

ARTICULO ORIGINAL

Ricardo Amaru*
 Julio Silvestre**
 Gina Torres**
 Hortensia Miguez**
 Rosario Peñaloza**
 Rubén Araoz***
 Heriberto Cuevas****

Primera experiencia en aislamiento de células endoteliales humanas en Bolivia

RESUMEN

Introducción

Las células endoteliales pueden proveer información valiosa con respecto a muchos procesos patológicos como la aterosclerosis, inflamación, neoplasia y angiogénesis. Este trabajo describe la primera experiencia boliviana en el aislamiento y cultivo de células endoteliales humanas derivadas de la vena umbilical (HUVEC).

Métodos

Un segmento largo de cordón umbilical se utilizó para el aislamiento y fue tratado por digestión con colagenasa. Las células endoteliales fueron desprendidas de la íntima y posteriormente cultivadas en medio de cultivo M199 y suero fetal bovino. Técnicas morfológicas, inmunohistoquímicas y de citometría de flujo fueron utilizadas para identificar estas células.

Resultados

Se examinaron las células endoteliales obtenidas por análisis morfológico e inmunohistoquímico. El marcaje con CD34 fue positivo para más del 90% de las células obtenidas por digestión con colagenasa analizado por citometría de flujo.

Conclusión

Se logró aislar y cultivar HUVEC de manera exitosa. Una gran variedad de experimentos y aplicaciones en ciencias biomédicas pueden ser potencialmente factibles.

Palabras clave

Rev. Cuadernos 2005;50(2):49-54 Células endoteliales, aislamiento, cultivo, citometría de flujo.

ABSTRACT

Introduction

Endothelial cell study yields valuable information concerning many pathologic processes such as atherosclerosis, inflammation, neoplasia and angiogenesis. This paper describes the first Bolivian experience in isolation and culture of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC).

Methods

A long segment of the umbilical cord was processed by collagenase digestion. Endothelial cells were detached from intima and further cultured using M199 culture media. Morphologic, immunochemistry and flow cytometry approaches were used to identify these cells.

Results

Morphologic and immunochemistry analysis of the pool of obtained cells were positive for HUVEC. CD34 staining was positive in more than 90% of the cells obtained by collagenase digestion as assessed by flow cytometry.

Conclusion

HUVEC were successfully isolated for the first time in Bolivia. A great deal of further experiments and applications in biomedical sciences is possible .

Key words

Endothelial cells, isolation, culture, flow cytometry.

* Jefe Unidad de Biología Celular Fac. Med. UMSA

** Unidad de Biología Celular, Dpto. de Ciencias Funcionales, Fac. Med. UMSA

*** Ginecólogo Obstetra Hospital de la Mujer

**** Catedra de Bioquímica, Dpto. de Ciencias Funcionales, Fac. Med. UMSA

INTRODUCCIÓN

Dentro de los últimos años, avances en biología celular y molecular han determinado que las células endoteliales son metabólicamente muy activas y están involucrados en una serie de procesos patológicos. Estas células han sido consideradas como el órgano más importante y extenso de todo el cuerpo humano. Todo el endotelio en un ser humano pesa aproximadamente 1 kg y cubre una superficie de 4000 - 7000 m²; si se juntase cada célula en una sola hilera, se podría envolver toda la circunferencia de la tierra 4 veces ⁽¹⁾. Muchas patologías tienen denominadores comunes que hacen de estas células excepcionales blancos para el diagnóstico y fines terapéuticos ^(2,3,4). Las alteraciones en su función han sido caracterizadas y se ha acuñado el término de disfunción endotelial para nombrar a estas alteraciones ^(3,4,5).

La proliferación e inhibición del crecimiento de las células endoteliales han sido implicadas en muchas enfermedades como la preeclampsia, aterosclerosis, cáncer, retinopatía del prematuro, neoplasias, enfermedades hematológicas, infecciones, sepsis, asma, hipertensión pulmonar, enfermedad ulcerosa péptica, insuficiencia renal, diabetes, accidente vasculoencefálico, rechazo de trasplantes como algunos ejemplos ^(1,3,4,12,13). En estas enfermedades están involucrados procesos de angiogénesis, inflamación y neoplasia como comunes denominadores ⁽¹⁾.

El estudio de las células endoteliales se ha facilitado de gran manera con el aislamiento de células a partir de la capa íntima de la vena umbilical. De esta manera han recibido el nombre de HUVEC del anglosajón "human umbilical vein endothelial cells" o células endoteliales humanas de cordón umbilical. Se ha propuesto el cultivo de estas células como un modelo para estudiar la fisiología y fisiopatología de nuestra patología regional (3600 m.s.n.m.). Por otra parte, se ha reconocido a la vena umbilical como sitio ideal de extracción de estas células, debido a que esta vena no tiene colaterales, tiene una gran superficie relativa, es fácilmente accesible y se puede obtener tejido vivo rápidamente ⁽⁶⁾.

El aislamiento de células endoteliales en la historia de la medicina fue en sus inicios difícil, debido a que las técnicas de extracción iniciales utilizaban a la tripsina como enzima para despegar las células de su lecho, dañando las células e inhibiendo su crecimiento. Se han hecho avances significativos en su extracción con la introducción de la colagenasa para mejorar el conteo de células endoteliales viables.

Durante los últimos 20 años se han estandarizado las técnicas de extracción y cultivo, haciendo de este método uno de los más fiables para la obtención de células endoteliales. Además se avanzó en la obtención de medios de cultivo y de enriquecimiento, minimizando el riesgo de contaminación de estos ⁽²⁾. Por otra parte, avances en cuanto a métodos de reconocimiento inmunofenotípico y en el campo de la microscopia de contraste de fase y electrónica han hecho posible la identificación de las características de las células endoteliales ⁽⁶⁾.

En el presente reporte se consideran los métodos y resultados experimentales que concluyeron en el aislamiento de células endoteliales (HUVEC) por primera vez en Bolivia.

MÉTODOS

Los métodos utilizados fueron recopilados a partir de trabajos previamente publicados, con técnicas básicas ^(2,6-11)

1. Aislamiento de células endoteliales

Materiales utilizados:

- M199 (Medio de cultivo M199 Sigma, St. Louis, USA)

Se utilizó el medio de cultivo M199 (con glutamina al 2 mmol/L) suplementado con suero fetal bovino (al 10% en caso de mantenimiento de colonias o la 20-30% en caso de crecimiento de colonias), 100 U/mL de penicilina y 50 µg/mL de gentamicina.

- PBS estéril
- Tripsina 0,25%+ EDTA 0,05%
- Colagenasa

Preparación - Colagenasa: Se disolvió colagenasa A en una concentración de 22 U/100 mL en buffer de Hanks-Wallace (Na Cl: 136,89 mM; KCl: 5,36 mM; KH₂PO₄: 0,44 mM; MgSO₄·7H₂O: 0,81 mM; Na₂HPO₄·12 H₂O: 0,41 mM; CaCl₂·2H₂O: 1,7 mM; NaHCO₃: 11,6 mM; Glucosa: 5,55 mM). Se disolvió esta solución por 10 min (oscuridad) en agitación a tº ambiente). Primero filtramos en 0,45 µm y posteriormente en 0,22 µm. Se alicuotó y almaceno a -20°C.

Buffer de transporte 10X (BT): Na Cl (1,4M), Na₂HPO₄ (5,2mM), KH₂PO₄ (1,5mM), Glucosa (110 mM), Agua destilada. Se ajustó el pH a 6,5 antes de filtrar en 0,22 µm. El buffer de transporte (10X) fue alicuotado en frascos de 50 mL y almacenado a -20°C. Antes de usar el BT diluimos 10X más 6x10 U/mL estreptomycin y 10 U/mL penicilina G sódica en agua destilada.

Se distribuyó 80 mL de BT (1X) en frascos estériles de 200 mL y almacenar a 4°C antes de usar (máximo 1 semana).

El cordón (de por lo menos 20 cm.), fue separado de la placenta proveniente de una embarazada con controles prenatales normales y con un parto normal en condiciones asépticas y llevado al laboratorio en un frasco que contenía medio de transporte. La muestra fue procesada en un tiempo no mayor a 3 horas después de su obtención. Todas las manipulaciones se realizaron en condiciones de esterilidad bajo campana de flujo laminar.

Seguidamente fueron cortadas todas las áreas clampeadas del cordón. Después se identificó la vena umbilical la cual fue canalizada y obturada en un extremo.

La vena fue perfundida con medio M199, con una jeringa de 20 mL para lavar los restos de sangre. Todo el medio fue evacuado, después se obturó el otro extremo del cordón, y el aire contenido en la vena se succionó con otra jeringa de 20 mL. Posteriormente la vena fue llenada con colagenasa (10-12 mL). El cordón con las jeringas mantenidas en cada extremo fue transferido a un frasco que contenía buffer de transporte y luego fue incubado en baño María a 37 °C durante 20 minutos.

Una vez finalizado el tiempo de incubación, se retiró el cordón del frasco y se realizó un masaje suave con la yema de los dedos para facilitar el desprendimiento de las células endoteliales del lecho vascular tratado con colagenasa. Seguidamente se perfundió la vena por un extremo con 20mL de M199 suplementado con 20% SFB y se recolectó el efluente por un extremo en 5 tubos Falcon (BD Laboratories, Los Angeles, USA) que previamente contenían 2 mL de M199+SFB 20%.

Posteriormente se obtuvieron las células HUVEC por centrifugación por 5 min. a 1500 rpm. El sobrenadante fue descartado y las HUVEC fueron resuspendidas en 5 mL de medio de cultivo fresco M199+ SFB 20%.

2. Cultivo primario

Se deben proveer condiciones estándares de cultivo a 37 °C con 5% de CO₂ y 95% de aire ambiente. Se dispuso de una alícuota primaria mínima de 3x10⁵ células para el cultivo. La técnica de obtención descrita previamente da una alícuota mayor a 1x10⁶ células. La suspensión de HUVEC fue incubada en frascos Roux de 25 cm² (tratadas previamente con SFB al 1 % diluido en M199)

1. Se suspendió una solución de 1-2 x 10⁶ células en 4 mL de medio con buffer (considerar utilizar buffer) en un frasco de cultivo (caja Roux) de 25 cm².
2. Se aspiró el sobrenadante después de 12 Hrs

de cultivo con las condiciones descritas.

3. El medio de cultivo fue reemplazado a las 24 Hrs., luego cada 2 días hasta llegar a la confluencia.

Después de 6-10 días se observan colonias de células endoteliales que crecieron en una sola capa.

Se desprendieron las células de la monocapa celular de la caja de cultivo Roux utilizando una solución de tripsina al 0.25% y EDTA al 0.05% por 2-3 minutos, tiempo suficiente para desprender 60-80% de las células. Las células obtenidas pueden ser centrifugadas en una solución de medio M199-suero fetal bovino al 30% (10 volúmenes) y nuevamente fueron resuspendidas en M199-suero fetal bovino al 10% para subcultivos.

3. Pruebas de identificación (citología, inmunohistoquímica y citometría de flujo)

Se realizó la identificación morfológica de las HUVEC mediante tinción May Grundwald -Giemsa, según la técnica establecida y extensamente difundida.

Para la identificación de las HUVEC por **Inmunohistoquímica**, se utilizó la técnica de APAAP (Anti- fosfatasa alcalina Anti- fosfatasa).

Se marcaron las células con CD34 este anticuerpo monoclonal está presente en las células precursoras hematopoyéticas, células endoteliales y en algunas leucemias inmaduras. Luego se añade un segundo anticuerpo (Polyclonal Rabbit anti- mouse immunoglobulins DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Después se colocó APAAP (mouse monoclonal DakoCytomation, Glostrup, Denmark) inmunoglobulinas de ratón unidas a fosfatasa alcalina. Seguidamente se añadió un sustrato específico para la fosfatasa alcalina formando un precipitado de color rojo identificando el antígeno. Para la coloración se utilizó Fast Red Violet (SIGMA, St Louis, USA) y para la contracoloración Hematoxilina de Gill (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, USA). Las células positivas se observan rodeadas de un color rojo brillante, la reacción se considera positiva para un antígeno determinado cuando más del 30% da una reacción positiva.

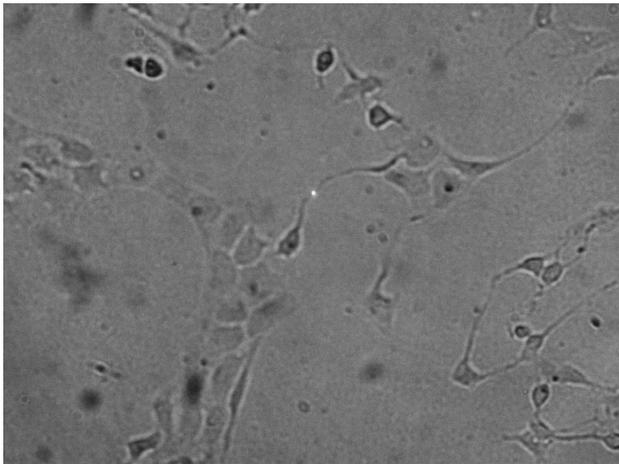
La inmunotipificación fue realizada por citometría de Flujo (Becton Dickinson). Este método permite identificar el número de células positivas para el anticuerpo seleccionado. Después de obtenidas las células éstas fueron marcadas con 10 µl de

CD34 durante 30 minutos a 4°C, seguidamente se realizó un lavado con 3 mL de PBS. Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante. Luego se marcó con 5 µl de mouse inmunoglobulins/FITC Goat F(ab)2 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark) durante 30 minutos a 4°C, seguidamente se realizó un lavado con 3 mL de PBS. Se centrifugó a 1500 rpm durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en 0,5 mL de PBS. Posteriormente las células fueron analizadas según protocolo de citometría de flujo de Becton Dickinson. Los resultados obtenidos fueron evaluados con el paquete PAINT A GATE.

RESULTADOS

Los criterios de identificación morfológica fueron positivos para células endoteliales. Su tamaño varía entre 20-50 µm Figura N° 1. Por lo general carecen de gránulos visibles y son pleomórficos. En su condición de integrantes de la íntima del vaso sanguíneo son planas y su unión a otras células endoteliales por medio de uniones estrechas garantiza la impermeabilidad del vaso en condiciones fisiológicas. Entre otras características, las HUVEC tienen un núcleo pequeño, ligera basofilia citoplasmática. En cultivo, su forma varía aún más, pudiendo presentar largos procesos citoplasmáticos tal como lo muestra la Figura N° 1.

Figura 1: Morfología de células HUVEC en medio líquido M 199



Se utilizó CD34 como marcador de las HUVEC obtenidas para inmunohistoquímica. Se ha logrado teñir intensamente a estas células Figura N° 2. Tal como se argumenta en la discusión, las células endoteliales son positivas para este anticuerpo.

Por citometría de flujo, las células endoteliales

fueron también positivas para CD34 en más del 90% del conjunto de células obtenidas Figura N°3.

Figura N° 2: Células HUVEC marcadas con CD34 por inmunocitoquímica, con la técnica de APAAP (Anti- fosfatasa alcalina Anti- fosfatasa).

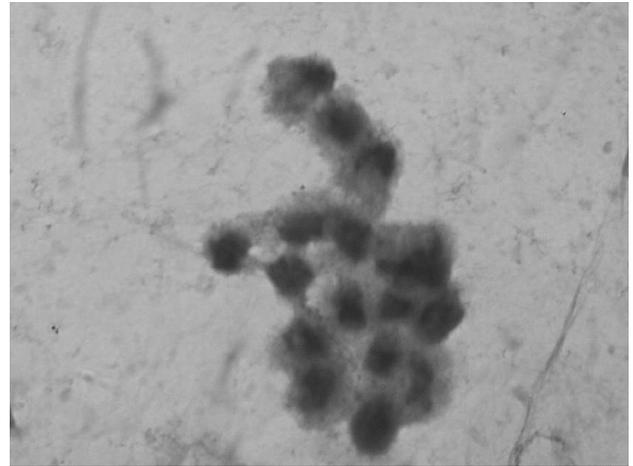
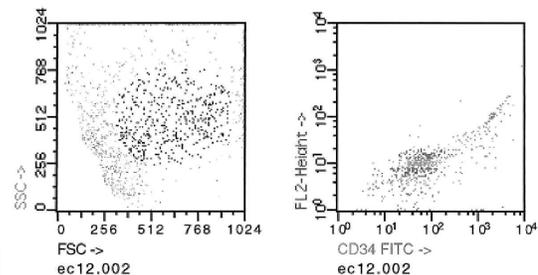


Figura N° 3: Células HUVEC marcadas con CD34 por citometría de flujo, las células endoteliales son positivas para CD34 en más del 90% del conjunto de células obtenidas.

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRES
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FUNCIONALES
UNIDAD DE BIOLOGIA CELULAR

ESTUDIO DE INMUNOFENOTIPO

NOMBRE: HUVEC TIEMPO: 3 horas
MUESTRA: Cordon umbilical FECHA: Mayo 25, 2005
RESPONSABLES: Torres; Silvestre INSTITUCION: U. Biología Celular



DISCUSIÓN

El aislamiento de células endoteliales es un precioso método de biología celular para la comprensión de una serie de procesos patológicos en la que estas células juegan un papel importante. Desde la década del 70 se ha perfeccionado la técnica, comprendiendo la biología y purificación como los medios de cultivo ideales para estas células (2). Definitivamente el estudio de estas células en nuestro medio se constituye en un modelo experimental in vitro efectivo y muy

preciso para la comprensión de la fisiopatología de las enfermedades prevalentes en Bolivia y en especial en ciudades de altura como La Paz.

Los primeros reportes sobre el aislamiento de HUVEC tuvieron muchas desventajas como la gran mortalidad de estas células por los procedimientos de aislamiento por desprendimiento mecánico. El uso de colagenasa en este procedimiento selectivamente degrada la matriz extracelular a la que las HUVEC se hallan unidas, con lo cual se reduce el daño a las HUVEC al mínimo y se permite la supervivencia de un gran porcentaje de ellas. Los primeros investigadores tuvieron que enfrentar numerosos errores en el cultivo, como por ejemplo contaminación de los medios con *Mycoplasma sp.* y las exigencias nutricionales altas ^(2,6). Estos inconvenientes han sido resueltos por la elaboración de medio M-199 y métodos de purificación y esterilización cada vez más precisos.

Cuando se establecieron métodos de cultivo satisfactorios para los HUVEC, dificultades técnicas surgieron para llegar a la confluencia en el tiempo establecido y la falta de proliferación celular. La suplementación con suero bovino fetal a altas dosis (20%) ha permitido el crecimiento de estas células. Algunos protocolos han utilizado suero fetal humano, con mejores resultados; sin embargo la dificultad de estandarización de este procedimiento ha limitado su uso en otros protocolos. Para estas contingencias algunos protocolos de cultivo de HUVEC modernos abogan por el uso de suplementos de crecimiento de células endoteliales o también el factor de crecimiento endotelial (EGF) ⁽⁶⁻¹¹⁾. Sin embargo, en el presente protocolo no se hace el uso de estos suplementos de crecimiento.

Nuestros cultivos no han llegado a la confluencia completa. No se han utilizado factores de crecimiento que se han discutido previamente, sin embargo aproximadamente sólo el 20% del espacio disponible en las cajas Roux no fue ocupado por las células. Es posible que nuestros cultivos no hayan sido completamente de células endoteliales, porque según criterios morfológicos no todas las células tenían la forma característica. En este sentido el tiempo de aplicación de la colagenasa en el cordón umbilical es muy importante, ya que a mayor tiempo mayor riesgo de contaminar la muestra con fibroblastos y aún perforar la vena umbilical de manera enzimática. Hemos utilizado en este protocolo una concentración de 1 mg/mL (durante 20 minutos), siendo esta la concentración más baja a ser utilizada. Otros protocolos utilizan concentraciones entre 1-2 mg/mL con menor tiempo de exposición (aproximadamente 7 minutos) ⁽⁸⁾.

Las células endoteliales pueden ser identificadas basándose en criterios morfológicos precisos en microscopia electrónica (artefacto que carecemos), como los cuerpos de Weibel-Palade, a manera de organelos intracitoplasmáticos con gran cantidad de CD62e en su membrana ⁽⁶⁾. Sin embargo, existen criterios inmunológicos como la presencia de CD de superficie, muy específicos. Entre estos están el CD62e, ICAM, VECAM, y otros ⁽⁸⁾, aplicados por métodos de inmunocitoquímica o citometría de flujo como en nuestro caso. Lo que llamó la atención es la gran variabilidad en tamaño y granularidad cuando las células fueron desprendidas de la caja Roux. Las diferencias que se han encontrado fueron probablemente debidas a las diferentes formas que estas células adoptan cuando están sueltas y en solución.

La posible contaminación con fibroblastos en nuestros experimentos no ha sido completamente descartada, debido a que la técnica planifica subcultivos para eliminar esta posibilidad; sin embargo el análisis por citometría de flujo asegura que más de un 90% de células aisladas de manera primaria son positivas para CD34. En el futuro se realizará dichos subcultivos para optimizar la cantidad y una pureza de los HUVEC obtenidos cercana al 99% por este método.

Dentro de las aplicaciones potenciales del estudio de células endoteliales en cultivo, se han incluido procesos fisiológicos y fisiopatológicos de angiogénesis, arteriogénesis, aterogénesis, inflamación y muchos otros procesos que requieren de complejidad de experimentación cada vez mayor.

CONCLUSIÓN

Esta se constituye en la primera experiencia en el aislamiento y cultivo de células endoteliales humanas derivadas de vena umbilical. Durante los últimos 50 años, su estudio ha estado ligado a procesos patológicos de angiogénesis, inflamación, neoplasia, aterogénesis y otros procesos comunes en muchas enfermedades.

Se ha sugerido que algunas enfermedades se caracteriza predominantemente por disfunción endotelial, como por ejemplo la preeclampsia, la retinopatía del prematuro, etc. En este sentido la información obtenida por el manipuleo y observación de las HUVEC en pruebas in vitro, ha provisto a las ciencias biomédicas con muchas herramientas para la mejor comprensión de la patogénesis, tratamiento y prevención de estas patologías.

En Bolivia, esta experiencia es la primera en su género y potencialmente aplicable a las patologías

regionales prevalentes e importancia socioeconómica. La estandarización y extensión de la técnica proveerá a los investigadores de recursos valiosos para la comprensión de la

fisiopatología en la lucha contra las enfermedades en nuestro medio.

Agradecimientos: A la Dra. Ligia Villarroel, Residente de Ginecología - Obstetricia.

REFERENCIAS

1. Aird WC. Endothelium as an organ system. *Crit Care Med* 2004; 32[Suppl.]:S271-S279.
2. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of Human Endothelial Cells Derived from Umbilical Veins: Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest* 1973;52:2745-56.
3. Blum A, Shenhav M, Baruch R, Hoffman M. Endothelial Dysfunction in Preeclampsia and Eclampsia: Current Etiology and Future Non-Invasive Assessment. *Isr Med Assoc J* 2003;5:724-6.
4. Contreras F, Fouillious C, Bolivar A, Betancourt MC, Colmenares Y, Rivero M, et al. Endothelium and Hypertensive Disorders in Pregnancy. *Am J Ther* 2003;10:415-22.
5. Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial Dysfunction. *J Am Soc Nephrol* 2004;15: 1983-1992.
6. Gimbrone MA, Cotran RS, Folkman J. Human vascular endothelial cells in culture, Growth and DNA synthesis. *J Cell Biol* 1974;60:673-684.
7. Haijart KA, Harvel PC, Jaffe EA, Nachman RL. Binding of Plasminogen to Cultured Human Endothelial Cells. *J Biol Chem* 1986;981:11656-62.
8. Altannavch TS, Roubalova K, Kucera P, Andel M. Effect of high Glucose Concentrations on Expression of ELAM-1, VCAM-1 and ICAM-1 in HUVEC with and without Cytokine Activation. *Physiol Res* 2004;53:77-82.
9. Rajakumar A, Brandon HM, Daftary A, Ness R, Conrad KP. Evidence for the functional activity of hypoxia inducible transcription factors overexpressed in preeclamptic placentae. *Placenta* 2004;25:763-9.
10. Su WH, Chen H, Jen CJ. Differential movements of VE-cadherin and PECAM-1 during transmigration of polymorphonuclear leukocytes through human umbilical vein endothelium. *Blood* 2002;100:3597-3603.
11. Broekman J, Eiroa AM, Marcus AJ. Inhibition of Human Platelet Reactivity by Endothelium-Derived Relaxing Factor From Human Umbilical Vein Endothelial Cells in Suspension: Blockade of Aggregation and Secretion by an Aspirin-Insensitive Mechanism *Blood* 1991;78(4):1033-1040.
12. Vanhoutte PM. Endothelial Control of Vasomotor Function: from Health to Coronary Disease. *Circ J* 2003; 67: 572 -575.
13. Walter JF, Skene DJ, Hampton SM, Ferns GAA. Biological rhythms, endothelial health and cardiovascular disease. *Med Sci Monit*,2003;9(1):RA1-8.