

Caracterización de un modelo hemodinámico *ex vivo* para el estudio de la activación endotelial por el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) en venas humanas perfundidas

Ambar López-Macay^{1,4,5,6}, Edgar Josué Ruiz-Medina², José Luis Ventura-Gallegos^{2,5}, Fabián Arechavaleta-Velasco³, Luis Enrique Gómez-Quiroz¹, Mina Konigsberg-Fainstein¹ y Alejandro Zentella-Dehesa^{2,5*}

¹Departamento de Ciencias de la Salud, DCBS, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, México D.F.; ²Programa Institucional de Cáncer de Mama, Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental, IIB, UNAM, México, D.F.; ³Unidad de investigación Médica en Medicina Reproductiva, Hospital de Gineco-obstetricia n. 4 "Dr. Rafael Castelazo Ayala"; IMSS, México, D.F.; ⁴Laboratorio de Líquido Sinovial, Instituto Nacional de Rehabilitación, México, D.F.; ⁵Unidad de Bioquímica, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F. ⁶Posgrado en Biología Experimental, UAMI, México, D.F.

Resumen

Los procesos inflamatorios son reconocidos como parte de la etiología de una gran cantidad de enfermedades cronicodegenerativas. La interacción entre las células del sistema inmunológico y las locales y moléculas como citosinas y quimiocinas permite la activación celular y la amplificación de la respuesta. Actualmente se reconoce la importancia de los factores fisicoquímicos como el flujo vascular, las fuerzas de rozamiento y la presión durante este evento, puesto que modulan la expresión génica y la 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 el flujo y el rozamiento. Se empleó la vena endotelial umbilical humana, que se activó con el TNF- α , 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 enfermedades.

PALABRAS CLAVE: Endotelio. Adhesión. Inflamación. Flujo vascular. Perfusión.

Abstract

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, there are very few studies that recreate such cellular microenvironments. Hence, it is of paramount importance to develop new models that will

Correspondencia:

*Alejandro Zentella-Dehesa
Instituto Nacional de Ciencias Médicas
y Nutrición Salvador Zubirán
1.º piso, Lab. 2 de la Unidad de Bioquímica
Vasco de Quiroga, 15
Col. Sección XVI, Del. Tlalpan, C.P. 14000, México, D.F.
E-mail: azentell@biomedicas.unam.mx

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

Fecha de recepción: 13-01-2014
Fecha de aceptación: 28-10-2014

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- α in order to determine U937 monocytic cells adhesion, as well as cytokines secretion and ICAM-1 expression. This model will allow leukocyte adhesion studies, using different inflammatory stimulus, along with the signaling pathways involved in several pathologies. (Gac Med Mex. 2015;151:206-15)

Corresponding author: Alejandro Zentella Dehesa, azentell@biomedicas.unam.mx

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 cronicodegenerativas como la diabetes y el cáncer. Este tipo de procesos involucran no sólo a los leucocitos y monocitos residentes en los tejidos, sino también a otros tipos celulares, como los fibroblastos, las células epiteliales, las musculares y las 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 los factores de crecimiento, las quimiocinas y las citosinas, entre las que destacan el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), interleucina 1 (IL-8), MIP-1 α , TNF- α , interleucina 1 β (IL-1 β) e interferón γ (INF- γ), además de moléculas de adhesión como selectinas, integrinas, inmunoglobulinas, 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, las fuerzas de rozamiento y 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 los focos inflamatorios en algunas enfermedades, como la aterosclerosis y el lupus^{6,7}. En los últimos años se ha demostrado que este tipo de factores físicos o fisicoquímicos 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 conlleva la detención del ciclo celular en los neutrófilos⁸, o bien proteínas como H α , involucrada en la regulación de moléculas como TLR4 e ICAM-1⁹. Así pues, los cambios en la velocidad de flujo pueden 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*, empleando líneas celulares o leucocitos de sangre periférica, o bien *in vivo*, usando roedores inmunosuprimidos o transgénicos^{12,13}, pero 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 y sometidas a condiciones de flujo han expresado moléculas distintas a las del endotelio dentro de la vena¹⁴. Asimismo, los modelos murinos han demostrado que no todas las células endoteliales tienen la misma capacidad para adherir leucocitos, aun cuando expresen moléculas de adhesión, ya que se ha visto que pueden expresar distintas moléculas, dependiendo de las células involucradas¹⁵. Tal es el caso de ICAM-1, apoyada por el receptor de productos de glucosilación avanzada (RAGE), que mantiene la adhesión de neutrófilos *in vivo*¹⁶⁻¹⁸.

Por todo ello, surge la necesidad de diseñar nuevos modelos que permitan estudiar los componentes moleculares que regulan la adhesión en condiciones de flujo dentro de las venas humanas. El objetivo de este trabajo fue 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 moleculares de la adhesión, considerando también los parámetros fisicoquímicos de flujo y rozamiento.

Para ello, se empleó como modelo la vena endotelial umbilical humana, que fue activada con el TNF- α , para poder determinar la adhesión de células U937 circulantes y algunos de los componentes moleculares asociados a este evento.

Material y métodos

Obtención de células y tejidos

Las venas umbilicales se obtuvieron de partos o cesáreas eutócicas sin complicaciones en el Hospital de Gineco-obstetricia n.º Dr. Luis Castelazo Ayala, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), en la Ciudad de México, siguiendo 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 desde la 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, EE.UU.). Las células se cultivaron en medio RPMI-1640 (6408-02) (Cole-Parmer Chicago, IL, EE.UU.) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (GIBCO-BRL, Rockville, MD, EE.UU.), un 1% de aminoácidos no esenciales, penicilina 100 U/ml y estreptomycinina 100 µg/ml (GIBCO-BRL, Rockville, MD, EE.UU.); los medios suplementados se refieren aquí como medios completos. El medio se sustituyó cada dos o tres días. Las células se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de CO₂ 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, EE.UU.). 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, EE.UU.).

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 viscosidad (μ) y densidad (ρ) 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 U937 (3×10^6 células/ml). La viscosidad del medio RPMI-1640

completo se determinó usando un reómetro PSV002AB (Brockfield Engineering Laboratories, Inc., EE.UU.), y se analizó la dependencia de la viscosidad en función de la temperatura. La velocidad angular fue de 100 g a partir de 10 alícuotas tomadas durante 2 min, 20 s cada uno desde 8-30 °C. Los datos se capturaron usando el programa Rheovision 32 v.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 de 1,007 g/ml con suero bovino fetal; y estos valores se utilizaron para obtener el número de Reynolds ($NR = \rho Dv/\mu$)¹⁹. 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 velocidad fisiológica en vénulas humanas de 1 mm de diámetro. La fuerza de rozamiento se calculó usando la ecuación para flujos newtonianos: $\tau = 6\mu Q/h^2w = (6\mu/h^2w) Q$, donde τ es la fuerza de rozamiento o *shear stress* (dinas/cm²); μ , el coeficiente de viscosidad del fluido; h , la altura de la vena; w , el ancho de la vena, y Q , la velocidad del flujo²⁰; y estos parámetros se fijaron a $\tau = 1,8 \pm 0,2$ y $\tau = 2,2 \pm 0,2$ dinas/cm² con y sin células U937 circulantes, respectivamente.

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, EE.UU.), para realizar cortes de 7 µ con un criostato (CM-18950 Sistemas de Leica, EE.UU.), 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 β -sarcoglicanos; esto se realizó con anticuerpos primarios antirratón y conejo (Santa Cruz, CA, EE.UU.) diluidos 1:100 y acoplados posteriormente a anticuerpos secundarios Alexa Fluor 647 (Molecular Probes, Oregón, EE.UU.). 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 determinaron

por la cantidad de LDH liberada en el medio de perfusión después de 1 h de recirculación de células U937 en la vena humana, ya fuera preactivada durante 2 h con TNF- α a una concentración de 5 ng/ml o sin estímulo. Como control, se comparó el valor obtenido con el de LDH liberada en el medio de cultivo estático (sin recirculación) de células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) 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 s durante 2 min en un espectrómetro DU 640 (Beckman, EE.UU.). Asimismo, se realizó la determinación de la viabilidad de las células U937 recirculantes y estáticas en el sistema de perfusión, después de perfundirlas durante 2 h utilizando el ensayo de azul de tripano. Cada 5 min se tomó una alícuota de 1 ml para contar las células vivas. Las células se incubaron con una solución de azul de tripano al 0.4% (Life tech, EE.UU.) durante 7 min y posteriormente se lavaron tres veces con PBS durante 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 en el tiempo inicial.

Medición de la producción de óxido nítrico (NO)

Para evaluar la respuesta del endotelio a los 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 NO producido en respuesta a la activación del TNF- α . 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 1 a 5 nM de KNO₃, y se obtuvo una regresión lineal R² = 0.997.

Determinación de citocinas mediante ensayo de ELISA

Se utilizaron venas estimuladas y no estimuladas con TNF- α perfundidas durante 2 h; al terminar se lavó la vena durante 10 min y se colocó en medio RPMI

nuevamente con y sin células U937 (1 x 10⁶ células/ml) recirculantes durante 1 h; al terminar el tiempo se recolectaron los medios y se congelaron a -70 °C hasta su utilización. Se utilizó el kit de citocinas humanas ELISA Ultrasensitive 10 panel plex (Invitrogen, EE.UU.). 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- α en condiciones de flujo, determinando la adhesión de células monocíticas U937. La concentración de TNF- α seleccionada para utilizarse en los ensayos *ex vivo* se obtuvo de experimentos previos en los cuales se había realizado una curva de concentración de TNF- α , desde 0.5 a 10 ng/ml, en un ensayo de adhesión *in vitro* de células U937 a las HUVEC; la concentración con la más alta adhesión fue la de 5 ng/ml. Al comenzar los experimentos el sistema se lavó con un 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; ambos segmentos fueron colocados en los reservorios bajos. Un segmento de vena se activó con 5 ng/ml de TNF- α en medio RPMI y el otro se perfundió con medio sin TNF- α . La velocidad de flujo se estableció a 1 ml/ml a 37 °C durante 2 h. Al término de este tiempo las venas se lavaron con PBS durante 10 min. Las células U937 se marcaron con succinilimidil-éster-carboxi-fluoresceína (CFSE). Aproximadamente 1 x 10⁷ células U937 se incubaron con 5 mM de CFSE en PBS suplementado con el 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 almacenarlas a -70 °C hasta su corte por criostato (CM-18950 Leica Systems, USA) en rebanadas transversales de 7 μ de grosor. La adhesión celular se evaluó contando el número de células en la superficie endotelial en imágenes de la luz del vaso reportadas en mm² en 25 campos independientes. Se realizó la observación

en un microscopio de 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, seguidas por el análisis de varianza de Tukey-Kramer, se utilizaron para comparar las muestras. Un valor de *p* menor de 0.05 fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Montaje del sistema de perfusión y evaluación de la integridad de la vena umbilical en condiciones de flujo

El diseño de nuestro sistema se basa en los modelos de perfusión hepática, pero fue adaptado al tamaño de las venas del cordón umbilical humano y al volumen del medio empleado. El esquema de la figura 1 A indica los componentes mínimos que lo constituyen y el sentido del flujo a partir de una bomba peristáltica. La figura 1 B muestra el sistema de perfusión de la vena humana, que está constituido por dos depósitos 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 el cordón y un sistema de venoclisis estéril sirve para la circulación del medio.

La identificación de la estructura de la vena perfundida para este sistema se evaluó empleando la tinción de HE. La figura 1 C muestra imágenes representativas de HE donde se observan las tres capas consecutivas que constituyen una vena: túnica íntima (TI), túnica media (TM) y túnica adventicia (TA). Utilizando la técnica de inmunofluorescencia se marcó al factor de Von Willebrand, específico de las células endoteliales (Fig. 1 D); los núcleos se observan en azul marcados con Hoechst, mientras que la presencia de células del músculo liso de la vena se visualizó con el marcaje de β sarcoglicanos teñidos en rojo. Estos resultados mostraron que este modelo permite conservar la arquitectura vascular después de la perfusión, lo cual 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, estimuladas o no con TNF- α . Los resultados presentados en la tabla 1 demuestran que solamente el 15%

de LDH es liberado por las venas perfundidas cuando no están activadas; este valor fue semejante al obtenido para los cultivos de HUVEC sin perfusión y mayor a los obtenidos por las venas activadas con TNF- α y los cultivos no perfundidos pero sí activados. Esto muestra que la perfusión no afecta a la integridad de la membrana del endotelio vascular, mientras que el endotelio activado resiste mejor el daño celular. En los experimentos donde se recircularon las células U937 a las venas perfundidas o a los cultivos HUVEC sin activar (tercera y cuarta filas), se incrementó el nivel de LDH en el medio, aumentando al 38.2 y al 11.4%, respectivamente. Los resultados de las venas y HUVEC activadas fueron muy similares, por lo que la diferencia en la muerte celular sólo se encontró en presencia de 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 ello, 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 pasaban a través de la bomba peristáltica de cuatro a dos. Así mismo, se aumentó el volumen del medio de perfusión de 9 a 12 ml, para evitar cambios en el volumen del flujo que pasaba por la vena en cada vuelta completa. Estos cambios redujeron la integridad y muerte de las células U937, manteniendo la viabilidad celular por encima del 90% (Fig. 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 NO

Para verificar si el endotelio vascular era capaz de responder a los estímulos inflamatorios, se cuantificó la producción de NO y de citocinas proinflamatorias. La curva estándar para la cuantificación de nitritos/nitratos presentó un rango lineal de entre 5 y 50 μ M de KNO₃, 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 de 23.24 μ M \pm 6.7. El medio de perfusión de las venas tratadas con 5 ng/ml de TNF- α mostró 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

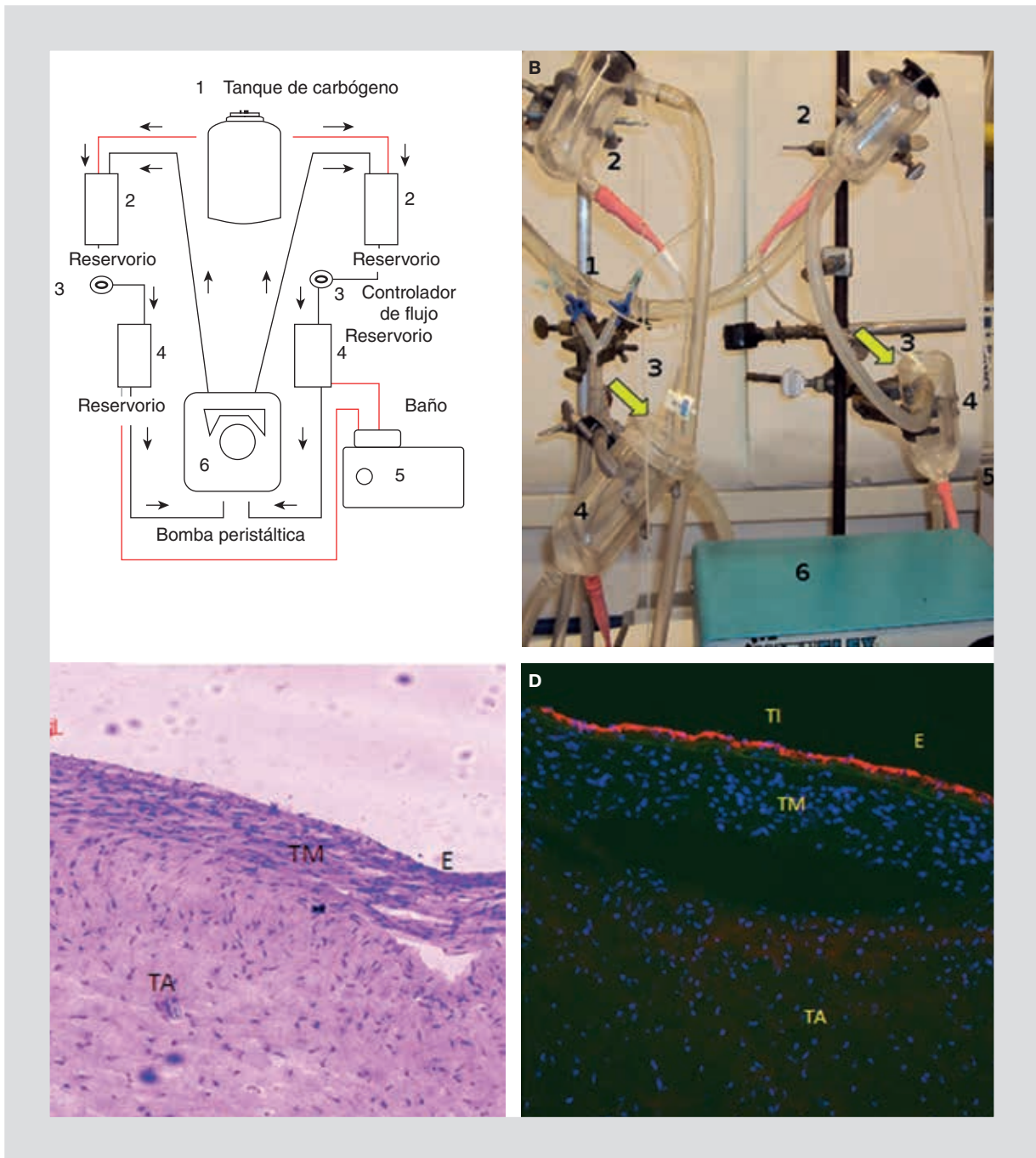


Figura 1. Sistema de perfusión de vena umbilical humana. **A:** esquema del sistema de trabajo; las flechas indican el sentido del flujo. **B:** reservorios de vidrio para el medio y la vena; las flechas indican el sitio donde se coloca la vena humana. **C:** las venas se tiñeron con HE como se describe en el apartado «Material y métodos», para marcar los componentes de las venas perfundidas. **D:** se empleó la técnica de inmunofluorescencia para marcar el factor de Von Willebrand, que es específico de las células endoteliales. Los núcleos se marcaron con Hoechst y las células del músculo liso de la vena se visualizaron con el marcaje de β -sarcoglicanos. E: endotelio.

sin $\text{TNF-}\alpha$, y en presencia o ausencia de células U937, durante 2 h de activación y 1 h de circulación de células U937. El análisis de citocinas mediante ELISA en el medio de perfusión de venas activadas mostró un aumento significativo en pg/ml de la producción de mayores niveles de $\text{TNF-}\alpha$, así como IL-4, GM-CSF, IL

6 e IL-8, con respecto a las venas no estimuladas en condiciones de flujo (Fig. 3). Los medios de las venas estimuladas con $\text{TNF-}\alpha$ sin células circulantes liberaron IL-8 y $\text{TNF-}\alpha$ después de 2 h de la activación de la vena y 1 h adicional y sin células en comparación con las venas no estimuladas.

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 lisado con Triton X-100. Se muestra la desviación estándar de cada resultado

Tipo celular	LDH liberada sin estimulación de TNF- α (%)	LDH liberada en células estimuladas con TNF- α (%)
HUVEC	15.4 \pm 0.1	3.3 \pm 0.1*
Vena umbilical humana	14.7 \pm 6.1	5.87 \pm 0.9*
HUVEC + 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†

*Datos significativos con respecto a su control sin TNF.

†Diferencias significativas con respecto a las células U937 no perfundidas (ANOVA $p < 0.05$).

Ensayo de adhesión celular

La adhesión se cuantificó evaluando las células U937 sobre la superficie endotelial en la luz del vaso de venas tratadas y no tratadas con TNF- α (Fig. 4). Los resultados mostraron un aumento significativo de 7.1 veces más células U937 adheridas en las venas perfundidas activadas con TNF- α (175.71 ± 12.3 cel/mm²) que en las venas no activadas (15 ± 6.9 cel/mm²). Posteriormente también se activaron las venas durante 0.5 y 1 h, 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- α durante 0.5, 1, 2 y 2.5 h se fijaron y 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 en comparación a las venas perfundidas sin la citocina y con respecto a venas tratadas en tiempos menores (datos no mostrados).

Discusión

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. Por ello, nuestro primer objetivo fue la conservación de la viabilidad del tejido, así como la estructura vascular y la 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 con venas safenosas y de aorta^{21,22}, que han reportado que la viabilidad celular se preserva desde 1 h hasta cinco días, manteniendo la funcionalidad del endotelio. Para el objetivo de este trabajo sólo fue necesario mantener la viabilidad e integridad del tejido por un lapso de tiempo no mayor a 5 h, pero el modelo permite aumentar el tiempo para realizar otro tipo de ensayos. Para ello, sólo 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 proporciona 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 cambio, los modelos murinos para estudios de inflamación crónica realizan estudios con rangos de hasta meses, pero tienen la desventaja de utilizar animales genética o fisiológicamente modificados

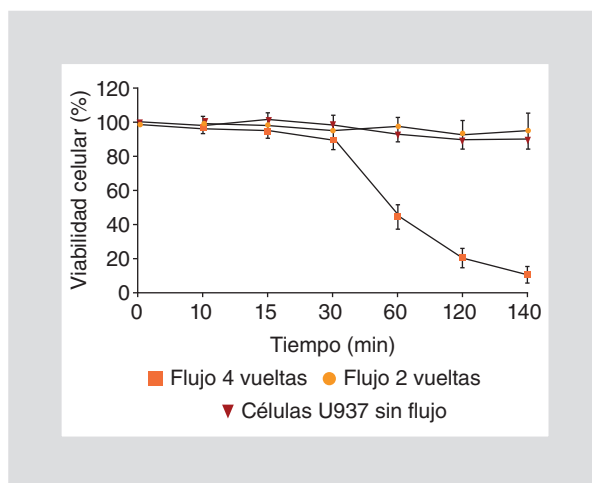


Figura 2. Viabilidad de células U937 perfundidas. Se recircularon células U937 a 1 ml/min durante 140 min por el sistema dos y cuatro veces, o bien se mantuvieron en los reservorios sin perfusión. Posteriormente se tomaron alícuotas para determinar la viabilidad por su tinción con azul de tripano. Las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

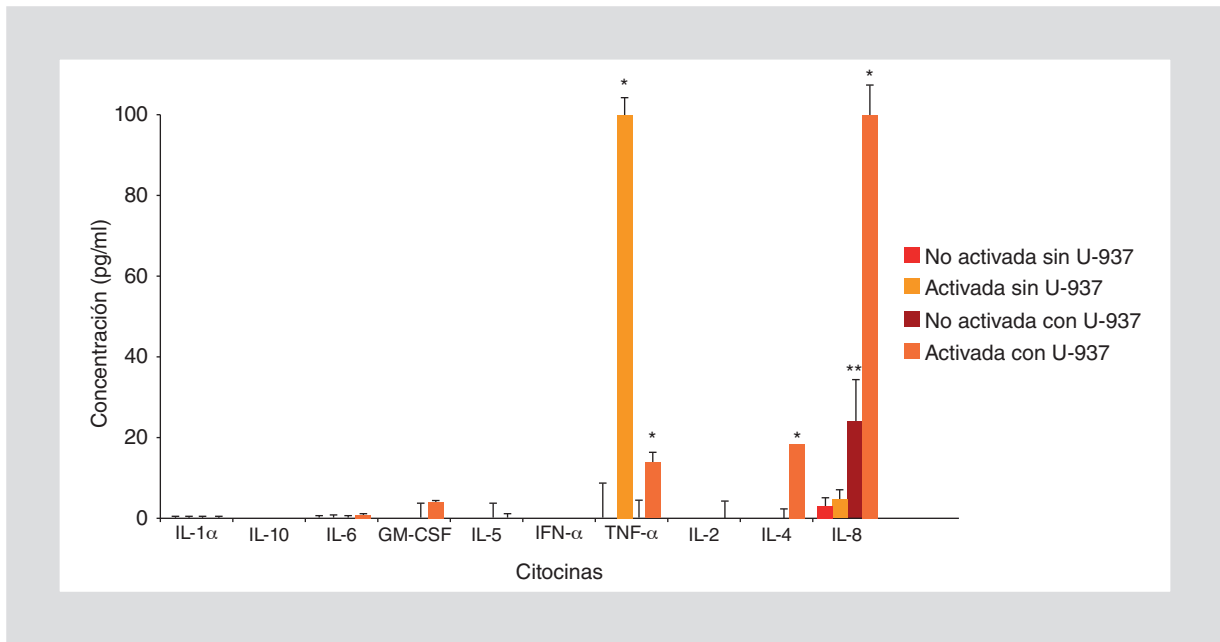


Figura 3. Ensayo multiplex para citocinas producidas por las venas activadas. Se indican las venas tratadas por perfusión de TNF durante 2 h y las venas con posterior circulación de células U937 durante 1 h más. Después de cada tratamiento las venas se lavaron con PBS durante 10 min. El asterisco (*) 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 U937 con respecto a la no activada y sin células U937 $p < 0.05$.

(immunodeprimidos, inmunodeficientes o transgénicos) y no reproducen los mecanismos celulares y moleculares que ocurren en los vasos humanos. La vena umbilical conserva una morfología diferenciada, como la que tienen las venas pequeñas o la aorta de los 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 las fuerzas de rozamiento.

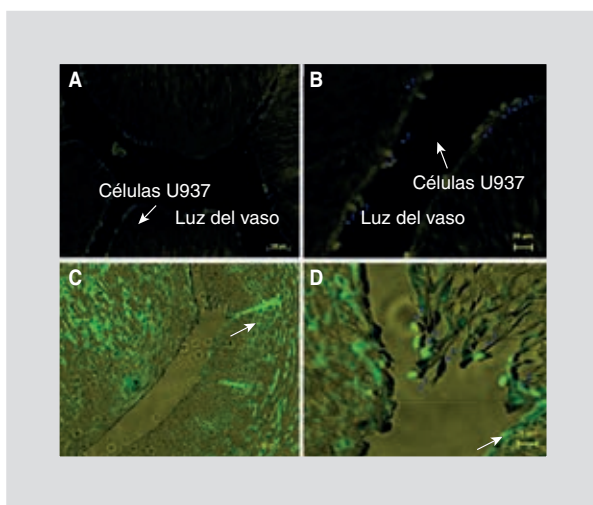


Figura 4. Ensayo de adhesión y cuantificación de células U937 sobre el endotelio vascular. **A** y **C**: luz del vaso en un corte de vena humana sin estímulo con TNF- α . **B** y **D**: aumento de las imágenes anteriores para evidenciar las células U937 sobre la superficie endotelial. Las flechas señalan a las células U937.



Figura 5. Expresión de ICAM-1 en las venas activadas con TNF- α en presencia o ausencia de flujo. La figura muestra las venas cortadas transversalmente, las cuales se marcaron con anti-ICAM-1 y con antirratón Alexa-488. La barra indica la distancia (400 μ m).

Como se ha mencionado al principio, las fuerzas hemodinámicas son esenciales para la adhesión leucocitaria; por ello, recientemente se ha prestado atención a la presión y a las fuerzas de rozamiento, ya que ambas 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 al 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 HUVEC²⁷⁻²⁹, y sólo 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 a la vasodilatación y la vasoconstricción, como la activación de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (iNOS), que se activa por TNF- α durante el proceso inflamatorio. De la misma manera, el endotelio activado responde a través de la vía de señalización del factor de transcripción NF κ B para inducir la producción de citocinas y quimiocinas como el propio TNF- α o INF- γ , IL-1 β , IL-8 y MIP-1 α , entre otras, por la activación del TNF- α , como se ha demostrado en las venas perfundidas de nuestro modelo.

Se sabe que las células monocíticas U937 sólo se adhieren al endotelio bajo previa activación, por lo que el estímulo para ello dependerá de factores del microambiente (vena) que faciliten su adhesividad. 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, no sólo por el estímulo químico o celular que genera, sino también por la presencia de estrés reológico sobre las células circulantes empleadas.

En nuestro modelo *ex vivo*, se logró incrementar significativamente la capacidad adhesiva del endotelio para unir las células monocíticas U937 a un flujo de 1 ml/min después de la activación con TNF- α , lo cual sugiere fuertemente que se activa la vía clásica de inflamación controlada por NF κ 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, puesto que observamos una menor adhesión que con ensayos en monocapas

estáticos, pero una mayor cantidad de células monocíticas adheridas entre sí y 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 al retardo en la unión del TNF- α recombinante con su receptor de superficie, debido a la presencia del flujo vascular; sin embargo, el hecho de haber encontrado un incremento en la citocina IL-8 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 las venas humanas, ya que no se sabe si la expresión de dichas proteínas y la adhesión requieren 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 empieza y termina la adhesión leucocitaria a la superficie endotelial no tienen que ser los mismos de los modelos de flujo de monocapas, que no reproducen la morfología endotelial de los vasos^{34,35}.

En este trabajo se marcó la molécula de adhesión ICAM-1 en muestras de vasos activados con células adheridas y se observó una mayor presencia de ICAM-1 en el endotelio activado; sin embargo, esta molécula no siempre se asoció a las zonas donde estaban las células adheridas. La expresión de ICAM-1 en las distintas zonas del endotelio donde no se observan células U937 adheridas puede ser un indicador de que, en presencia de flujo vascular, la activación endotelial puede darse en células que puedan llegar a estar en contacto con las células monocíticas, o bien en aquéllas que responden a cambios en el tipo de flujo (de vascular a turbulento), como se ha reportado en modelos murinos³⁶⁻³⁸. 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 h), así como la expresión de otras moléculas de adhesión como selectina E y VCAM-1, para conocer cómo 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 umbilical humana que mantiene la integridad y viabilidad del endotelio, y que podría ser empleado para analizar otras moléculas de adhesión celular relacionadas con la activación endotelial de otras moléculas, como las plaquetas, para evaluar cambios en la adhesividad del endotelio en condiciones hemodinámicas.

Agradecimientos

Agradecemos al Dr. Armando Luna López, del Instituto Nacional de Geriátrica, sus comentarios sobre el manuscrito. Gracias también a Miguel Tapia Rodríguez, de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

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

Bibliografía

- Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *JEM*. 2006;203(12):2569-75.
- 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(6):e39543.
- Harris TA, Yamakuchi M, Ferlito M, Mendell JT, Lowenstein CJ. MicroRNA-126 regulates endothelial expression of vascular cell adhesion molecule 1. *PNAS*. 2008;105(5):1516-21.
- Luscinskas FW. Neutrophil CD44 rafts and rolls. *Blood*. 2010;116(3):314-5.
- Dunne JL, Collins RG, Beaudet AL, Ballantyne CM, Ley K. Inflammation Leukocyte Rolling in TNF- α -Induced Adhesion Molecule-1 to Mediate Slow Mac-1, but Not LFA-1, Uses, *J Immunol*. 2003;171(11):6105-11.
- Fukuda S, Schmid-Schonbein GW. Regulation of CD18 expression on neutrophils in response to fluid shear stress. *PNAS*;100(23):13152-7.
- Rautou PE, Leroyer AS, Ramkhalawon B, et al. Microparticles From Human Atherosclerotic Plaques Promote Endothelial ICAM-1. *Circ Res*. 2011;108(3):335-43.
- Lin K, Hsu PP, Chen BP, et al. Molecular mechanism of endothelial growth arrest by laminar shear stress. *PNAS*. 2000;97(17):9385-9.
- Rhee WJ, Ni CW, Zheng Z, Chang K, Jo H, Bao G. HuR regulates the expression of stress-sensitive genes and mediates inflammatory response in human umbilical vein endothelial cells *PNAS*. 2010;107(15):6858-63.
- Shive MS, Salloum ML, Anderson JM. Shear stress-induced apoptosis of adherent neutrophils: A mechanism for persistence of cardiovascular device infections. *PNAS*. 2000;97(12):6710-5.
- 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(5):441-52.
- 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- κ B activation in endothelial cell. *J Immunol*. 2005;175(1):531-40.
- Basit A, Reutershan J, Morris MA, Solga M, Rose CE Jr, Ley K. 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(2):L200-7.
- 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(2):C539-547.
- 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(5):841-9.
- Kim I, Moon SO, Kim SH, Kim HJ, Koh YS, Koh GY. Vascular endothelial growth factor activation in endothelial cells E-selectin through nuclear factor- κ B adhesion molecule 1 (VCAM-1), and molecule 1 (ICAM-1), vascular cell expression of intercellular adhesion. *J Biol Chem*. 2001;276(10):7614-20.
- 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(4):601-9.
- Muro S, Wiewrodt R, Thomas A, et al. A novel endocytic pathway induced by clustering endothelial ICAM-1 or PECAM-1. *J Cell Sci*. 2003;116(Pt 8):1599-609.
- Vogel J, Abounader R, Schröck H, 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(4 Pt 2):H1441-5.
- 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(6):1300-6.
- Saucy F, Probst H, Alonso 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):50-9.
- 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.
- 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.
- Brenner W, Langer P, Oesch F, Edgell CJ, Wieser RJ. Tumor cell-endothelium adhesion in an artificial venule. *Anal Biochem*. 1995;225(2):213-9.
- 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(10):1538-46.
- Mavromatis K, Fukai T, Tate M, Chesler N, Ku DN, Galis ZS. Early effects of arterial hemodynamic conditions on human saphenous veins perfused ex vivo. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(8):1889-95.
- 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(4):330-9.
- Evensen L, Micklem DR, Blois A, et al. Mural cell associated VEGF is required for organotypic vessel formation. *PLoS One*. 2009;4(6):e5798.
- 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(4):336-45.
- May P, Arrouel C, Revol M, Servant JM, Vicaut E. Detection of hemodynamic turbulence in experimental stenosis: an in vivo study in the rat carotid artery. *J Vasc Res*. 2002;39(1):21-9.
- Anwar MA, Shalhoub J, Lim CS, Gohel MS, Davies AH. The effect of pressure-induced mechanical stretch on vascular wall differential gene expression. *J Vasc Res*. 2012;49(6):463-78.
- Wang P, Zhu F, Lee NH, Konstantopoulos K. Shear-induced interleukin-6 synthesis in chondrocytes: roles of E prostanoide (EP) 2 and EP3 in cAMP/protein kinase A- and PI3-K/Akt-dependent NF- κ B activation. *J Biol Chem*. 2010;285(32):24793-804.
- Surapitschat J, Hoefen RJ, Pi X, Yoshizumi M, Yan C, Berk BC. Fluid shear stress inhibits TNF- α activation of JNK but not ERK1/2 or p38 in human umbilical vein endothelial cells: Inhibitory crosstalk among MAPK family members. *PNAS*. 2000;98(11):6476-81.
- Schenkel AR, Mamdouh Z, Muller WA. Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation. *Nature Immunol*. 2004;5(4):393-400.
- Ploppa A, Kampmann M, Johannes T, Haeberle HA, Nohé B. Effects of different leukocyte subpopulations and flow conditions on leukocyte accumulation during reperfusion. *J Vasc Res*. 2012;49(2):169-80.
- Calabrese EJ, Bachmann KA, Bailer AJ, et al. Biological stress response terminology. *Toxicol Appl Pharm*. 2007;222(1):122-8.
- 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*. 2002;39(3):221-9.
- 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(1):H194-204.