

# Utilidad de las células mesoteliales obtenidas de epiplon humano para el recubrimiento de prótesis vasculares de politetrafluoroetileno (PTFE). Estudio comparativo con células endoteliales de vena umbilical<sup>1</sup>

J. M. Bellón Caneiro\* - J. Buján Varela\*\* - N. G.<sup>a</sup> Honduvilla\*\*\* - F. Minguela Cantalejo\*\*\*\* - A. Hernando Fraile\*\*\*\*\*

Departamento de Ciencias Morfológicas y Cirugía.  
Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá de Henares  
Madrid (España)

## RESUMEN

Una de las problemáticas existentes en la siembra de células endoteliales (CE), es la fuente de obtención de las mismas. La utilización para este fin del territorio venoso es limitada y no siempre posible.

El objetivo de este trabajo ha sido realizar un estudio comparativo del comportamiento tras la siembra «in vitro» sobre prótesis vasculares de politetrafluoroetileno (PTFE), de CE obtenidas de vena umbilical y células mesoteliales (CM) procedentes de epiplon humano. Se utilizaron los primeros subcultivos de ambos tipos celulares. La identificación se realizó con anticuerpos monoclonales anti Factor VIII, anti-CD 34 y anti-vimentina. La actividad funcional se valoró determinando los niveles de prostaciclina por técnicas de radioinmunoensayo. El material protésico utilizado fue PTFE de 30 µm de porosidad, pretratado con fibronectina (20 µg/ml). El estudio morfológico se efectuó con microscopía electrónica de barrido, siendo los tiempos de estudio de 8,24,48 horas, 4,7,10 días.

Las CM en cultivo presentaron un comportamiento similar a las CE. Ambos tipos celulares mostraron positividad para anticuerpos anti Factor VIII y CD 34. Las CM fueron positivas para vimentina, no así las CE. Las tasas de producción de prostaciclina fueron similares en los dos tipos celulares. La siembra sobre PTFE mostró un comportamiento similar.

Las CM obtenidas del omentum pueden constituir una alternativa válida de recubrimiento de prótesis vasculares de PTFE.

para finalmente culminar en estudios clínicos (3). Estos, sin embargo, todavía no han dado los resultados esperados.

Una de las problemáticas existentes en la siembra de CE es la fuente de obtención de las mismas. A pesar de los avances en las técnicas de cultivos, la población de CE que pueden ser extraídas de las venas es manifiestamente insuficiente (4).

En el laboratorio, para llevar a cabo estudios «in vitro», indudablemente la vena de cordón umbilical humano es la idónea. En animales de experimentación se han utilizado venas yugulares (5) y en el humano vena safena (6) e incluso se han extraído CE de venas varicosas (7) y de safena criopreservada (8).

El territorio venoso en el humano debe ser preservado, debido a que las venas constituyen todavía la mejor opción para realizar «by-pass» o cirugía de sustitución vascular.

Es por ello por lo que se han ido buscando otras fuentes posibles de obtención de CE. Así **Wagner** y cols. (9) señalaron que el tejido adiposo es una fuente importante de CE. Otros autores (10, 11, 12, 12, 14) sugirieron la posibilidad de obtener las CE de los microvasos de la grasa. **Pearce** y cols. (15), **Williams** y cols. (16) y **Lachat** y cols. (17), realizaron siembras de CE procedentes del omentum en prótesis vasculares de PTFE.

## Introducción

Las investigaciones en la siembra de células endoteliales (CE) sobre prótesis vasculares han seguido a lo largo del tiempo una trayectoria dispar. A los trabajos básicos iniciales de experimentación «in vitro» (1) sucedieron otros trabajos experimentales llevados a cabo en animales (2),

\* Profesor Titular de Cirugía.

\*\* Profesor Titular de Ciencias Morfológicas.

\*\*\* Profesor Asociado de Ciencias Morfológicas.

\*\*\*\* Médico Adjunto Cirugía Vascular (C.S. La Paz). Madrid.

\*\*\*\*\* Doctor en Medicina. Colaborador de Investigación.

<sup>1</sup> El presente trabajo ha sido realizado con una Ayuda de Investigación CICYT SAF 92-0875.

## SUMMARY

*One of the problems about the cultive of endothelial cells (EC) is the source of them. Venous source is limited and not always possible.*

*The goal of the present work was to compare the different behaviour after the «in vitro» cultive of EC from umbilical vein and mesotelial cells (MC) from the human epiplon. The cultive was made on a vascular polite-trafluoroetilen (PTFE) prosthesis. Identification was based on the presence of monoclonal antibody anti-factor VIII, anti-CD 34 and anti-vimentine. Funcional activity was analized measuring the prostacilin levels by radio-immunoassay. The prosthetic material was PTFE with a 30  $\mu$ m porosity, pretreated with fibronectin (20  $\mu$ g/ml). The morphologic study was made by electronic microscopy after 8, 24 and 48 hours and 4, 7 and 10 days.*

*The behaviour from the EC and MC cultives was similar. Both types of cells showed positive antibodies anti-f. VIII and anti-CD 34. However, only the MC cultives were positive anti-vimentine. Prostacilin production rates were similar in both types of cultives. The behaviour on the PTFE was also similar.*

*The omentum MC could be a valid alternative for coating PTFE vascular prosthesis.*

Las CE obtenidas del epiplon pueden contaminarse con células mesoteliales (CM) (18, 19).

Utilizando anticuerpos monoclonales hay estudios que ponen en duda que las poblaciones celulares obtenidas del epiplon sean de CE (20), confirmando otros que realmente sí son CM (21). Algunos les han denominado «*endotelioides*» (22).

Nosotros, utilizando anticuerpos monoclonales hemos visto que las CM obtenidas del epiplon, admiten positividad para marcaje específico de CE y además de células musculares lisas (23).

En el presente trabajo hemos estudiado el comportamiento «*in vitro*» de CM extraídas de epiplon humano en comparación con CE convencionales obtenidas de vena umbilical sembradas sobre prótesis vasculares de PTFE.

## Material y métodos

### Cultivos celulares

#### a) CM

La obtención de las células se efectuó de piezas de omentum

(30-40 gr), obtenidas de donantes en el curso de intervenciones de cirugía abdominal reglada.

Las piezas se sumergieron en Minimum Esential Medium (MEM) (GIBCO BRL), suplementado con antibiótico/antimicótico (10000 UI/ml penicilina, 10000  $\mu$ g/ml Estreptomina, 25  $\mu$ g/ml anfotericina B y Fungizona) (GIBCO BRL) y transportadas hasta el laboratorio.

Para la obtención de las células mesoteliales se ha utilizado una modificación del método de Kern y cols. (10).

El omentum fue sometido a lavado en MEM y las células fueron extraídas mediante digestión con colagenasa tipo I CLS (0,1% en  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  15 mM) (Worthington) durante 20 minutos a 37° C en baño de agitación.

Tras la digestión, la suspensión celular se recogió en un tubo cónico (50 ml) (Falcon) y se centrifugó a 200 g durante 7 minutos.

A continuación el sobrenadante fue eliminado y el pellet celular resuspendido en 5 ml de Medio 199

(M-199) (Gibco BRL), 10000 UI/ml penicilina/10000  $\mu$ g/ml Estreptomina (Gibco BRL), L-glutamina 2mM (Gibco BRL), factor de crecimiento para CE (ECGF) 20  $\mu$ g/ml (Sigma) y heparina sódica 90  $\mu$ g/ml (Roche).

Posteriormente, se traspasó la suspensión celular a un frasco de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> de superficie (Nunc) e incubada a 37° C en una estufa de cultivo suplementada con 5% de CO<sub>2</sub>.

El medio de cultivo fue renovado cada dos días hasta la formación de una monocapa confluyente en la pared del frasco de cultivo.

#### b) CE

Las CE fueron obtenidas a partir de vena de cordón umbilical humano, mediante tratamiento con colagenasa tipo I 0,1% (Worthington). Posteriormente, las células fueron puestas en cultivo siguiendo la metodología descrita por Jaffe y cols. (24) y modificada por Gimbrone (25).

Al igual que para las CM, como medio de cultivo se empleó M-199 (Gibco BRL). Los cultivos fueron incubados a 37° C en una estufa de CO<sub>2</sub>, en ambiente húmedo, hasta la formación de una monocapa celular confluyente.

### Subcultivos

En ambos tipos celulares, una vez formada la monocapa en el frasco de cultivo, las células fueron levantadas del mismo con una solución de tripsina-EDTA IX (Gibco BRL), la cual se dejó actuar durante cinco minutos a 37° C. La acción de la enzima fue detenida por adición de M-199 completo, y la suspensión celular así obtenida fue dividida en frascos de cultivo a razón 1:2.

### Recuento y viabilidad celular

El número de células viables obtenido tanto de las piezas de omentum como de vena umbilical se determinó mediante la prueba de Azul

Tripán y sometido posteriormente a recuento en una cámara de Neubauer (Weber-Scientific-Internat. Ltd).

### Identificación celular

La identificación celular se realizó mediante técnicas inmunohistoquímicas.

Tanto para las CE como para las CM se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-Factor VIII (Biomed), anti-CD 34 (Serotec), y anti-Vimentina (Biomed).

En ambos casos se siguió la técnica de la fosfatasa alcalina por el procedimiento de Avidina-Biotina.

### Actividad biológica

Fue llevada a cabo determinando niveles de prostaciclina. Los mismos fueron detectados mediante técnicas de radioinmunoensayo (RIA) por medición de los niveles de 6-Keto-Prostaglandin  $F_{1\alpha}$  (Amersham), intermediario estable en la ruta metabólica de la síntesis de prostaciclina.

### Cámaras de siembra

Fueron construidas con un pequeño segmento de un tubo Ependorff como hemos descrito en trabajos anteriores (26), siguiendo la metodología de Budd y cols. (27).

El material protésico utilizado fue

el politetrafluoroetileno (PTFE) de 30  $\mu$ m de porosidad (W. L. Gore & Ass. Flagstaff Ariz. USA) preparado en forma de pequeños parches de forma cuadrada de 1,5 cm de lado, tomados de prótesis vasculares convencionales de pared fina y de 5 mm de diámetro interno.

La superficie protésica previamente a la siembra estuvo incubada a 38° C con fibronectina (20  $\mu$ g/ml) durante 1 hora.

### Estudio morfológico

Se efectuó utilizando la microscopía electrónica de barrido. Las piezas fueron fijadas en glutaraldehído al 3% y posteriormente pasadas a una solución tamponada de Millonig pH 7.3. Luego se deshidrataban en series graduales de acetonas, obteniendo el punto crítico en un Polaron E-3000 con CO<sub>2</sub>. Posteriormente fueron metalizadas en un metalizador (Polaron) y observadas en un microscopio electrónico de barrido Zeiss-950 DSM.

### Diseño experimental

Se realizaron dos grupos de estudio:

- grupo de CE procedentes de vena umbilical
- grupo de CM procedentes de epiplon

Ambos grupos celulares fueron sembrados después del primer subcultivo.

Los tiempos de estudio de las siembras fueron de: 8, 24, 48 h., 4, 7 y 10 días.

## Resultados

### Cultivos

Tanto las CE como las CM presentan un buen comportamiento en cultivo, obteniéndose un crecimiento exponencial en el plazo de una semana que permite alcanzar el estado de monocapa sobre todo el frasco de cultivo. La morfología de las células en cultivo, aunque similar (Fig. 1E, 1M) en cuanto a forma y tamaño, presenta en las CM una forma más poligonal con relación a las CE.

### Identificación

Las reacciones inmunohistoquímicas (Tabla I), ponen de manifiesto la presencia de antígenos de superficie CD 34 y factor VIII en ambos tipos celulares, si bien la positividad fue más intensa tanto en coloración como en número para las CE.

Se evidenciaron filamentos intermedios usando anticuerpos anti-vimentina en CM, no existiendo apenas marcaje en las CE.

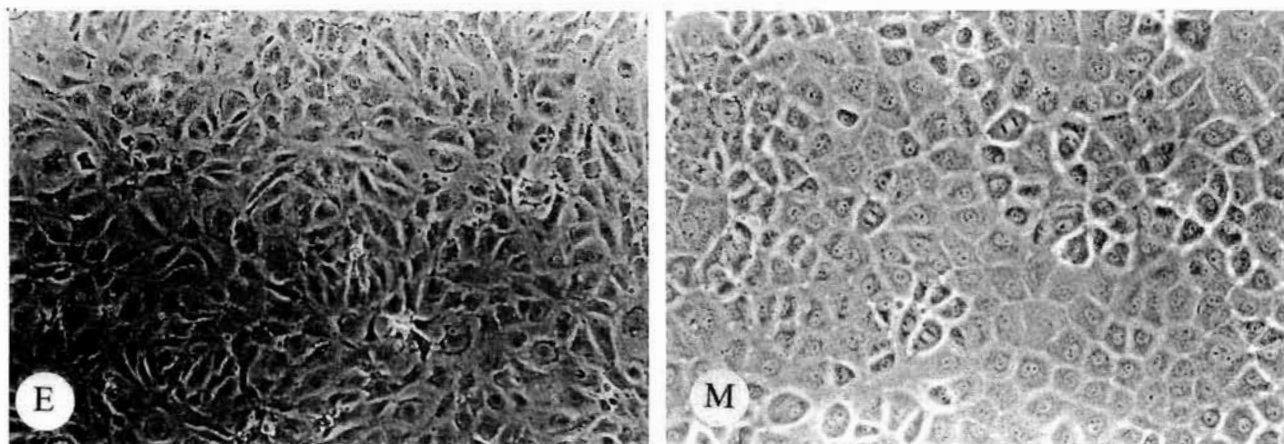


Fig. 1 - E: Aspecto de las CE en cultivo (10X). M: Las células mesoteliales en cultivo muestran una morfología más poligonal que las CE (10X).



**Tabla I**  
**Respuesta de las células endoteliales y mesoteliales**  
**frente a distintos anticuerpos**

	Anti CD-34	Anti-Factor VIII	Anti-Vimentina
Células endoteliales	++++	++++	+
Células mesoteliales	++	++	++++

### Prostaciclina

La actividad funcional de las células pudo ser medida a través de la capacidad de ambas estirpes celulares para producir prostaciclina. Aparecieron valores que superaron los 5 ng/ml en ambos tipos celulares, lo que indica una elevada producción de prostaciclina en ambos cultivos celulares.

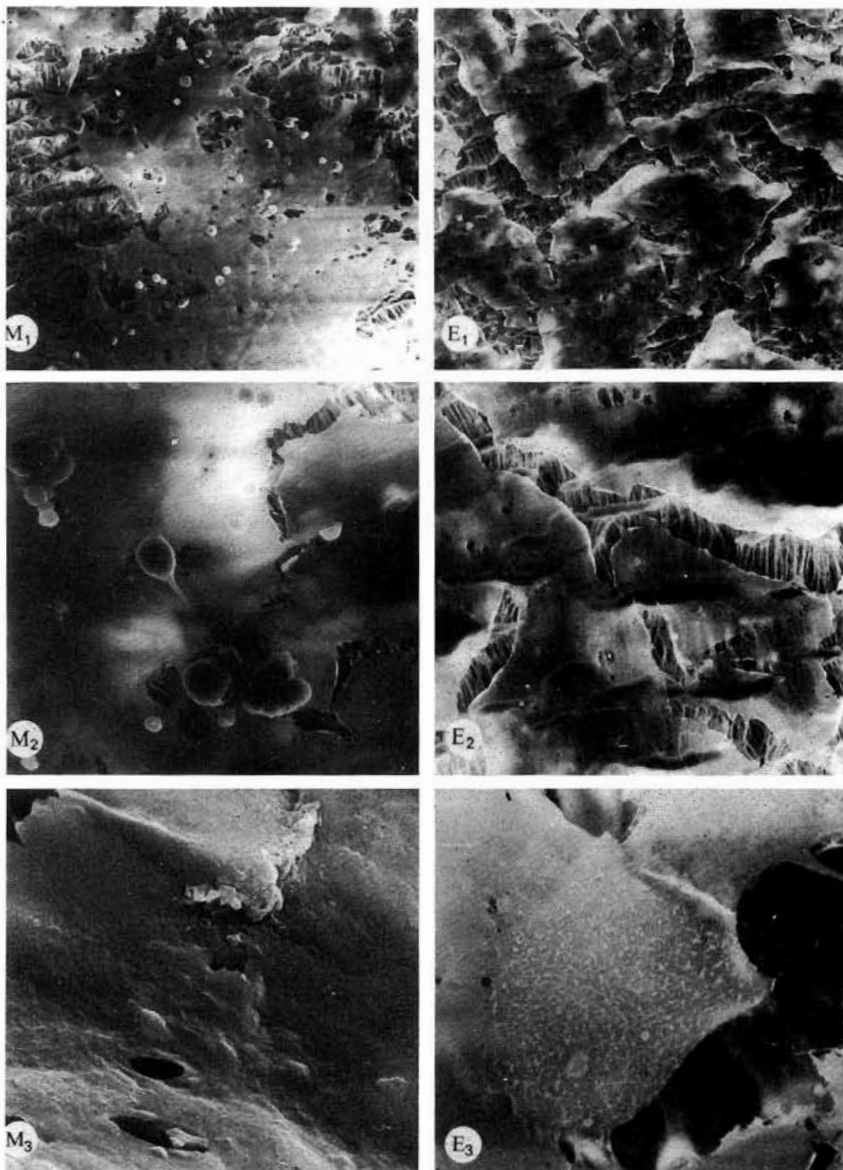
### Siembra

8 h. Las CM presentan una buena adherencia sobre la superficie del PTFE favorecida por la adición de fibronectina previa a la siembra. A este tiempo se observa toda la superficie protésica cubierta por células, en su mayoría todavía esféricas, que se sitúan algunas de ellas sobre un estrato de CM ya adheridas totalmente al substrato subyacente. Asimismo, estas células comienzan a anclarse sobre los nodos del PTFE, al igual que lo realizan las CE. La CM presenta un aspecto más denso debido a una mayor consistencia citoplasmática junto con una mayor capacidad de adhesión al PTFE.

24 h. Gran parte de la superficie del PTFE se halla recubierta por CM. Todavía se observan gran número de células redondeadas sobre la capa establecida (Fig. 2, M1), mientras que en el PTFE sembrado con CE el número de células esféricas en este estadio es mínima (Fig. 1, E1). La confluencia celular se establece en grandes áreas compactas para las CM, mientras que en el caso de las CE no se ha alcanzado el grado de confluencia y es posible distinguir los límites celulares. Cuando se

establece la monocapa, un mayor grosor de la misma es mostrado por las CM, mientras que las CE al ser sembradas forman una fina capa a través de la cual es posible observar la textura de la malla protésica (Fig. 2, M2, E2).

48 h. La cubierta celular en forma de monocapa confluyente se establece



**Fig. 2 - M1:** Comienzo de la formación de la monocapa de CM a las 24 h. de la siembra (200X). **E1:** CE adheridas al PTFE a las 24 h. de la siembra (200X). **M2:** La monocapa de CM presenta un mayor grosor (500X). **E2:** La monocapa de CE permite apreciar la textura del PTFE (500X). **M3:** Aspecto liso de la superficie apical de las CM a las 48 h. de la siembra (3000X). **E3:** Actividad de la CE a las 48 h. de la siembra, superficie apical con numerosas microvellosidades (2000X).

ce para ambas estirpes celulares. La superficie apical para las CM muestra un aspecto homogéneo y liso, mientras que para las CE la fina capa muestra una superficie mucho más lisa, siendo posible detectar alguna célula con actividad, como lo muestra la presencia de pequeñas microvellosidades en su superficie apical (Fig. 2, M3); (Fig. 2, E3).

4 d. La estabilidad de la capa comienza a perderse, observándose áreas denudadas de PTFE que indican la pérdida celular sobre el material protésico.

7-10 d. La superficie de PTFE que aparece recubierta por células es mínima. Sólo colonias de escaso número de células pueden ser observadas en la superficie protésica.

## Discusión

La posibilidad de utilizar omentum para la obtención de CM, supondría una gran ventaja en cuanto a poder disponer de una fuente de células destinadas a siembra, sin necesidad de recurrir a territorios venosos.

Las CM en cultivo presentan un comportamiento similar a las endoteliales (23, 28, 29, 30).

Para la identificación de estas células existe todavía controversia. Así, desde un punto de vista morfológico, para nosotros son perfectamente identificables por la característica disposición del glicocalix que rodea a la CM. Sin embargo, para otros autores (31) sería muy difícil llevar a cabo la identificación solamente por criterios histológicos.

Para la identificación celular se ha recurrido también a la utilización de anticuerpos monoclonales específicos. De estos, algunos para CE como CD-34 y factor VIII, son también positivos para CM, aunque en menor grado. En relación a estos marcadores, existen discrepancias entre los distintos autores; así para algunos (32, 33, 34, 35) las CM

muestran un patrón negativo para ellos, mientras que para otros (11, 28, 30, 34, 36, 37) dichas células presentan un patrón granular difuso pero positivo para los mismos. La presencia de células de contaminación en el cultivo de CM, tales como CE de microvasos o incluso fibroblastos, podría ser uno de los parámetros que indujesen a error. Así **Drouet** y cols. (38) demuestran la presencia de RNAm específico para el factor VIII, aun cuando no encuentren positividad para antígeno en células aisladas del omentum. Similar hecho ocurre con el Ag vimentina, a pesar de que existe positividad en relación inversa al caso anterior (es decir marcaje poco intenso para CE y muy intenso para CM). Este hecho vendría justificado por la presencia de una gran cantidad de filamentos que presenta el citoplasma de la célula mesotelial (23). Similares resultados han obtenido **Van Hinsbergh** y cols. (21), **Sterpetti** y cols. (18) y **Potzsch** y cols. (32).

La actividad funcional de ambos tipos celulares para producir prostaciclina, aunque en un principio sólo se creía potestativo de las CE, ha demostrado que las CM producen también tasas de prostaciclina similares o superiores a las endoteliales (28, 29, 30, 39).

En cuanto a los resultados de la siembra de CM, estamos de acuerdo con **Thomson** y cols. (34) al existir una mejor adhesión en los primeros momentos para las CM en comparación con las CE. Sin embargo, diferimos en el tiempo de formación de la monocapa confluyente que ellos establecen a 1 h. de la siembra, mientras que para nosotros no se alcanza hasta las 24 h. Esto quizás pueda ser debido a la diferente concentración de fibronectina utilizada 0,1 mg/ml versus 20 µg/ml.

Como se observa, no existe uniformidad en cuanto a proceso de identificación celular y comportamiento de las CM en la siembra. Ello

se debe fundamentalmente a que los métodos de aislamiento no están tan perfeccionados como para aislar una sola estirpe a partir del omentum. En la mayoría de los trabajos existe un concepto poco claro que permita diferenciar entre CE de microvasos y CM, así como tampoco existen marcadores específicos que completen esta información.

En nuestro estudio aportamos que las CM obtenidas a partir del omentum presentan un comportamiento similar a las endoteliales al ser sembradas sobre el PTFE. Sin embargo, es posible poner de manifiesto diferencias entre ambas estirpes celulares. Así, la formación de la monocapa mesotelial difiere en textura y grosor en relación a la endotelial. Otro hecho es que la superficie apical de la célula mesotelial permite diferenciarla de otras estirpes tales como endoteliales o fibroblastos (23). El criterio utilizado por otros autores (21, 33), como la de presentar un mayor número de microvellosidades en su superficie apical para las CM, no es posible observarlo tras su siembra sobre PTFE.

Por ello podemos **concluir** afirmando:

a) para nosotros existen diferencias evidentes tanto en cultivo como al ser sembradas sobre PTFE entre las CE y las CM;

b) las CM se presentan y comportan sobre el biomaterial del mismo modo que las CE y además producen prostaciclina. Ello nos permite considerarlas como una buena alternativa para la siembra de prótesis vasculares.

**Agradecimientos:** a la casa comercial **W. L. Gore & Ass. SARL**, por habernos proporcionado el material protésico.

**NOTA:** Se acompañan 38 citas bibliográficas, que pueden solicitarse del primer autor.