



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DE VENA UMBILICAL
BOVINA (BUVEC) COMO MODELO DE ANGIOGÉNESIS”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MARÍA MIRIAM TOVAR HERNÁNDEZ

DIRIGIDA POR

M. en C. JUAN PABLO ROBLES ALVAREZ

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, ABRIL 2016



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**“LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DE VENA UMBILICAL
BOVINA (BUVEC) COMO MODELO DE ANGIOGÉNESIS”**

TESIS INDIVIDUAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

MARÍA MIRIAM TOVAR HERNÁNDEZ

DIRIGIDA POR

M. en C. JUAN PABLO ROBLES ALVAREZ

SINODALES

M. en C. JUAN PABLO ROBLES ALVAREZ. _____

DIRECTOR

M. en C. ALMA DELIA BERTADILLO JILOTE. _____

ASESOR INTERNO

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA. _____

SINODAL

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES. _____

SINODAL

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Angiogénesis	1
1.2. Vasoinhibinas	3
1.3 Modelos experimentales de angiogénesis	5
1.3.1 Modelos <i>in vitro</i>	5
1.3.1.1 Cultivo de células endoteliales	5
1.3.1.2 Modelo de anillo aórtico de rata o ratón	6
1.3.2 Modelos <i>in vivo</i>	6
1.3.2.1 Modelo de vascularización de la membrana Carioalantoidea (CAM)	6
1.3.2.2 Modelo de matrigel	7
1.3.2.3 Modelo de vascularización de cornea	7
2. HIPÓTESIS	10
3. OBJETIVOS	11
3.1 General	11
3.2 Específicos	11
4. METODOLOGÍA	12
4.1 Materiales	12
4.1.1 Medio de F12K	12
4.1.2 Materiales de cultivo celular	12
4.1.3 Reactivos	12
4.2 Métodos	12
4.2.1 Mantenimiento básico de cultivo celular	12

4.2.2 Aislamiento de células BUVEC	13
4.2.3 Inmunocitoquímica	14
4.2.4 Proliferación de CE por incorporación de [³ H] timidina	15
4.2.5 Ensayo de migración	15
4.2.6 Análisis estadístico	16
5. RESULTADOS	17
5.1 Aislamiento de BUVEC	17
5.2 Respuesta de cultivos primarios BUVEC a bFGF y vasoinhibinas	18
5.3 Efecto del bFGF en distintos pasajes	19
5.4 Respuesta de cultivos primarios BUVEC a bFGF y vasoinhibinas en pasaje alto	20
5.5 Migración de células BUVEC	22
6. DISCUSIÓN	22
7. CONCLUSIÓN	28
8. REFERENCIAS	29

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Proceso de angiogénesis	2
2. Estructura de las vasoinhibinas.	4
3. Morfología de cultivos primarios de células BUVEC	18
4. Proliferación de cultivos primarios BUVEC	19
5. Porcentaje de proliferación en respuesta al bFGF de las BUVEC 5 en distintos pasajes	20
6. Proliferación del cultivo BUVEC 1 en respuesta al bFGF y vasoinhibinas (Vi) mediante la incorporación de timidina	21
7. Migración de células BUVEC en respuesta a FGF y vasoinhibinas a 0, 20 y 40 horas	23

RESUMEN

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente. Es un proceso regulado por un balance de factores activadores e inhibidores. La angiogénesis se asocia a la progresión de enfermedades como retinopatía diabética, artritis reumatoide y cáncer, por ende, inhibirla se ha propuesto como una estrategia terapéutica. Actualmente, se conocen diversos inhibidores de la angiogénesis, como: las vasoinhibinas, la angiostatina y la endostatina, entre otros. La actividad de estas moléculas se ha estudiado en modelos *in vitro* de células endoteliales humanas, e *in vivo* en modelos de vascularización de la membrana corioalantoidea, y angiogénesis tumoral, entre otros. No obstante, estos modelos resultan costosos y requieren de mucho tiempo invertido. El objetivo de este trabajo fue obtener un modelo de angiogénesis práctico y reproducible para poder estudiar nuevas moléculas con potencial antiangiogénico. Los cultivos primarios de células endoteliales de vena umbilical bovina (BUVEC) se proponen como un modelo adecuado para el estudio de angiogénesis, pues son capaces de responder a moléculas inhibitoras y estimuladoras de este proceso. Se lograron aislar cultivos primarios BUVEC. Proliferaron en respuesta al factor proangiogénico bFGF, pero solo uno respondió a las vasoinhibinas, un factor antiangiogénico. No obstante, los pases de cultivo afectaron significativamente su respuesta. Asimismo, un cultivo primario BUVEC pasaje alto mostró un incremento en la migración en respuesta al bFGF y una disminución de ésta en respuesta a distintas concentraciones de vasoinhibinas. Con este trabajo se concluye que las BUVEC podrían ser un buen modelo de angiogénesis.

1. ANTECEDENTES

1.1 Angiogénesis

La angiogénesis es la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura existente. Es un proceso finamente regulado por factores que la estimulan e inhiben la angiogénesis. Este proceso es esencial para la organogénesis embrionaria y el desarrollo del feto, así como para el crecimiento de los organismos (Drake, 2003). Las células endoteliales (CE), productoras de los vasos sanguíneos, son los principales actores de este proceso. Para formar los nuevos vasos sanguíneos (Figura 1) se llevan a cabo procesos de proliferación y de migración de CE en respuesta a factores proangiogénicos. Finalmente, las nuevas CE forman nuevos capilares (Clapp y col., 2009).

Existen distintos factores que regulan la angiogénesis. La falta de oxígeno o hipoxia es el estímulo primario que desencadena este proceso. La hipoxia se genera principalmente por el crecimiento de los tejidos. Este crecimiento ocasiona que algunas células queden fuera de los límites de difusión de oxígeno, es decir, que se alejen demasiado de los vasos sanguíneos. Estas células hipóxicas activan el factor de transcripción inducible por hipoxia (HIF-1), el cual lleva a la producción de factores que inducen angiogénesis (Li y col., 2015). Entre los principales factores angiogénicos, se encuentran el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (Adams y Alitalo, 2007) la angiopoyetina-1 y -2 (Oh y col., 1999) el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) (Seghezzi y col., 1998), la sintasa de óxido nítrico (NOS) (Melillo y col., 1995), entre otros. Estos factores tienen como blanco a las CE las cuales responden generando un brote (Pugh y Ratcliffe, 2003), este comienza cuando la membrana basal, que es la matriz extracelular que rodea a los vasos sanguíneos, es degradada, provocando con esto, la migración de las CE hacia el tejido conectivo donde forman una línea sólida de CE y finalmente se produce la formación del lumen en paralelo con la síntesis de la nueva membrana basal (Ribatti y Crivellato, 2012).

La migración de las CE hacia el tejido hipóxico es el primer paso del proceso de angiogénesis, esto ocurre principalmente por los factores proangiogénicos (Adams y Alitalo, 2007; Lamalice y Le-Boeuf, 2007). Estas células producen proteasas que degradan y alteran la composición de la matriz extracelular, permitiendo el soporte y dirección adecuados para su migración, este proceso es mediado principalmente por integrinas tal como $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$ (Adams y Alito, 2007). A su vez, la extensión del brote implica la proliferación de las CE. Estos procesos de división celular son mediados principalmente por VEGF, bFGF y angiopoyetina-2 (Carmeliet, 2003).

Los procesos de migración y proliferación de CE no son eventos aislados. Las proteasas además de generar las condiciones adecuadas para la migración, en cuanto a reestructurar la matriz extracelular, también participan en la liberación de factores angiogénicos (bFGF, VEGF, TGF-B) (Mueller y Fusenig, 2004) y activan factores de inflamación, como citocinas (Ben-Av y col., 1995) que promueven la proliferación.

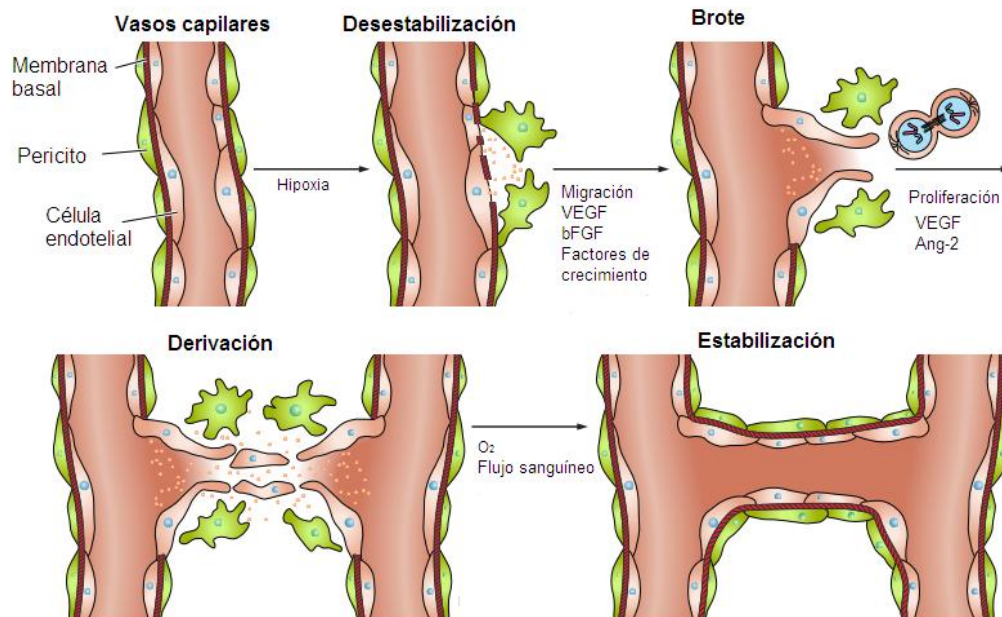


Figura 1. Proceso de angiogénesis. La hipoxia tisular genera la producción de factores que desestabilizan las células endoteliales (CE) y pericitos. Entonces, principalmente por la acción de factores de crecimiento, se genera un brote por la migración y proliferación de CE. Finalmente estas células forman los nuevos vasos capilares y el flujo sanguíneo se estabiliza. Figura modificada (Clapp y col., 2009).

Finalmente los brotes se unen y se convierten en tubos primarios por la formación intracelular e intercelular de vacuolas endoteliales (Kamei y col., 2006). La estatina endotelial vascular participa en la formación del lumen (Parker y col., 2004) La posterior entrega de oxígeno por el comienzo de flujo sanguíneo produce una disminución en la expresión local de VEGF y de este modo reduce la proliferación y migración de CE. Estos eventos junto con el reclutamiento de pericitos y la deposición de una nueva membrana basal sub-endotelial, promueve la maduración de los vasos y su quiescencia (Clapp y col., 2009).

Si bien la angiogénesis es un proceso fundamental para el desarrollo, en el organismo adulto está restringida a la reparación de heridas, al desarrollo del endometrio durante el ciclo menstrual, a la formación de la placenta y al desarrollo de la glándula mamaria durante el embarazo (Rao y col., 2015). La quiescencia de las CE está mediada por factores antiangiogénicos los cuales evitan la proliferación de estas células. El desbalance estos mecanismos reguladores de la angiogénesis puede generar la sobreproliferación de vasos sanguíneos. Esta angiogénesis patológica es un signo característico de enfermedades como cáncer, psoriasis, artritis, retinopatías, obesidad, asma, aterosclerosis, entre otras (Carmeliet, 2005).

1.2 Vasoinhibinas

Debido a que la angiogénesis es un proceso activo del cual dependen muchas enfermedades como la formación de tumores en el cáncer, numerosas investigaciones se han centrado en la búsqueda de posibles inhibidores de la angiogénesis con la finalidad de ser empleados como agentes terapéuticos (Folkman, 2006).

En las últimas décadas distintos estudios han identificado una variedad de reguladores negativos de la angiogénesis. Entre ellos, las vasoinhibinas, una familia de péptidos derivados del procesamiento proteolítico de la prolactina (PRL) los cuales inhiben la angiogénesis. La catepsina D, metaloproteasas de matriz (MMP's) y proteína morfogenética ósea (BMP-1) cortan a la PRL en distintos sitios generando una gama de fragmentos amino-terminales de 14-18 kDa (Figura 2)

llamados comúnmente PRL16K o vaso inhibinas (Clapp, 1987; Clapp y col., 2006). Estos fragmentos también puede ser generados a partir de la escisión proteolítica de la hormona de crecimiento (GH) y del lactógeno placentario (PL), pero actualmente, la mayor parte de la información se refiere a las vaso inhibinas procedentes de PRL.

La estructura básica de las vaso inhibinas aún no se conoce plenamente, sin embargo se sabe que esta actividad biológica reside en la fracción N-terminal de la prolactina (Clapp, 1987).

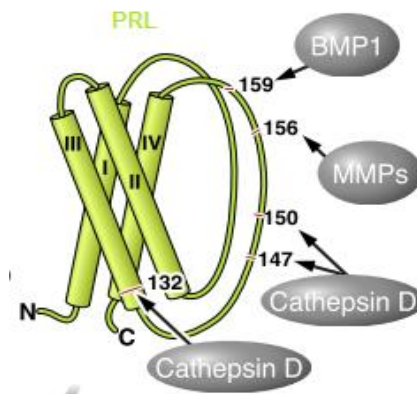


Figura 2. Generación de las vaso inhibinas. Las vaso inhibinas se generan a partir del corte proteolítico de la prolactina (PRL) a lo largo del asa que une a la α -hélice 3 y 4. Se indica el último aminoácido antes del sitio de corte. Figura modificada de (Clapp y col., 2009).

En la proliferación celular, las vaso inhibinas pueden prevenir las transiciones de G0-G1 y de G2-M del ciclo celular endotelial por la inhibición de ciclinas. De esta manera las vaso inhibinas actúan directamente sobre las CE para reducir los efectos mitogénicos del VEGF y bFGF (Tabruyn y col., 2005). Las vaso inhibinas también pueden actuar independientemente de los factores de crecimiento induciendo la apoptosis de las CE de un cultivo (Clapp y col., 2006). Por otra parte, las vaso inhibinas también tienen efectos *in vivo*, pues disminuyen la angiogénesis en la retina (Aranda y col., 2005), en la córnea (Duenas y col., 1999) y cartílago (Macotella y col., 2006), inhiben el crecimiento de los vasos sanguíneos y la supervivencia, la vasodilatación y permeabilidad vascular en la retina (Duenas y

col., 2004; Aranda y col., 2005; Garcia y col., 2008). Afecta el crecimiento y la función de los vasos coronarios y reduce el crecimiento, metástasis y neovascularización de tumores (Clapp y col., 2009).

1.3 Modelos experimentales de angiogénesis

En la actualidad se utilizan modelos *in vitro* e *in vivo* para probar la actividad angiogénica y antiangiogénica de distintas moléculas. A continuación se revisarán brevemente los modelos más utilizados.

1.3.1. Modelos *in vitro*

1.3.1.1. Cultivo de células endoteliales

Una amplia variedad de tipos de CE han sido utilizadas para desarrollar modelos de angiogénesis. Las CE maduras se han utilizado con mayor frecuencia, a partir de una gama de especies incluida la bovina, canina, porcina y humana. La localización del aislamiento incluye vasos grandes (vena umbilical, vena yugular, aorta) y microvasos como la dermis (Morin y Tranquillo, 2013).

Las CE humanas de la vena umbilical (HUVEC's) se han utilizado ampliamente para estudiar la biología y biopatología de las CE. La ventaja principal del cultivo de HUVEC es la relativamente amplia disponibilidad de los cordones umbilicales (Hughes, 1996). Sin embargo, el aislamiento y el cultivo de estas células tienen varias desventajas. En general, su cultivo requiere de sustratos especiales, factores de crecimiento, cofactores y altas concentraciones de suero. Además los cultivos de HUVEC tienen un bajo potencial de proliferación y exhiben tiempos largos de duplicación en su población (Cajero-Juarez y col., 2002).

Las HUVEC's son las CE de tipo humana más estudiadas por su fácil aislamiento, lo que explica su popularidad. Bases de datos científicas enlistan más de 5000 publicaciones sobre aislamiento, fenotipo y comportamiento de las HUVEC's (Morin y col., 2013). Las células HUVEC han sido utilizadas para cuantificar proliferación, migración, formación de tubos, inflamación, entre otros. De igual forma se utilizan para probar nuevas moléculas que inhiben la angiogénesis.

1.3.1.2. Modelo de anillo aórtico de rata o ratón.

Otro modelo *in vitro* que se utiliza es el anillo aórtico de rata o ratón, que consiste en un trozo de aorta incrustado en un coágulo de plasma, gel de colágeno o fibrina, y cultivado en medio libre de suero para CE microvasculares. Este método, tiene la ventaja de que no necesita factores de crecimiento en el medio de cultivo ya que la mayoría se encuentra de manera endógena (Murray, 2001). Sin embargo, las limitaciones notables del ensayo incluyen la exigencia del tejido fresco, ausencia del microambiente fisiológico y la regresión de los vasos a través del tiempo, dando una limitada ventana para el análisis. También el ensayo requiere aproximadamente 9 días para llevarlo a cabo, por lo tanto, lo hace un ensayo largo y con cierta dificultad técnica para hacerlo de manera cotidiana (Baker y col., 2012).

Con los modelos *in vitro* mencionados, se puede obtener información importante, pero carecen del componente sistémico que es proporcionado por modelos *in vivo*.

1.3.2. Modelos *in vivo*

Los modelos *in vivo* más utilizados actualmente son el de la membrana corioalantoidea de pollo (CAM, por sus siglas en inglés), el Matrigel *plug* y el de vascularización de córnea (Norrby, 2006).

1.3.2.1. Modelo de vascularización de la membrana corioalantoidea (CAM)

El ensayo de la vascularización de la membrana corioalantoidea es un ensayo bastante utilizado al ser esta una estructura muy vascularizada y sensible a los factores reguladores de la angiogénesis. El desarrollo del embrión del pollo tarda 21 días antes de la eclosión. Tres membranas extraembrionarias se forman durante el desarrollo: la membrana del saco vitelino, amnios, y la membrana corioalantoidea (CAM). La CAM consta de tres capas, ectodermo, mesodermo y endodermo y tiene un sistema vascular que se desarrolla dentro de la capa mesodérmica. Este modelo se utiliza cuando en CAM se implantan diferentes tumores o suspensiones celulares (Ribatti, 2014). Debido a su simplicidad y bajo costo el CAM es actualmente más utilizado, pero tiene varias desventajas como el que la

visualización de los nuevos vasos puede ser difícil, no es un modelo mamífero, hay varios artefactos que lo pueden invalidar como el polvo de la cáscara generado por la escisión de la misma porque puede causar una reacción angiogénica mediada por la inflamación, la membrana es extremadamente sensible a cambios en la tensión de oxígeno que hace que el sellado de la abertura en la cáscara sea crítico (Norrby, 2006), entre otras.

1.3.2.2. Modelo de matrigel

Otro método es el del matrigel *plug* en el cual se realiza una inyección subcutánea de matrigel (está compuesto por proteínas de membrana basal de un tumor) con factores de crecimiento en la región ventral de un ratón. El matrigel es líquido a 4°C y se inyecta frío, posteriormente con el calor del cuerpo del ratón este se solidifica en un tapón (*plug*) de gel. El ensayo es considerado de los mejores ensayos para el cribado a gran escala no obstante el hecho de que el matrigel no contiene otro tejido más que los capilares es considerado un inconveniente, puesto que los tejidos parecen contener factores pro- y anti-angiogénicos que son capaces de influenciar las reacciones angiogénicas, además de que es caro y el tejido subcutáneo no es de gran relevancia para el crecimiento del tumor. (Norrby, 2006). Al modelo se le han realizado mejoras que implican la encapsulación del matrigel en una cámara de plexiglás antes de la implantación subcutánea (Baker y col., 2006).

1.3.2.3. Modelo de vascularización de córnea

Otro modelo de angiogenesis *in vivo*, es el de la vascularización de córnea, el cual consiste en introducir células tumorales o factores de crecimiento en un bolsillo artificial en el estroma de la córnea (Rogers y col., 2007). Posteriormente se realiza una evaluación cuantitativa de la vascularización de estos tejidos de la córnea, que normalmente son avasculares. Este método tiene varias ventajas, entre a ellas es que se pueden utilizar distintos mamíferos como conejos, ratas y ratones, además de que permite la vascularización no invasiva y el seguimiento a largo plazo. Asimismo, la córnea es un sitio considerado inmunológicamente privilegiado antes

de la vascularización. No obstante, entre sus desventajas principales se encuentra el hecho de que la córnea normalmente es avascular por lo que la angiogénesis es atípica, además de que este método es técnicamente exigente (sobre todo en el ojo del ratón) aunado a ello también es una técnica traumática y costosa (Norrby, 2006; Rogers y col., 2007).

Los estudios *in vivo* dan más información que los estudios *in vitro* estableciendo que la biología del ensayo y el diseño experimental son relevantes, pero los estudios *in vitro* de CE son un complemento necesario para experimentos *in vivo* porque en éstos son los que se hace un tamizaje inicial de moléculas con probable actividad biológica (Norrby, 2006).

Todos estos modelos han permitido caracterizar a distintas moléculas que participan en el proceso de angiogénesis. No obstante, actualmente están surgiendo nuevos candidatos que regulan este proceso, es primordial tener un modelo de bajo costo y que no requiera de mucho tiempo para poder caracterizarlos.

Como se mencionó anteriormente la mayoría de las modelos que existen actualmente son costosos y presentan una dificultad técnica elevada. El modelo de primera elección es el de las CE. Sin embargo, las líneas celulares tienen como desventajas que son usualmente derivadas de tumores. Además, aunque el cultivo de las líneas celulares intenta crear un medio cercano al fisiológico, la falta de arquitectura del tejido y heterogeneidad de tipos celulares, suprime acciones como la interacción célula-célula. Esto lleva a las CE pierdan funciones específicas del tejido endotelial y adquieren un fenotipo distinto al de las células *in vivo*. Por esta razón, se busca trabajar con cultivos primarios pues conservan características endoteliales como la capacidad de formar monocapas, tubos, entre otras, dejando de lado el hecho de que con cada pase de cultivo celular que se realiza al transferir las células de un recipiente de cultivo a otro, estas se deterioran (Pan y col., 2009).

Es por esto que se está buscando tener un modelo de angiogénesis con CE de bajo costo y con una dificultad técnica menos elevada, que a su vez ayudará a disminuir los tiempos de análisis.

Este trabajo, tiene una repercusión inmediata, pues permitirá probar distintas isoformas de vasoinhibinas, para evaluar la isoforma que inhibe mejor. Esto permitirá seleccionar la isoforma de vasoinhibina con mayor potencia biológica con la perspectiva de probarla en modelos *in vivo*.

2. HIPÓTESIS

El cultivo primario de células endoteliales bovinas de la vena umbilical (BUVEC) es un modelo de angiogénesis *in vitro* adecuado para probar la bioactividad de moléculas reguladoras de éste proceso.

3. OBJETIVOS

3.1 General

Determinar si un cultivo primario de BUVEC es un modelo de angiogénesis adecuado para probar la bioactividad de moléculas antiangiogénicas.

3.2 Específicos.

- Aislar cultivos primarios de BUVEC.
- Realizar un tamizaje de cultivos primarios de BUVEC, de acuerdo a su morfología.
- Medir la proliferación y migración de BUVEC en respuesta al factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF).
- Medir la inhibición de proliferación y migración por vasoinhibinas en BUVEC estimuladas con bFGF.

4. METODOLOGÍA

4.1 Materiales

4.1.1 Medio F12K

El medio F12K (Gibco Life technologies, México) se suplementó con 10% de suero fetal bovino (SFB) y se esterilizó por filtración (0.22 μ m). Se almacenó a 4°C.

4.1.2 Materiales de Cultivo Celular

Se utilizaron cajas de cultivo de plástico de 100 mm, platos de 96 pozos, platos de 48 pozos y platos de 24 pozos (Corning Costar Corp Cambridge, M. USA). Puntas estériles de 20-200 μ L (Rainin Azcapotzalco, México), cámara de Neubauer (Sigma-Aldrich Misuri, USA), cubreobjetos (Thermanox plastic coverslips Napeville, USA). Tubos de centrifuga Falcon de 15 mL y 50 mL (Corning Costar Corp Cambridge, M. USA)

4.1.3 Reactivos

Factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (donado por Judith A. Abraham). Tripsina-EDTA (Gibco), PBS (Gibco), Tritón x100 (Baker analyzed Texas, USA), albúmina de suero bovino (Sigma-Aldrich), suero normal de cabra (NGS) (Gibco) anticuerpo primario anti-CD31 monoclonal de mouse (Abcam, USA), Anticuerpo secundario anti-mouse Alexa Fluor 488 (Abcam), Vectashield con DAPI (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA), [6-³H] timidina (Perkin Elmer, Boston, MA), hidróxido de sodio (Baker analyzed), ácido tricloroacético (Baker analyzed), MTT (Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol) (Sigma-Aldrich) y DMSO (dimetil sulfoxido) (Sigma-Aldrich), vasoinhibinas (donado por Fernando López Casillas).

4.2 Métodos

4.2.1 Mantenimiento básico de cultivo celular

Las células se mantuvieron en 10 mL de medio de cultivo F12K, en un plato de 100 mm a una temperatura de 37°C, en una atmósfera con 5% de CO₂. De manera

intermitente se les agregó [10 ng/ml] de bFGF. Cuando las células llegaron a una confluencia de entre el 70-80% se realizaron los subcultivos.

Para realizar el subcultivo, el cultivo se lavó con PBS, a continuación se le adicionaron 3 mL de tripsina-EDTA y se incubó 5 minutos a 37°C, enseguida se colectó el volumen total en un tubo de centrifuga de 15 mL y después, las células se centrifugaron por 5 min a 1000 rpm. Inmediatamente después, se retiró la tripsina y el precipitado celular se resuspendió en medio F12K. La totalidad de células se dividieron en tres partes. Cada tercio se colocó en un nuevo plato. Para el conteo de las BUVEC se utilizó una cámara de Neubauer mezclando 10 µL de azul de tripano (para revisar la viabilidad) con 10 µL de las células. Se contaron las células presentes en los cuatro cuadrantes de las esquinas. El número se dividió entre 4 y posteriormente se multiplicó por 2 (la dilución) y por 10'000 para estimar la cantidad de células por mL.

Las células se congelaron en alícuotas de 1 mL a una concentración de 1-2 millones de células/mL con 5% de DMSO filtrado (0.22 µm). Se mantuvieron 5 días a -70°C y después se transfirieron a nitrógeno líquido. Todo este procedimiento se realizó bajo condiciones de esterilidad.

4.2.2 Aislamiento de células BUVEC

Las células BUVEC se aislaron con un método previamente descrito (Olsen, 1994). Brevemente, los cordones umbilicales bovinos frescos se obtuvieron del rastro municipal. Se ligaron por ambos lados antes de seccionarlos. Se transportaron en PBS frío con 2% de penicilina/estreptomicina. La vena del cordón se disectó y se le colocó una cánula por un extremo. Posteriormente se hicieron 3 lavados con PBS a 37°C para eliminar los restos de sangre. Después, con unas pinzas hemostáticas, la vena se cerró de un extremo. Por el otro extremo se le agregó Tripsina-EDTA hasta que se llenó la vena, y a continuación se cerró y se extrajo la cánula. La vena umbilical con tripsina se incubó a 37°C. Al cabo de 15 minutos, el contenido se vació en medio F12K con 10% SFB. Enseguida se centrifugó a 1200 rpm por 5

minutos. El pellet de células se resuspendió y se colocó en una placa. Las células se mantuvieron en medio de cultivo F12K suplementado con 10% de SFB.

4.2.3 Inmunocitoquímica

Las células BUVEC con una confluencia de 80%, se tripsinizaron y se sembraron en cubreobjetos circulares tratados con colágeno II colocados en los pozos centrales de platos de 12 pozos (50,000 cel/pozo) transcurridas 20 horas se aspiró el medio y los pozos se lavaron con PBS, después se les agregó lentamente metanol a una temperatura de -20°C, para fijar y permeabilizar las células y se incubaron durante 15 minutos a -20°C. Finalmente se les retiró el metanol y fueron rehidratadas con PBS mediante dos lavados de 5 minutos cada uno.

Para la inmunocitoquímica se utilizó un protocolo descrito previamente (Corbacho y col., 2000). Brevemente, una vez que se obtuvieron las muestras, se procedió a bloquearlas con PBS, 1% de tritón x100, 0.3% de albumina, 10% de suero normal de cabra (NGS) y se incubó durante 4 horas. Posteriormente se le agregó el anticuerpo primario anti-CD31 monoclonal (1:500) y se agitó toda la noche a 45 rpm, seguido de esto se realizaron tres lavados por 10 minutos con una mezcla de PBS y 0.3% de tritón x100. Inmediatamente se le agregó el anticuerpo secundario anti-mouse Alexa fluor 488 (1:500) y se incubó durante 4 horas. Este paso se realizó en la oscuridad pues el anticuerpo es sensible a la luz. Después se realizaron nuevamente 3 lavados de 10 min con PBS y 0.3% de tritón x100 manteniendo la muestra fuera del alcance de la luz.

El montaje de la muestra se realizó en el cuarto oscuro. En un portaobjetos se colocaron 50 µL de vectashield acoplado con DAPI, sobre la gota se colocó el cubreobjetos con las células hacia abajo. Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente y finalmente esta se observó en el microscopio y se tomaron fotografías a modo de registro. Todas las incubaciones de este procedimiento se llevaron a cabo a una temperatura de 4°C.

4.2.4 Proliferación de CE por incorporación de [³H]-timidina.

Células BUVEC con una confluencia de 80%, se tripsinizaron y se sembraron en los 24 pozos centrales de platos de 48 pozos (10,000 cel/pozo). Después de 4 horas se les redujo la concentración de SFB a 0.5%. Transcurridas 20 horas, se les restituyó el SFB al 10% y se les adicionaron 200 µL de los respectivos tratamientos. Enseguida se les adicionaron 0.5 µCi/mL de [³H] timidina. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂. Al cabo de 24 horas, el medio se aspiró y las células se lavaron 3 veces con ácido tricloroacético al 5% y en el tercer lavado se dejaron a 4°C durante 30 minutos. Posteriormente, las células se lisaron y solubilizaron con 200 µL de NaOH 0.25 N a 95°C. A continuación se colocaron en 3 mL de líquido de centelleo y se mezclaron con *vortex* por 30 segundos. La incorporación de la [³H] timidina en las células se cuantificó en un contador de centelleo (Beckman).

4.2.5 Ensayo de migración.

Para este ensayo las células BUVEC se dejaron crecer hasta un 90 a 100% de confluencia en una placa de 24 pozos. Con ayuda de una punta de 20 µL a 200 µL estéril se hizo una línea recta a lo largo del pozo. Después se lavaron dos veces con PBS para descartar los restos celulares que se desprendieron de la zona y a continuación se le adicionó el medio con tratamiento. Se obtuvieron fotografías de la zona de la herida para su posterior comparación después de la migración. Al cabo de 24 y 48 horas de incubación se observaron en el microscopio para la obtención de fotografías. La migración celular fue calculada con el número de células en la herida mediante el software ImageJ (Developer, Java). Inicialmente se sustrajo el fondo, se invirtieron los colores y posteriormente la imagen se hizo binaria (blanco y negro). Entonces se procedió a cuantificar el número de partículas. El proceso se automatizó mediante el siguiente macro:

```
run("Subtract Background...", "rolling=30 light disable stack");
setOption("BlackBackground", false);
run("Make Binary", "method=Default background=Light calculate");
```

```
run("Analyze Particles...", "size=500-Infinity pixel show=[Bare Outlines] exclude  
summarize stack");  
selectWindow("image.tif");  
run("Save");  
run("Open Next");
```

4.2.6 Análisis estadístico.

Las diferencias entre los grupos de los ensayos se valoraron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de una prueba *post-hoc* de comparación múltiple Bonferroni's, se consideró una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.05$.

5. Resultados

5.1. Aislamiento de BUVEC

Se aislaron células de seis cordones umbilicales bovinos obtenidos del rastro municipal. Los cultivos obtenidos de cada cordón se mantuvieron de manera independiente y se etiquetaron como BUVEC 2, 3, 4, 5, 6 y 7. Una semana posterior al aislamiento se verificó y documentó su morfología (Figura 3).

El cultivo BUVEC 1, proveniente de un aislamiento anterior a este estudio, se utilizó como control positivo. La morfología presentada por sus células, fue hexagonal, regular, formaron monocapa, y se observó la característica forma de adoquín. Mediante una inmunocitoquímica se observó que estas células fueron positivas a CD31, lo cual indica que son de fenotipo endotelial (Figura 3 A). En base a esto, los cultivos primarios fueron comparados y evaluados según el criterio morfológico del cultivo BUVEC1. Los cultivos BUVEC 3, 5 y 6 (No se muestra la evidencia fotográfica de este cultivo primario) cumplieron con las características morfológicas, por lo cual se catalogaron como positivos.

El cultivo primario BUVEC 4 tuvo características del cultivo endotelial como la formación de monocapa. No obstante, se observó una evidente contaminación de otros tipos celulares (Figura 3 B, flechas), los cuales fueron de mayor tamaño y crecieron sobre la monocapa (Figura 3 B, Flechas). Por esta razón este cultivo BUVEC 4 fue descartado del estudio.

Por el contrario, el cultivo BUVEC 7 mostró una morfología distinta al cultivo control BUVEC 1. Al parecer se obtuvo una mezcla de dos tipos celulares, el primer tipo presento una morfología pequeña, irregular y no formaron monocapa (Figura 3 B, flechas negras), el segundo tipo celular presentó una morfología más grande y alargada (Figura 3 B, flechas blancas). Debido a que este cultivo fue heterogéneo y no tenía características de cultivo primario endotelial, fue considerado como negativo.

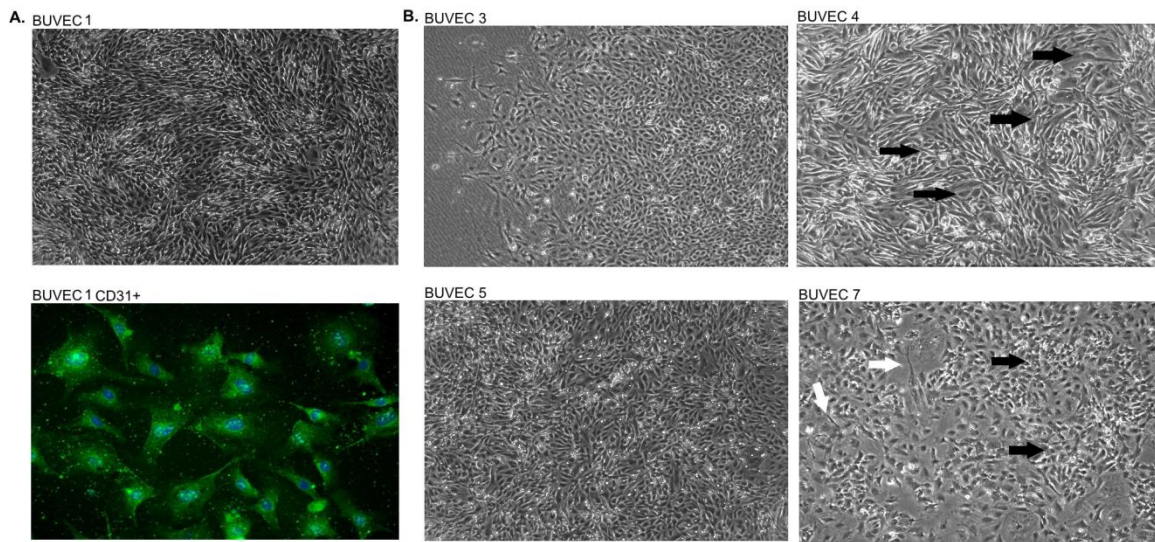


Figura 3. Morfología de cultivos primarios de células BUVEC. (A) Arriba. Fotografía de contraste de fases de la monocapa de cultivo BUVEC1 (4X) Abajo. Inmunocitoquímica para CD31 (verde) de BUVEC1 (40X), los núcleos están teñidos con DAPI (azul) (B) Fotografías de cultivos primarios BUVEC 3, 4, 5 y 7 (4X), respectivamente. En la fotografía del cultivo BUVEC 4 se muestran contaminaciones con otros tipos celulares (flechas negras). En la fotografía el cultivo BUVEC7 se observan 2 tipos celulares distintos (flechas blancas y negras).

5.2. Respuesta de cultivos primarios BUVEC a bFGF y vasoinhibinas

Cuando los cultivos positivos (BUVEC 3, 5, y 6), y las BUVEC 7 (utilizadas como control negativo) llegaron a un 80% de confluencia, se cuantificó su proliferación mediante la incorporación de [³H]-timidina. Las células fueron contadas y sembradas durante el pasaje 1, y posterior a una etapa de incubación con bajos niveles de suero (0.5%), se cuantificó la proliferación en respuesta a 10 ng/mL de bFGF, así como a 200 nM de vasoinhibinas (el cultivo BUVEC 7 fue tratado con una concentración de 100 nM).

El cultivo BUVEC 5 proliferó de manera significativa en respuesta al bFGF. Así mismo, las vasoinhibinas disminuyeron la proliferación de este cultivo de manera significativa. Lo cual nos habla de que estas células son endoteliales. Por el contrario, los cultivos BUVEC 3 y 6 no respondieron al bFGF ni a las vasoinhibinas. En cambio, el cultivo BUVEC 7 tuvo un aumento significativo en respuesta al bFGF no obstante, no respondió a las vasoinhibinas (Figura 4 A).

Para soportar estos resultados, se compararon las morfologías de las células en los pasajes utilizadas en este ensayo (Figura 4 B). Se observó que las células del cultivo BUVEC 5, cumplían con las características morfológicas de células endoteliales. A pesar de que las células de los cultivos BUVEC 3 y 6 mostraron una morfología posiblemente endotelial, no respondieron de la manera esperada al ensayo de proliferación por lo cual se descartaron del estudio. De igual manera, se observó una morfología amorfa de las células del cultivo BUVEC7, este resultado ya se esperaba.

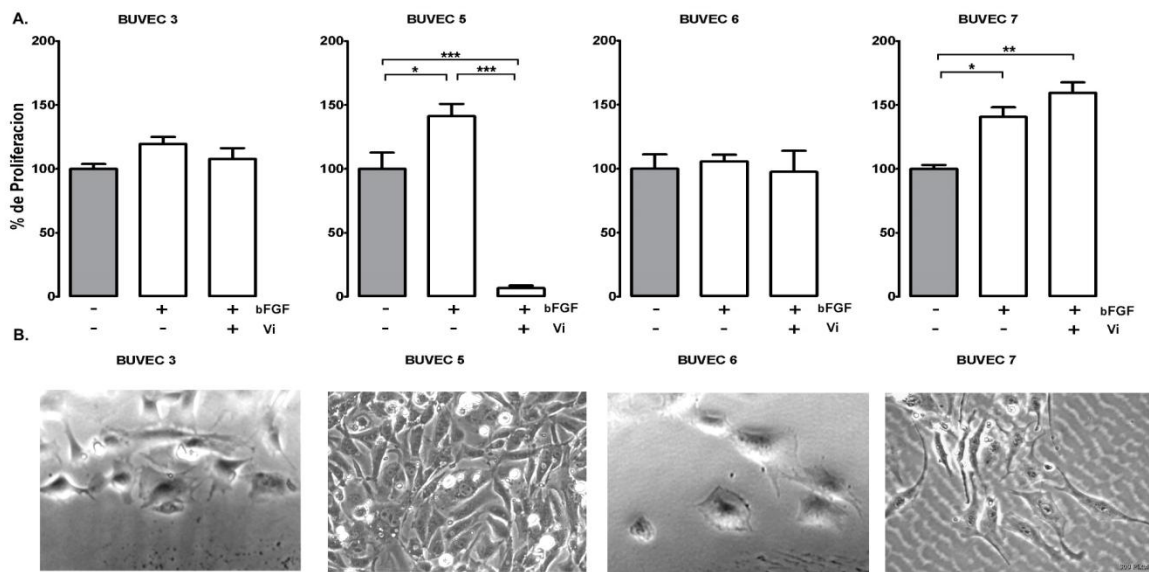


Figura 4. Proliferación de cultivos primarios BUVEC. (A) Porcentaje de proliferación en respuesta al bFGF y vasoinhibinas (Vi). Proliferación basal (barra gris). Los valores son las medias \pm error estándar de un experimento por triplicado (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$). (B) Fotografías de los respectivos cultivos BUVEC (20X)

5.3. Efecto del bFGF en distintos pasajes

Con el objetivo de analizar hasta que pasaje se mantenía el incremento a la proliferación en respuesta a un factor proangiogénico. Se comparó la respuesta que presentaban las BUVEC 5 al bFGF con una concentración de 10 ng/mL en los pasajes 1, 3 y 6, mediante un ensayo de proliferación por incorporación de [3 H]-timidina. Se pudo observar (Figura 5) que en el pasaje 1 la proliferación aumentó de manera significativa en presencia del bFGF. Sin embargo, en los pasajes 3 y 6

el bFGF no tuvo efecto, esto podría ser debido a la senescencia o a contaminación por otros tipos celulares.

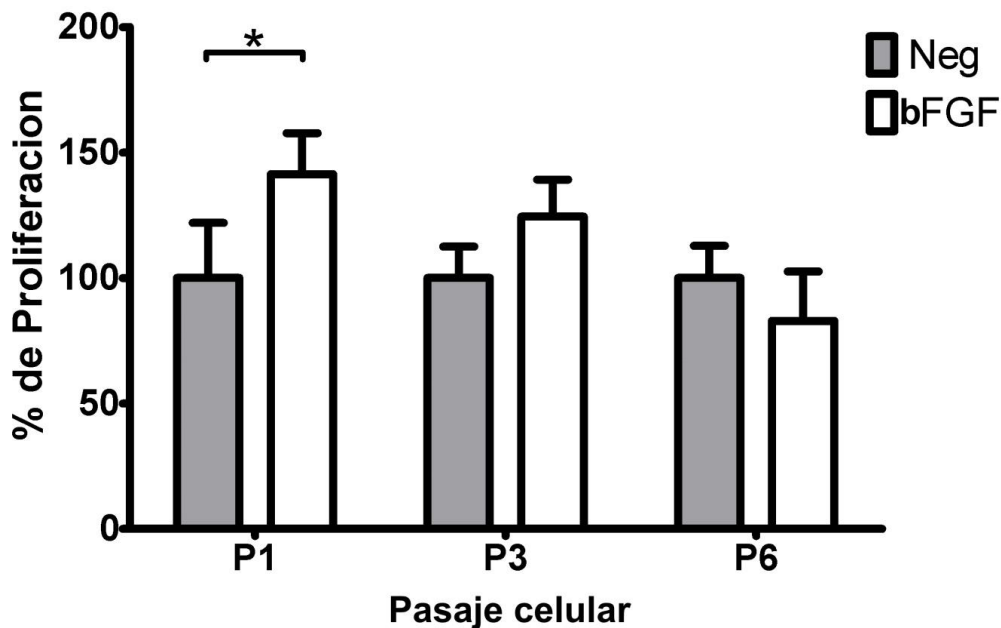


Figura 5. Porcentaje de proliferación en respuesta al bFGF de las BUVEC 5 en distintos pasajes. Proliferación basal (barras grises) y proliferación en respuesta al bFGF (barras blancas). Los valores son las medias \pm error estándar de un experimento por triplicado (* $p < 0.05$).

5.4. Respuesta de cultivos primarios BUVEC a bFGF y vasoinhibinas en pasaje alto

Debido a que el cultivo primario BUVEC 5 en los pasajes 3 y 6 ya no mostró un incremento de la proliferación en respuesta a bFGF y que probablemente esto se deba a la senescencia de las células o a la contaminación del cultivo por otros tipos celulares, para elucidar esto, se evaluó la proliferación del cultivo BUVEC 1 en pasaje 17 en respuesta a distintas concentraciones (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.2 ng/mL) del factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) y se observó que a pesar de su pase alto, este cultivo era capaz de proliferar de manera significativa a distintas concentraciones de bFGF (Figura 6 A). Asimismo, para evaluar si este cultivo pudiera ayudar a evaluar la actividad anti-proliferativa de factores antiangiogénicos, se evaluó la inhibición de la proliferación con distintas concentraciones de

vasoinhibinas (0, 25, 50, 100, 200 nM), bajo el estímulo de 0.2 ng/ml de bFGF. No obstante, las vasoinhibinas no inhibieron la proliferación de este cultivo (Figura 6 B).

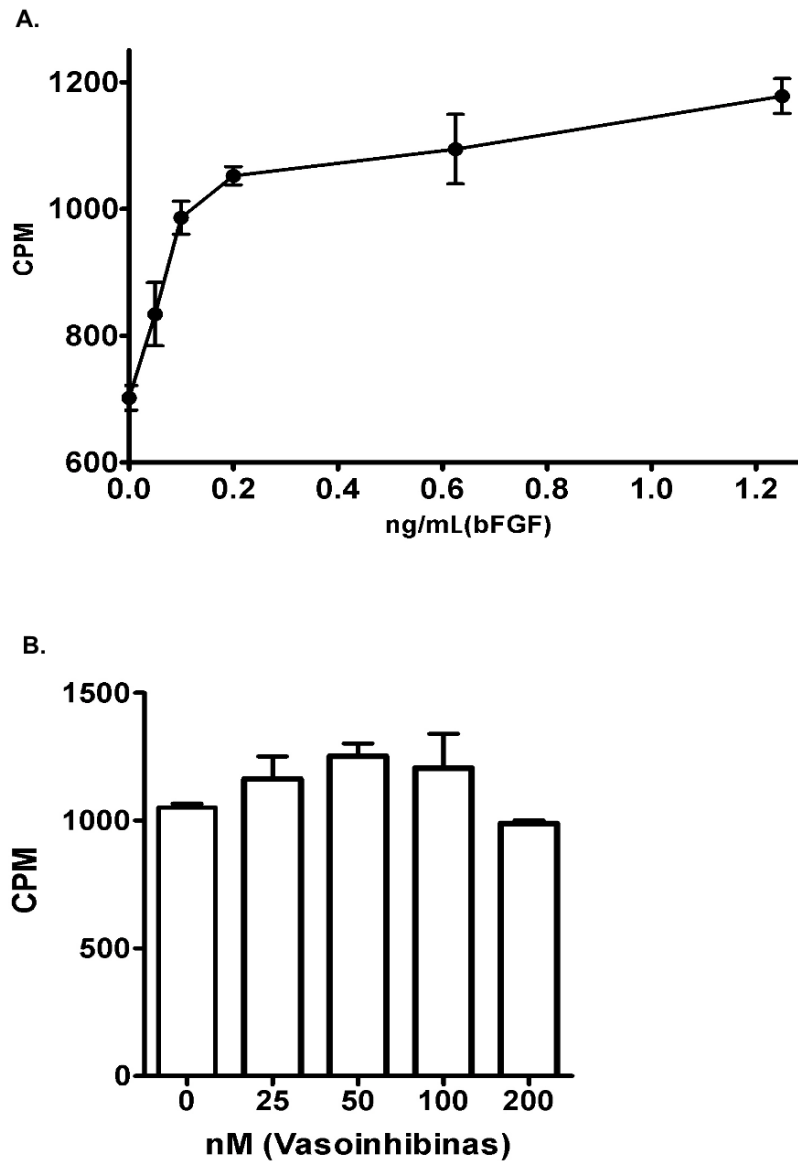


Figura 6. Proliferación del cultivo BUVEC 1 en respuesta al bFGF y vasoinhibinas (Vi). (A) Curva de proliferación en respuesta a bFGF, Los valores son las medias \pm error estándar de tres experimentos independientes. (B) Efecto de las vasoinhibinas (Vi) en presencia de bFGF. Los valores son las medias \pm error estándar de un experimento por triplicado. CPM (cuentas por millón).

5.5. Migración de células BUVEC.

Debido a que la senescencia de los cultivos BUVEC afectaba el ensayo de inhibición de la proliferación, se procedió a evaluar la migración del cultivo BUVEC1 como otro parámetro del modelo de angiogénesis. Entonces, se midió la migración de estas células de pasaje 19 mediante el ensayo de herida, en respuesta a diferentes concentraciones de bFGF (0, 2, 10 y 20 ng/mL) y vasoinhibinas (0, 10, 25, 50 y 100 nM) a las 20 y 40 horas (Figura 7).

El cultivo BUVEC 1 muestra un aumento representativo de migración a las 20 horas con 2 ng/mL de bFGF con un punto máximo de 10 ng/mL. Sin embargo, a las 40 horas se observa una migración más pronunciada y con un comportamiento lineal en las concentraciones 0, 2 y 10 ng/mL de bFGF (Figura 7 A). Se muestra una fotografía representativa de la cuantificación (Figura 7 B). En este ensayo fue a las 40 horas que la proliferación fue mayor.

Asimismo, en el ensayo de inhibición de la migración, las vasoinhibinas fueron capaces de bloquear la migración significativamente con 100 nM a las 20 horas. A las 40 horas se observó inhibición significativa de la proliferación con 25 y 100 nM de vasoinhibinas. No obstante, se observa que con 10 nM de vasoinhibinas, la migración aumenta de manera significativa (Figura 8 C). Se muestra una fotografía representativa de la cuantificación (Figura 8 B).

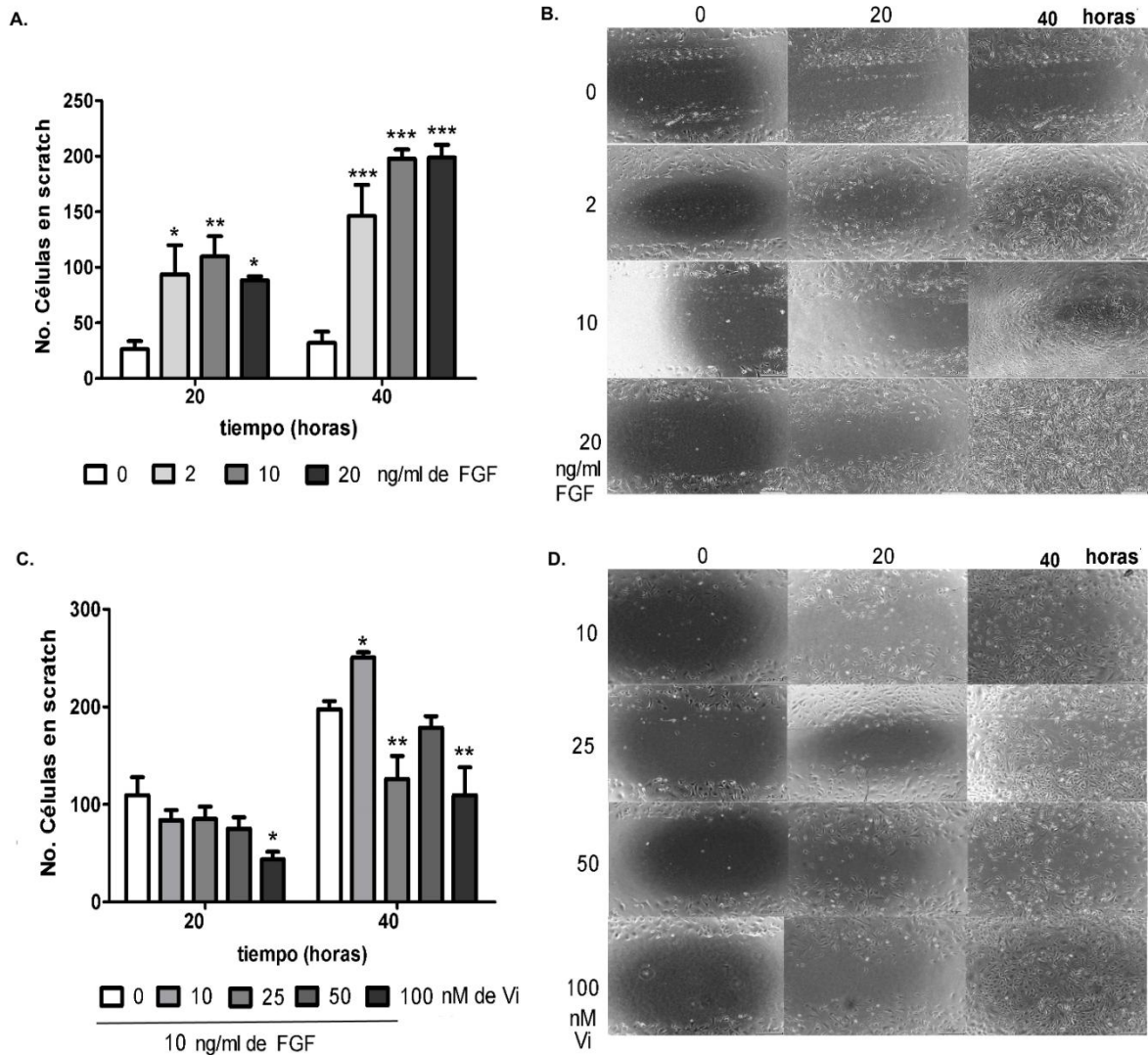


Figura 7. Migración de células BUVEC en respuesta a bFGF y vasoinhibinas (Vi) a 0, 20 y 40 horas. (A) Migración de cultivo BUVEC 1 pasaje 19 en respuesta a distintas concentraciones de bFGF. (B) imagen representativa de la migración de BUVEC en respuesta a bFGF (C) Migración de las células BUVEC en respuesta a distintas concentraciones de vasoinhibinas (Vi) en presencia de bFGF). (D) imagen representativa de migración BUVEC tratadas con vasoinhibinas (Vi). Los valores son las medias \pm error estándar de un experimento por triplicado (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

6. DISCUSIÓN

La angiogénesis es uno de los procesos más estudiado por su participación en la progresión de enfermedades como cáncer, artritis, retinopatías, obesidad, asma, aterosclerosis, entre otras (Carmeliet, 2005). En las últimas décadas se han identificado una gran variedad de reguladores negativos de la angiogénesis, los cuales han sido caracterizados utilizando modelos *in vivo* e *in vitro* de angiogénesis de pequeña escala (Clapp, 1987; Folkman, 2006; Clapp y col., 2006). Sin embargo, estos modelos son costosos y requieren de mucho tiempo invertido. En este trabajo propusimos a las BUVEC (células endoteliales de vena umbilical bovino) como un modelo de angiogénesis eficiente.

Esta no es la primera vez que se emplean estas células. Se han utilizado para experimentos donde se probó la adhesión de los glóbulos rojos parasitados con *Babesia bovis* de virulencia atenuada y no atenuada (Molloy y col., 2003) y para la generación de líneas celulares inmortalizadas como un modelo de estudio del endotelio vascular (Cajero-Juarez y col., 2002). No obstante, un cultivo primario se considera que tienen mayor similitud a las células *in vivo*, porque reflejan mejor la actividad y funciones que desempeñan en su ambiente natural. Estos cultivos son más utilizados que las líneas celulares provenientes de tumores o de la transfección de plásmidos (Pan y col., 2009). Por ejemplo, la transformación de células con oncogenes para su inmortalización tiene desventajas como la desestabilización del genoma, lo cual puede causar cambios genéticos permanentes. Un ejemplo de esto son las HUVEC's (células endoteliales de cordón umbilical humano) las cuales han sido inmortalizadas utilizando esta estrategia y perdieron funciones específicas del endotelio, como la síntesis y secreción del factor Von Willebrand, que es un marcador inmunocitoquímico endotelial. Además de presentar anomalías en la expresión de proteínas, tales como las citoqueratinas, lo es un marcador de un mayor grado de desdiferenciación (Hughes, 1996). Es por ello que este trabajo propone el uso de cultivos primarios.

En este estudio, se lograron aislar y cultivar células de seis cordones umbilicales, se seleccionaron tres cultivos según su morfología mediante la comparación con uno de BUVEC positivo a CD31 aisladas previamente a este estudio. Este resultado mostró que el método de aislamiento no es específico para las células endoteliales. Esto podría deberse a la diversidad celular del cordón umbilical y las variaciones propias del método. Por otro lado existen métodos optimizados para obtener cultivos más puros, un ejemplo es la obtención de clonas celulares del cultivo, que permitirán que esté mantenga sus características genotípicas y fenotípicas (Mathupala y col., 2009). No obstante, la desventaja principal de la obtención de clonas implica mayor tiempo de aislamiento. Además, existen métodos que permiten aislar células de manera específica y con mayor pureza como es el aislamiento con perlas magnéticas acopladas a anticuerpos específicos (Plouffe y col., 2015). Pero este método tiene como desventaja principal el alto costo involucrado en el proceso.

Los tres cultivos seleccionados cumplían con las características morfológicas de las células endoteliales al ser hexagonales, regulares y formar monocapa. A pesar de esto, sólo uno de los cultivos proliferó en respuesta al bFGF, además de que las vasoinhibinas inhibieron su proliferación, esto indicó su naturaleza endotelial. Por el hecho de que solo un cultivo, de los tres catalogados como endoteliales, fue positivo, queda claro que la morfología no es, por sí sola, un buen parámetro de selección. Un parámetro que nosotros evaluamos en este estudio, sobre el cultivo BUVEC 1 utilizado como control positivo, fue la presencia del marcador endotelial CD31 mediante una inmunocitoquímica. Sin embargo no es el único método para caracterizar a los cultivos endoteliales, también se utilizan técnicas como la del marcaje por lectinas (Cajero-Juarez y col., 2002) y el incremento de la captación de proteínas de baja densidad-acetilada (Voyta y col., 1984, Ochoa y col., 2001) pero ambos tienen la desventaja de no ser tan específicos como la inmunocitoquímica. Entonces, es conveniente analizar cada uno de los cultivos mediante una inmunocitoquímica para CD31 para evaluar su pureza.

El cultivo de BUVEC 5 mostró que el cultivo primario de células BUVEC es un buen modelo para probar factores proangiogénicos y antiangiogénicos al responder de manera significativa a un factor proangiogénico y a un factor antiangiogénico en el modelo de proliferación. En este caso se utilizó el bFGF como factor proangiogénico, el cual promovió de manera significativa la proliferación. Asimismo también se observó que un factor antiangiogénico, como son las vasoinhibinas, produjo una inhibición en la proliferación de manera significativa. Incluso la inhibición que mostró en su proliferación fue significativamente menor a la proliferación basal. Por lo tanto, podría ser que las vasoinhibinas estuvieran causando apoptosis celular, uno de los efectos de estas moléculas (Martini y col., 2000).

No obstante, a pesar de que este cultivo primario mostró la capacidad de las células BUVEC de ser el modelo de angiogénesis que se buscaba con este trabajo, se observó la pérdida de sensibilidad al bFGF en cuanto aumentaron los pasajes. Esto pudo deberse a una probable contaminación de otros tipos celulares en el cultivo. Es conocido que las HUVEC se pueden contaminar con células musculares lisas si hay un trauma o lesión en el cordón, o también al masajear fuerte el cordón en el proceso de la extracción (Morgan, 1995). Lo cual reitera la necesidad de optimizar la caracterización de los cultivos de BUVEC y los métodos de aislamiento.

Si bien la proliferación es un parámetro de la angiogénesis empleado constantemente existen otros parámetros relacionados con la angiogénesis como es la migración de las células endoteliales (Michaelis, 2014). En las BUVEC no se han descrito sus características de migración (Cajero-Juarez y col., 2002, Molloy y col., 2003).

Debido a que ya no contábamos con células puras excepto las BUVEC 1 las cuales fueron CD31 positivas (control) y con eso nos asegurábamos de su fenotipo endotelial, las empleamos para evaluar sus características como modelo endotelial. Estas células endoteliales fueron probadas en el ensayo de proliferación con distintas concentraciones de bFGF y se observó que a pesar de ser pasaje 17, y

habitualmente se suelen utilizar antes de los 5 pasajes, estas continuaban proliferando en respuesta a este factor. Esto sugiere que los cultivos aislados podrían estar contaminados. Sin embargo, la proliferación inducida por bFGF en estas células, no fue inhibida por la presencia de diferentes concentraciones de vasoinhibinas. Lo cual podría deberse a la senescencia de las células debida a los altos pasajes en los que se encontraban.

Aunado a que el objetivo de este proyecto es establecer un modelo de angiogénesis y que la migración es un parámetro importante en este proceso. Nos dimos a la tarea de medir la migración de estas células endoteliales BUVEC1, en un ensayo de herida en respuesta al bFGF y a las vasoinhibinas.

Las células del cultivo BUVEC1 CD31 positivas, migraron en respuesta a diferentes concentraciones de bFGF, resultado esperado pues se sabía son responsivas al bFGF. De manera interesante, a pesar de que las vasoinhibinas ya no influían en el parámetro de proliferación en este cultivo, en el ensayo de migración, se observó una inhibición significativa por parte de las vasoinhibinas, lo cual sugiere una participación de las vasoinhibinas en este proceso. Recientemente se ha descrito un complejo PAI-1/uPA (inhibidor del activador del plasminógeno-1/ activador del plasminógeno tipo urocinasa) como posibles reguladores de la acción de la acción de las vasoinhibinas (Bajou y col., 2014), donde uPA cataliza plasminógeno a plasmina y la plasmina activada se encuentra involucrada en proteólisis y activación de metaloproteasas de matriz. Por lo tanto uPA tiene un rol importante en la migración de células endoteliales (Raghu y col., 2010). Asimismo este proceso es extracelular y con menos complejidad que la proliferación, donde se tiene la hipótesis que el complejo vasoinhibinas/PAI-1/uPA se internaliza a través del receptor para uPA (uPAR) para cumplir su función antiangiogénica (Bajou y col., 2014). La senescencia de las células BUVEC pudiera estar asociada a la pérdida de la expresión de este receptor, no obstante las vasoinhibinas seguirían bloqueando la actividad de la proteasa uPA, en el medio extracelular, con lo cual se podría explicar por qué las vasoinhibinas mantienen sus efectos sobre la inhibición de la migración, pero no de la proliferación, en este cultivo BUVEC1 de pases altos.

7. CONCLUSIONES

Se logró aislar cultivos primarios de BUVEC y consecutivamente el tamizaje por morfología de las mismas, de manera que, con estos resultados se concluyó que para generar un modelo de angiogénesis a partir de las células BUVEC, es necesario optimizar el aislamiento de las BUVEC y a su vez, mejorar el método de caracterización utilizando en paralelo la morfología y la inmunocitoquímica para CD31 para obtener cultivos puros de estas células y poder llevar a cabo las metodologías requeridas.

Con este estudio, se puede concluir que los cultivos BUVEC con una estandarización adecuada podrían ser un buen modelo de angiogénesis para evaluar moléculas angiogénicas. Particularmente, la evaluación de la proliferación es requerida que se realice en pasajes tempranos para que los cultivos mantengan su fenotipo endotelial. Por otro lado, las células BUVEC senescentes de pasajes altos podrían ser de utilidad en los ensayos de migración, probablemente cuando se evalúen moléculas antiangiogénicas que impacten en el proceso migratorio de las células.

8. REFERENCIAS

- Adams** R. H., Alitalo K. "Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis." *Nat Rev Mol Cell Biol.* **2007**; 8: 464-478.
- Aranda** J., Rivera J. C., Jeziorski M. C., Riesgo-Escovar J., Nava G., Lopez-Barrera F., Quiroz-Mercado H., Berger P., Martinez de la Escalera G., Clapp C. "Prolactins are natural inhibitors of angiogenesis in the retina." *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **2005**; 46: 2947-2953.
- Bajou** K., Herkenne S., Thijssen V. L., D'Amico S., Nguyen N. Q., Bouche A., Tabruyn S., Srahna M., Carabin J. Y., Nivelles O., Paques C., Cornelissen I., Lion M., Noel A., Gils A., Vinckier S., Declerck P. J., Griffioen A. W., Dewerchin M., Martial J. A., Carmeliet P., Struman I. "PAI-1 mediates the antiangiogenic and profibrinolytic effects of 16K prolactin." *Nat Med.* **2014**; 20: 741-747.
- Baker** J. H., Huxham L. A., Kyle A. H., Lam K. K., Minchinton A. I. "Vascular-specific quantification in an in vivo Matrigel chamber angiogenesis assay." *Microvasc Res.* **2006**; 71: 69-75.
- Baker** M., Robinson S. D., Lechertier T., Barber P. R., Tavora B., D'Amico G., Jones D. T., Vojnovic B., Hodivala-Dilke K. "Use of the mouse aortic ring assay to study angiogenesis." *Nat Protoc.* **2012**; 7: 89-104.
- Ben-Av** P., Crofford L. J., Wilder R. L., Hla T. "Induction of vascular endothelial growth factor expression in synovial fibroblasts by prostaglandin E and interleukin-1: a potential mechanism for inflammatory angiogenesis." *FEBS Lett.* **1995**; 372: 83-87.
- Cajero-Juarez** M., Avila B., Ochoa A., Garrido-Guerrero E., Varela-Echavarria A., Martinez de la Escalera G., Clapp C. "Immortalization of bovine umbilical vein endothelial cells: a model for the study of vascular endothelium." *Eur J Cell Biol.* **2002**; 81: 1-8.
- Carmeliet** P. "Angiogenesis in health and disease." *Nat Med.* **2003**; 9: 653-660.
- Carmeliet** P. "Angiogenesis in life, disease and medicine." *Nature.* **2005**; 438: 932-936.

Clapp C. "Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms." *Endocrinology*. **1987**; 121: 2055-2064.

Clapp C., Gonzalez C., Macotela Y., Aranda J., Rivera J. C., Garcia C., Guzman J., Zamorano M., Vega C., Martin C., Jeziorski M. C., de la Escalera G. M. "Vasoinhibins: a family of N-terminal prolactin fragments that inhibit angiogenesis and vascular function." *Front Horm Res*. **2006**; 35: 64-73.

Clapp C., Thebault S., Jeziorski M. C., Martinez De La Escalera G. "Peptide hormone regulation of angiogenesis." *Physiol Rev*. **2009**; 89: 1177-1215.

Corbacho A. M., Macotela Y., Nava G., Torner L., Duenas Z., Noris G., Morales M. A., Martinez De La Escalera G., Clapp C. "Human umbilical vein endothelial cells express multiple prolactin isoforms." *J Endocrinol*. **2000**; 166: 53-62.

Drake C. J. "Embryonic and adult vasculogenesis." *Birth Defects Res C Embryo Today*. **2003**; 69: 73-82.

Duenas Z., Rivera J. C., Quiroz-Mercado H., Aranda J., Macotela Y., Montes de Oca P., Lopez-Barrera F., Nava G., Guerrero J. L., Suarez A., De Regil M., Martinez de la Escalera G., Clapp C. "Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression." *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **2004**; 45: 2049-2055.

Duenas Z., Torner L., Corbacho A. M., Ochoa A., Gutierrez-Ospina G., Lopez-Barrera F., Barrios F. A., Berger P., Martinez de la Escalera G., Clapp C. "Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and by endogenous prolactin-like molecules." *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **1999**; 40: 2498-2505.

Folkman J. "Angiogenesis." *Annu Rev Med*. **2006**; 57: 1-18.

Garcia C., Aranda J., Arnold E., Thebault S., Macotela Y., Lopez-Casillas F., Mendoza V., Quiroz-Mercado H., Hernandez-Montiel H. L., Lin S. H., de la Escalera G. M., Clapp C. "Vasoinhibins prevent retinal vasopermeability associated with diabetic retinopathy in rats via protein phosphatase 2A-dependent eNOS inactivation." *J Clin Invest*. **2008**; 118: 2291-2300.

Hughes S. E. "Functional characterization of the spontaneously transformed human umbilical vein endothelial cell line ECV304: use in an in vitro model of angiogenesis." *Exp Cell Res.* **1996**; 225: 171-185.

Kamei M., Saunders W. B., Bayless K. J., Dye L., Davis G. E., Weinstein B. M. "Endothelial tubes assemble from intracellular vacuoles in vivo." *Nature.* **2006**; 442: 453-456.

Lamallice L., Le Boeuf F., Huot J. "Endothelial cell migration during angiogenesis." *Circ Res.* **2007**; 100: 782-794.

Li Y., Zhang D., Wang X., Yao X., Ye C., Zhang S., Wang H., Chang C., Xia H., Wang Y. C., Fang J., Yan J., Ying H. "Hypoxia-inducible miR-182 enhances HIF1 α signaling via targeting PHD2 and FIH1 in prostate cancer." *Sci Rep.* **2015**; 5: 12495.

Macotella Y., Aguilar M. B., Guzman-Morales J., Rivera J. C., Zermeno C., Lopez-Barrera F., Nava G., Lavalle C., Martinez de la Escalera G., Clapp C. "Matrix metalloproteases from chondrocytes generate an antiangiogenic 16 kDa prolactin." *J Cell Sci.* **2006**; 119: 1790-1800.

Martini J. F., Piot C., Humeau L. M., Struman I., Martial J. A., Weiner R. I. "The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation." *Mol Endocrinol.* **2000**; 14: 1536-1549.

Mathupala S., Sloan A. A. "An agarose-based cloning-ring anchoring method for isolation of viable cell clones." *Biotechniques.* **2009**; 46: 305-307.

Melillo G., Musso T., Sica A., Taylor L. S., Cox G. W., Varesio L. "A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter." *J Exp Med.* **1995**; 182: 1683-1693.

Michaelis U. R. "Mechanisms of endothelial cell migration." *Cell Mol Life Sci.* **2014**; 71: 4131-4148.

Molloy J. B., Bowles P. M., Jorgensen W. K., Cooke B. M. "Babesia bovis: adhesion of parasitized red blood cells to bovine umbilical vein endothelial cells in vitro does not select for virulence." *Exp Parasitol.* **2003**; 103: 182-184.

Morgan S. J. Cultivo de células animales_Acriba. España editorial, **1995**; 51

Morin K. T. ,Tranquillo R. T. "In vitro models of angiogenesis and vasculogenesis in fibrin gel." *Exp Cell Res.* **2013**; 319: 2409-2417.

Mueller M. M. ,Fusenig N. E. "Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer." *Nat Rev Cancer.* **2004**; 4: 839-849.

Murray C.J."Angiogenesis protocols." New Jersey; Humana press, **2001**:267

NeNorrby K. "In vivo models of angiogenesis." *J Cell Mol Med.* **2006**; 10: 588-612.

Ochoa A., Montes de Oca P., Rivera J. C., Duenas Z., Nava G., de La Escalera G. M. ,Clapp C. "Expression of prolactin gene and secretion of prolactin by rat retinal capillary endothelial cells." *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **2001**; 42: 1639-1645.

Oh H., Takagi H., Suzuma K., Otani A., Matsumura M. ,Honda Y. "Hypoxia and vascular endothelial growth factor selectively up-regulate angiopoietin-2 in bovine microvascular endothelial cells." *J Biol Chem.* **1999**; 274: 15732-15739.

Olsen E. Culturing of human umbilical vein and dermal microvascular endothelial cells. Academic Press. San Diego editorial, **1994**; 142-147

Pan C., Kumar C., Bohl S., Kingmueller U., Mann M. "Comparative proteomic phenotyping of cell lines and primary cells to assess preservation of cell type-specific functions." *Mol cell proteomics.* **2009**; 8: 443-450.

Parker L. H., Schmidt M., Jin S. W., Gray A. M., Beis D., Pham T., Frantz G., Palmieri S., Hillan K., Stainier D. Y., De Sauvage F. J. ,Ye W. "The endothelial-cell-derived secreted factor Egfl7 regulates vascular tube formation." *Nature.* **2004**; 428: 754-758.

Plouffe B. D., Murthy S. K. ,Lewis L. H. "Fundamentals and application of magnetic particles in cell isolation and enrichment: a review." *Rep Prog Phys.* **2015**; 78: 016601.

Pugh C. W. ,Ratcliffe P. J. "Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system." *Nat Med.* **2003**; 9: 677-684.

Raghu H., Lakka S. S., Gondi C. S., Mohanam S., Dinh D. H., Gujrati M. ,Rao J. S. "Suppression of uPA and uPAR attenuates angiogenin mediated angiogenesis in endothelial and glioblastoma cell lines." *PLoS One.* **2010**; 5: e12458.

Rao N., Lee Y. F. ,Ge R. "Novel endogenous angiogenesis inhibitors and their therapeutic potential." *Acta Pharmacol Sin.* **2015**; 36: 1177-1190.

Ribatti D. "The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for tumor biology." *Exp Cell Res.* **2014**; 328: 314-324.

Ribatti D. ,Crivellato E. ""Sprouting angiogenesis", a reappraisal." *Dev Biol.* **2012**; 372: 157-165.

Rogers M. S., Birsner A. E. ,D'Amato R. J. "The mouse cornea micropocket angiogenesis assay." *Nat Protoc.* **2007**; 2: 2545-2550.

Seghezzi G., Patel S., Ren C. J., Gualandris A., Pintucci G., Robbins E. S., Shapiro R. L., Galloway A. C., Rifkin D. B. ,Mignatti P. "Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis." *J Cell Biol.* **1998**; 141: 1659-1673.

Tabruyn S. P., Nguyen N. Q., Cornet A. M., Martial J. A. ,Struman I. "The antiangiogenic factor, 16-kDa human prolactin, induces endothelial cell cycle arrest by acting at both the G0-G1 and the G2-M phases." *Mol Endocrinol.* **2005**; 19: 1932-1942.

Voyta J. C., Via D. P., Butterfield C. E. ,Zetter B. R. "Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein." *J Cell Biol.* **1984**; 99: 2034-2040.