de células U937, sugiere la activación de estas células para favorecer la adhesión, siendo la vía de STAT-3 una de las que podría activarse (6,32,33).

Además de lo que se ha mencionado hasta este momento, se sabe que otro factor importante para la adhesión de monocitos, macrófagos, linfocitos o polimorfonucleares circulantes en las venas durante la inflamación, es la proximidad con el endotelio activado en el sitio de daño o enfermedad y su interacción física con moléculas de adhesión. En un inicio se lleva a cabo una adhesión laxa al endotelio gracias a moléculas como las selectinas, pero conforme pasa el tiempo, la expresión de moléculas de la familia de las inmunoglobulinas como VCAM-1, PECAM-1 e ICAM-1, permite una adhesión más firme que favorece la extravasación leucocitaria. Sin embargo, aún no se conoce el efecto del flujo vascular sobre el microambiente inflamatorio de venas humanas, ya que no se sabe si la expresión de dichas proteínas y la adhesión requiera de menos o más moléculas involucradas, o si estos eventos suceden por activación de las mismas vías de señalización reportadas en diversos modelos in vitro o murinos. Esto implica que los tiempos en los cuales inicia y termina la adhesión leucocitaria a la superficie endotelial tampoco tienen que ser los mismos que suceden en modelos de flujo de monocapas que no reproducen la morfología endotelial de los vasos (34,35).

En este trabajo, se marcó a la molécula de adhesión ICAM-1, en muestras de vasos activados con célula adheridas, y se observó una mayor presencia de ICAM-1 en el endotelio activado; sin embargo, esta molécula no siempre se asocio a las zonas donde estaban las células adheridas. La expresión de ICAM-1 en las distintas zonas del endotelio donde no se observan las células U937 adheridas, puede ser un indicador de que en presencia del flujo vascular la activación endotelial pueda darse en células que puedan estar llegar a estar en contacto con las células monocíticas, o bien en aquellas que responden a cambios en el tipo de flujo (de vascular a turbulento), como se ha reportado en modelos murinos (36-38). Sería muy interesante determinar el

cambio en la expresión de ICAM-1 durante la adhesión de monocitos U937 en una curva temporal (0.5, 1, 2, 3, 6 horas), así como la expresión de otras moléculas de adhesión como selectina E y VCAM-1, para conocer como responden estas moléculas a los cambios de flujo durante la adhesión laxa y/o firme en el endotelio ex vivo.

Finalmente es pertinente mencionar que hemos logrado establecer un sistema ex vivo de vena humana umbilical humana que mantiene la integridad y viabilidad del endotelio, que podría ser empleado para analizar otras moléculas de adhesión celular relacionadas con la activación endotelial de otras moléculas, como plaquetas, para evaluar cambios en la adhesividad del endotelio en condiciones hemodinámicas.

## AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dr. Armando Luna-López de Instituto Nacional de Geriátría, por sus comentarios sobre el manuscrito. Gracias a Lic. IBB Miguel Tapia Rodríguez, de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

A. López-Macay pertenece al Programa de Doctorado de Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), además de que ha sido apoyado por una beca del CONACyT para estudios de posgrado (200845).

## REFERENCIAS

1. Phillipson M, Heit B, Colarusso P. et. al. Intraluminal crawling of neutrophils to migration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *JEM*. 2006;203: 2569-2575.
2. Tisato V, Zauli G, Voltan R et. al., Endothelial Cells Obtained from Patients Affected by Chronic Venous Disease Exhibit a Pro-Inflammatory Phenotype. *PlosOne*. 2012;7: e39543
3. Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *PNAS*. 2008;105:1516-1521.
4. Luscinskas FW. Neutrophil CD44 rafts and rolls. *Blood*. 2010;116:314-315.
5. Ballantyne CM, Ley K, Dunne J L, et. al. Inflammation Leukocyte Rolling in TNF- $\alpha$ -Induced Adhesion Molecule-1 to Mediate Slow Mac-1, but Not LFA-1, Uses, *J Immunol* 2003; 171:6105-6111.
6. Fukuda S and Schmid-Schonbein G W. Regulation of CD18 expression on neutrophils in response to fluid shear stress. *PNAS*;100:13152–13157.
7. Rautou PE, Leroyer AS, Ramkhelawon B, et. al, Microparticles From Human Atherosclerotic Plaques Promote Endothelial ICAM-1. *Circ Res*. 2011;108:335-343.
8. Lin K, Hsu PP, Chen B P, et. al. Molecular mechanism of endothelial growth arrest by laminar shear stress. *PNAS*. 2000,97: 9385–9389.
9. Rhee WJ, Nia CW, Kyung ZZ et. al. HuR regulates the expression of stress-sensitive genes and mediates inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells *PNAS*. 2010;107: 6858–6863.
10. Shive MS, Salloum ML, Anderson JM. Shear stress-induced apoptosis of adherent neutrophils: A mechanism for persistence of cardiovascular device infections. *PNAS*. 2000;97:6710–6715.
11. Andersson ML, Karlsson PA, Svensson, EU, et. al. Differential global gene expression response patterns of human endothelium exposed to shear stress and intraluminal pressure. *J Vasc Res*. 2005; 42:441-452.
12. Kwon MC, Kong YY, Hwang IK, et. al. TNF-Related Activation-Induced Cytokine of ICAM-1 and VCAM-1 via TNF enhances leukocyte adhesiveness: Induction receptor-associated factor and protein kinase C-dependent NF- $\kappa$ B activation in endothelial cell. *J Immunol*. 2005; 175:531-540.
13. Basit A, Reutershan J, Morris MA. ICAM-1 and LFA-1 play critical roles in LPS-induced neutrophil recruitment into the alveolar space *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2006;291: L200–L207.

14. Burdick MM, Konstantopoulos K. Platelet-induced enhancement of LS174T colon carcinoma and THP-1 monocytoid cell adhesion to vascular endothelium under flow. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2004;287:C539-547.
15. Frommhold D, Kamphues A, Hepper I, Pruenster M. RAGE and ICAM-1 cooperate in mediating leukocyte recruitment during acute inflammation in vivo. *Blood.* 2011; 116: 841-849.
16. Kim I, Moon SO, Kim SH. Vascular endothelial growth factor activation in endothelial cells E-selectin through nuclear factor-kB adhesion molecule 1 (VCAM-1), and molecule 1 (ICAM-1), vascular cell expression of intercellular adhesion. *J Biol Chem.* 2001;276:7614-7620.
17. Ronald JA, Ionescu CV, Rogers KA, Sandig M. Differential regulation of transendothelial migration of THP-1 cells by ICAM-1/LFA-1 and VCAM-1/VLA-4. *J Leuko Biol.* 2001;70: 601-609.
18. Muro S, Wiewrodt R, Thomas A, Koniaris L. A novel endocytic pathway induced by clustering endothelial ICAM-1 or PECAM-1. *J Cell Sci.* 2003;116:1599-1609.
19. Vogel JR, Abounader, HS, Zeller K, Duelli R, Kuschinsky W. Parallel changes of blood flow and heterogeneity of capillary plasma perfusion in rat brains during hypocapnia. *Am J Physiol.* 1996;270:H1441-1445.
20. Vogel J, Kuschinsky W. Decreased heterogeneity of capillary plasma flow in the rat whisker-barrel cortex during functional hyperemia. *J Cereb Blood Flow Metab.*1996;16:1300-1306.
21. Saucy F, Probst H, Alonso F, Berard X, et. al. Ex vivo pulsatile perfusion of human saphenous veins induces intimal hyperplasia and increased levels of the plasminogen activator inhibitor 1. *Eur Surg Res.* 2010;45:50-59.
22. Dummler S, Eichhorn S, Tesche C, et. al. Pulsatile ex vivo perfusion of human saphenous vein grafts under controlled pressure conditions increases MMP-2 expression. *Biomed Eng Online.* 2011;10:62.
23. Montes-Sanchez D, Ventura JL, Mitre I, et. al. Glycosylated VCAM-1 isoforms revealed in 2D western blots of HUVECs treated with tumoral soluble factors of breast cancer cells. *BMC Chem Biol.* 2009;9:7.
24. Brenner W, Langer P, Oesch F, Edgell CJ, Wieser RJ. Tumor cell--endothelium adhesion in an artificial venule. *Anal Biochem.*1995;225:213-219.
25. Makkar RR, Eigler NL, Kaul S, et. al. Effects of clopidogrel, aspirin and combined therapy in a porcine ex vivo model of high-shear induced stent thrombosis. *Eur Heart J.* 1998;19:1538-1546.

26. Mavromatis K, Fukai T, Tate M, Chesler N. et. al. Early effects of arterial hemodynamic conditions on human saphenous veins perfused ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20:1889-1895.
27. Eichhorn ME, Ney L, Massberg S, Goetz AE. Platelet kinetics in the pulmonary microcirculation in vivo assessed by intravital microscopy. *J Vasc Res.* 2002;39:330-339.
28. Evensen L, Micklem DR, Blois A, Berge SV, et. al. Mural cell associated VEGF is required for organotypic vessel formation. *PLoS One.* 2009;4:e5798
29. Thacher TN, Silacci TP, Stergiopoulos N, da Silva RF. Autonomous effects of shear stress and cyclic circumferential stretch regarding endothelial dysfunction and oxidative stress: an ex vivo arterial model. *J Vasc Res.* 2010;47:336-345.
30. May P, Arrouvel P, Revol M, et.al. Detection of hemodynamic turbulence in experimental stenosis: an in vivo study in the rat carotid artery. *J Vasc Res.* 2002;39:21-29
31. Anwar MA, Shalhoub J, Lim CS, et. al. The effect of pressure-induced mechanical stretch on vascular wall differential gene expression. *J Vasc Res.* 2012;49:463-478.
32. Wang P, Zhu F, Lee N H and Konstantopoulos K, Shear-induced interleukin-6 synthesis in chondrocytes: roles of E prostanoic acid (EP) 2 and EP3 in cAMP/protein kinase A- and PI3-K/Akt-dependent NF-kappaB activation. *J Biol Chem.* 2010;285:24793-24804.
33. Surapisitchat JR , Hoefen J, Pi X, Yoshizumi M et. al. Fluid shear stress inhibits TNF- $\alpha$  activation of JNK but not ERK12 or p38 in human umbilical vein endothelial cells: Inhibitory crosstalk among MAPK family members. *PNAS.* 2001;98:6476–6481.
34. Schenkel A R, Mamdouh Zahra and Muller W A. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nature Immunol.* 2004;5:393-400.
35. Ploppa A, Kampmann M, Johannes T, et. al. Effects of different leukocyte subpopulations and flow conditions on leukocyte accumulation during reperfusion. *J Vasc Res.* 2012;49:169–180.
36. Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, et al. Biological stress response terminology. *Toxicol Appl Pharm.* 2007;222:122-128.
37. Crook MF, Southgate KM, Newby AC. Both ICAM-1- and VCAM-1-Integrin interactions are important in mediating monocyte adhesion to human saphenous vein. *J Vasc Res* 2001;38:551–559.

38. Burns MP, DePaola N. Flow-conditioned HUVECs support clustered leukocyte adhesion by coexpressing ICAM-1 and E-selectin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288:H194-H204.

#### PIES DE FIGURA

Figura 1. Sistema de perfusión de vena umbilical humana

- A. Esquema del sistema de trabajo, las flechas indican el sentido del flujo.
- B. Reservorios de vidrio para el medio y la vena. Las flechas indican el sitio donde se coloca la vena humana.
- C. Las venas se tiñeron con HE como se describe en material y métodos, para marca los componentes de las venas perfundidas. TA: túnica adventicia, TM: Túnica media, E: endotelio, TI:Túnica intima.
- D. Se empleó la técnica de inmunofluorescencia para marcar al factor de von Willebrand que es específico de células endoteliales. Los núcleos se marcaron con Hoechst (azul), y las células del musculo liso de la vena se visualizaron con el marcaje de beta sarcoglicanos (rojo).

Figura 2. Viabilidad de células U937 perfundidas

Se recircularon células U937 a 1 ml/min durante 140 min por el sistema, 2 y 4 veces, o bien se mantuvieron en los reservorios sin perfusión. Posteriormente se tomaron alícuotas para determinar la viabilidad por su tinción con azul de Trypan. Las barras muestran la desviación estándar para cada muestra. (ANOVA  $p < 0.05$ )

Figura 3. Ensayo multiplex para citocinas producidas por las venas activadas.

Se indican las venas tratadas por perfusión de TNF por dos horas y las venas con posterior circulación de células U937 por una hora más. Después de cada tratamiento las venas se lavaron con PBS 10 min. Los asteriscos \* indican la significancia con respecto a la presencia de esa citocina en venas no estimuladas y sin células circulantes. El doble asterisco \*\* indica la significancia de la vena no activada con células con respecto a la no activada y sin células U937  $p < 0.05$

Figura 4. Ensayo de adhesión y cuantificación de células U937 sobre el endotelio vascular.

A y C muestran la luz del vaso en corte de vena humana sin estímulo con TNF- $\alpha$ . B y D muestra un aumento de las imágenes anteriores para evidenciar a las células U937 sobre la superficie endotelial. Las flechas indican a las células U937 en color verde.

Figura 5. Expresión de ICAM-1 en la venas activadas con TNF- $\alpha$  en presencia o ausencia de flujo.

La figura muestra las vena cortadas transversalmente, las cuales se marcaron con anti-icam-1 y con anti raton Alexa-488. La barra indica la distancia en micrometros = 400  $\mu$ m

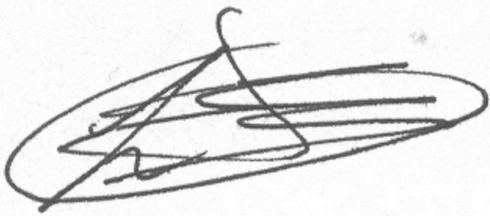
Tipo Celular % de LDH liberada sin estimulación de TNF- $\alpha$  % de LDH liberada en células estimuladas con TNF- $\alpha$

HUVEC's	15.4 $\pm$ 0.1	3.3 $\pm$ 0.1	*
Vena umbilical humana	14.7 $\pm$ 6.1	5.87 $\pm$ 0.9	*
HUVEC's+U937	11.4 $\pm$ 3.3	11.2 $\pm$ 2.1	
Vena umbilical humana +U937	38.2 $\pm$ 2.4	38.1 $\pm$ 2.2	**

Tabla 1. Determinación de la integridad celular por liberación de LDH de venas humanas perfundidas en comparación con los cultivos celulares sin perfusión.

Se indica el porcentaje de LDH liberado con respecto a un 100% de cada tipo celular lisados con Triton X-100. Se muestran la desviación estándar de cada resultado. Los asteriscos (\*) muestran los datos significativos con respecto a su control sin TNF. El doble asterisco indica diferencias significativas con respecto a las células U937 no perfundidas (Anova  $p < 0.05$ ).

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología Experimental de la División de Ciencias biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Estudio de la activación endotelial inducida por TNF- $\alpha$  en un modelo ex vivo de venas humanas en presencia de fuerzas hemodinámicas" que presentó en alumno Ambar López Macay el día 2 de Marzo de 2015.



PRESIDENTE

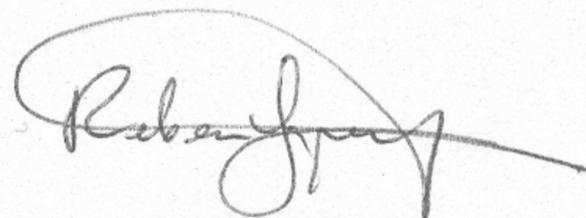
**Dr. Luis Enrique Gómez Quiróz**

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana

Iztapalapa

legq@xanum.uam.mx



SECRETARIA

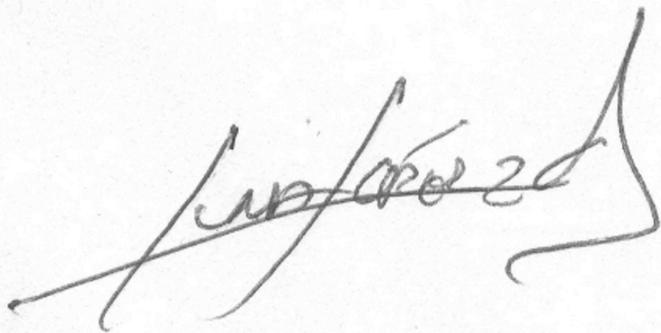
**Dra. Rebeca López Marure**

Departamento de Farmacología

Instituto Nacional de Cardiología,

Ignacio Chávez

rlmarure@yahoo.com.mx



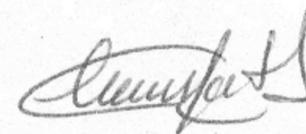
VOCAL

**Dr. Armando Luna López**

Departamento de Investigación Básica

Instituto Nacional de Geriatria

allbioexp@yahoo.com



VOCAL

**Dra. Rocío Alcántara Hernández**

Departamento Biología Celular y del

Desarrollo, IFC. UNAM

ralcanta@correo.ifc.unam.mx