

Valoración de la siembra de células endoteliales y mesoteliales mediante el marcaje isotópico con oxinato de $\text{In}^{111(1)}$

Valoration of endothelial and mesothelial cell seeding by isotopic labelling with ^{111}In oxine

J. M. Bellón* - J. Buján*, N. G.^a-Honduvilla - J. De Haro**, C. Escudero**, J. Navlet*

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

Palabras clave: Siembra de células endoteliales; Siembra de células mesoteliales; In oxina.

SUMMARY

RESUMEN

En el presente trabajo se estudia la capacidad que poseen las células mesoteliales (CM) obtenidas de epiplón humano para incorporar In^{111} , en comparación con las que poseen células endoteliales (CE), procedentes de cordón umbilical. Se diseñaron tres grupos de estudio: Grupo Control, formado por prótesis de politetrafluoroetileno (PTFE) sin sembrar pero preincubadas con fibronectina; Grupo I, PTFE sembrado con CE; Grupo II, PTFE sembrado con CM.

Los tiempos de valoración del marcaje fueron establecidos a las 2,4,6 y 22 horas.

El comportamiento en cultivo y la actividad biológica fue similar en ambos tipos celulares, siendo los niveles de prostaciclina siempre superiores a 5 ng/ml.

En todos los tiempos de estudio el marcaje isotópico fue significativamente mayor en el grupo control que en los grupos sembrados con CM y CE.

La incorporación de In^{111} fue mayor en las CM.

El oxinato de In es un buen marcador tanto de CE como de CM, lo que permite que pueda ser utilizado para demostrar de una forma directa la existencia de una cubierta celular sobre la superficie protésica.

^{111}In oxine uptake was compared in mesothelial cells (MC) obtained from human omentum and endothelial cells (EC) from umbilical cord. Three study groups were created: Control Group, consisting of unseeded polytetrafluoroethylene (PTFE) prostheses preincubated with fibronectin; Group I, PTFE seeded with EC; Group II, PTFE seeded with CM. ^{111}In oxine uptake was studied at 2,4,6 and 22 hours.

The behaviour in culture and biological activity of EC and MC seeded on PTFE was similar and prostacyclin levels were consistently higher than 5 ng/ml. At every interval, ^{111}In oxine uptake was significantly greater in the control group than in the prostheses seeded with MC and EC; ^{111}In oxine uptake was greater in the MC group than in the EC group.

Indium oxinate is a good marker of EC and MC so it is therefore suitable for directly demonstrating the presence of a cell layer over a prosthetic surface.

Key words: Endothelial cell seeding; Mesothelial cell seeding; ^{111}In oxine.

Introducción

La adhesión celular tras siembra sobre prótesis vasculares de pequeño calibre sigue siendo hoy en día uno de los problemas todavía sin resolver.

A pesar de las diferentes estirpes celulares utilizadas (1, 2) y de las numerosas moléculas (3-5) y matri-

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

** Clínica Puerta de Hierro, Madrid (España).

(1) El presente trabajo ha sido realizado con una Ayuda de Investigación CICYT SAF 92-0875.

ces de adhesión ensayadas (6), no se han encontrado soluciones válidas al respecto.

Para determinar la superficie que permanece recubierta después de realizada la siembra celular se suelen utilizar diferentes radiofármacos, uno de ellos es el oxinato de In^{111} . Este isótopo es fácilmente incorporado por las plaquetas y éstas, marcadas radioactivamente, han sido utilizadas para la realización de mediciones indirectas de la superficie protésica recubierta por células endoteliales (CE) tras la siembra (7). Como han descrito otros autores (8, 9, 10), el In^{111} también puede ser incorporado directamente por otros tipos celulares, como las propias CE, de tal forma que este hecho puede ser utilizado para la realización de mediciones directas de la adhesión celular a la superficie protésica sembrada.

Por otro lado, como hemos referido en anteriores trabajos (11), se están buscando fuentes alternativas a la utilización de CE de vasos para el recubrimiento de prótesis vasculares. Una de estas fuentes es el epiplón humano y, concretamente, la utilización de células mesoteliales (CM) obtenidas del mismo. Es por ello que el objetivo del presente trabajo se centra en el estudio de la capacidad que poseen las CM de incorporar In^{111} en comparación con la que poseen las CE una vez realizada la siembra.

Material y métodos

Obtención y cultivo celular

a) Células mesoteliales (CM)

Las CM se obtuvieron de fragmentos de 30-40 g de epiplón humano, obtenidos de donantes en el curso de intervenciones de cirugía abdominal reglada.

Los fragmentos de epiplón fueron transportados al laboratorio sumergidos en Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO BRL), suplementado con antibióticos (100000 UI/ml penicilina/10000 µg/ml estreptomycin) (GIBCO BRL) y antimicóticos (25 µg/ml fungizona) (GIBCO BRL).

Una vez en el laboratorio, los fragmentos de epiplón fueron procesados por tratamiento enzimático con colagenasa tipo I al 0.1% (Worthington) a fin de obtener las CM, para lo cual utilizamos la técnica de Kern y cols (12) con algunas modificaciones (2).

b) Células endoteliales (CE)

Las CE fueron obtenidas a partir de venas umbilicales humanas, mediante tratamiento enzimático con colagenasa tipo I al 0.1% (Worthington). Posteriormente, las células fueron puestas en cultivo siguiendo la metodología descrita por Gimbrone (13).

Una vez extraídas, tanto las CE como las CM se cultivaron en M-199 (GIBCO BRL) suplementado, de acuerdo a la metodología descrita por nosotros mismos (2) e incubadas a 37°C en estufa de CO_2 (5% de CO_2), hasta formar una monocapa confluyente en toda la superficie del frasco, renovando el medio de cultivo cada 2 días.

Una vez formada la monocapa, se procedió a la realización de subcultivos celulares con el objeto de tener un número de células lo suficientemente elevado como para asegurarnos el completo recubrimiento de la superficie protésica después de la siembra. Para la realización de estos subcultivos se trató la monocapa celular con una suspensión de tripsina-EDTA (GIBCO BRL) al 1% en MEM durante 5 minutos a 37°C, como consecuencia de lo cual se produjo el levantamiento y disgregación de las células que conformaban la monocapa. Transcurrido el tiempo de incubación, la enzima proteolítica fue inactivada mediante la adición de M-199 suplementado con suero fetal (GIBCO BRL), obteniéndose una suspensión celular que fue dividida en frascos de cultivo a razón 1:2 o 1:3.

Recuento e Identificación celular

El número de células viables obtenido, tanto de las piezas de epiplón como de vena umbilical, se determinó mediante la prueba de Azul Tripán.

La identificación celular se realizó mediante técnicas inmunohistoquímicas utilizando anticuerpos anti-Factor VIII, anti CD34 y anti-Vimentina.

Producción de prostaciclina

La capacidad de ambas estirpes celulares para producir prostaciclina fue determinada mediante técnicas de radioinmunoensayo (RIA) por medición de los niveles de 6-keto-prostaglandina $\text{F}_{1\alpha}$ (Amersham), intermediario estable en la ruta metabólica de la síntesis de prostaciclina.

Siembra celular

La siembra, tanto de CE como de CM, se realizó sobre pequeños fragmentos (1.5 cm²) de politetra-

fluoroetileno (PTFE) (W.L. GORE & ASS.), para lo cual se construyeron unas cámaras de siembra utilizando la parte superior de un tubo Ependorff, según técnica descrita por Budd y cols. (9).

Antes de realizar la siembra la superficie protésica fue incubada durante 1 h. a 37°C con una solución de fibronectina ($20 \mu\text{g/ml}$). Una vez transcurrido este tiempo, las células fueron levantadas del frasco de cultivo por tratamiento enzimático con una solución de tripsina EDTA al 1%. Tras su levantamiento y disgregación, las células fueron sembradas sobre el material protésico en una concentración de $1,5\text{--}2 \times 10^5$ células/ cm^2 (14).

Marcaje celular con oxinato de In^{111}

A las 24 h. posteriores a la siembra, es decir, cuando las células ya han formado una monocapa sobre la superficie protésica, se procedió al marcaje celular con oxinato de In^{111} ($3\mu\text{Ci}$). Se añadieron en cada pocillo $100 \mu\text{l}$ de radiofármaco y se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se retiró el sobrante de radiofármaco lavando 3 veces con PBS.

Diseño experimental

Se establecieron 3 grupos de estudio: *Control*: PTFE sin sembrar pero preincubado con fibronectina ($n=4$); *Grupo I*: PTFE sembrado con CE ($n=8$); *Grupo II*: PTFE sembrado con CM ($n=8$).

Los tiempos de valoración del marcaje celular fueron de 2, 4, 6 y 22 horas, lavando dos veces con PBS después de cada tiempo de estudio. Esta valoración fue llevada a cabo en un contador de centelleo de partículas γ .

Se realizó un diseño estadístico con datos apareados a lo largo de los tiempos de estudio en cada grupo y con datos independientes entre los grupos, aplicando una ANOVA y el test de comparaciones múltiples de Newman-Keuls.

Resultados

Ambas estirpes celulares empleadas presentan un buen comportamiento en cultivo, formando una monocapa estable sobre la superficie del frasco de cultivo a los pocos días de realizado. Asimismo, una vez sembradas las células, tanto endoteliales como

mesoteliales, colonizaron totalmente la superficie protésica 24 horas después de la realización de la siembra, pudiéndose observar una superficie perfectamente recubierta por una capa celular estable (Fig. 1 y 2).

En cuanto a la respuesta inmunohistoquímica y actividad biológica celular, medida por la capacidad de producir prostaciclina, tanto las CE como las CM se comportaron siguiendo el mismo patrón, ambos tipos fueron, en mayor o menor medida, positivos frente a los anticuerpos utilizados y, en ambos casos, los niveles de prostaciclina sintetizados fueron superiores a los 5ng/ml .

Las mediciones realizadas tras el marcaje con Oxinato de In^{111} mostraron en el grupo control que la cantidad de radioactividad retenida por la prótesis disminuye considerablemente después del primer lavado, es decir, a las 2 horas de realizado el marcaje. A partir de este momento, el radiofármaco perdura sobre la prótesis hasta las 22 horas, tiempo en el cual podemos observar una importante pérdida de radioactividad (Fig. 3).

En el Grupo I, el marcaje disminuye considerablemente a las 2 h., manteniéndose posteriormente hasta pasadas las 22 h. (Fig. 3).

El comportamiento de las CM en cuanto a la incorporación de In^{111} , Grupo II, fue similar al observado en el caso de las CE. La incorporación inicial fue muy elevada, sin embargo, a medida que transcurre el tiempo, la liberación de radiofármaco es muy pronunciada, siendo muy notoria durante los primeros lavados, es decir hasta las 2-4 horas posteriores al marcaje, manteniéndose más o menos estable hasta el final de los tiempos de estudio (Fig. 3).

Si comparamos los resultados obtenidos en cada uno de los grupos, podemos comprobar cómo en todos los tiempos de estudio el marcaje es mucho mayor en el grupo control que en los grupos en los que el PTFE ha sido sembrado, tanto con CE como con CM. Por otra parte, podemos apreciar cómo el modelo de comportamiento de ambas estirpes celulares frente al oxinato de In^{111} es similar, siendo la incorporación del mismo algo superior en las CM.

Discusión

Tanto las CE como las CM tienen un buen comportamiento en cultivo, sin embargo, al ser sembra-

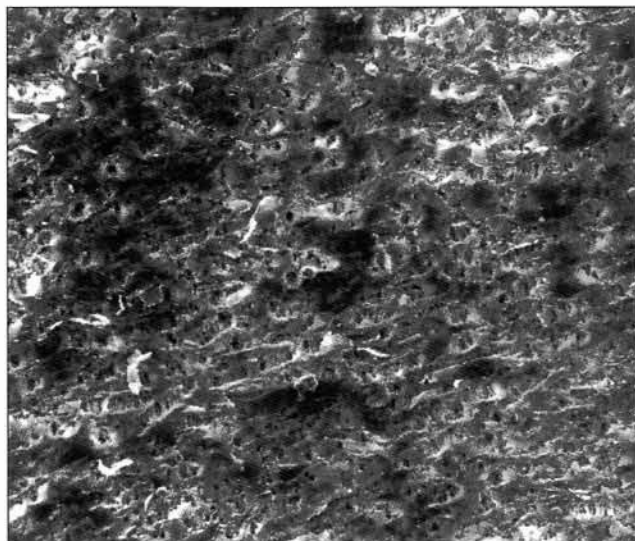


Fig. 1. Monocapa de células endoteliales sobre la superficie protésica a las 24 horas de la siembra (100X).

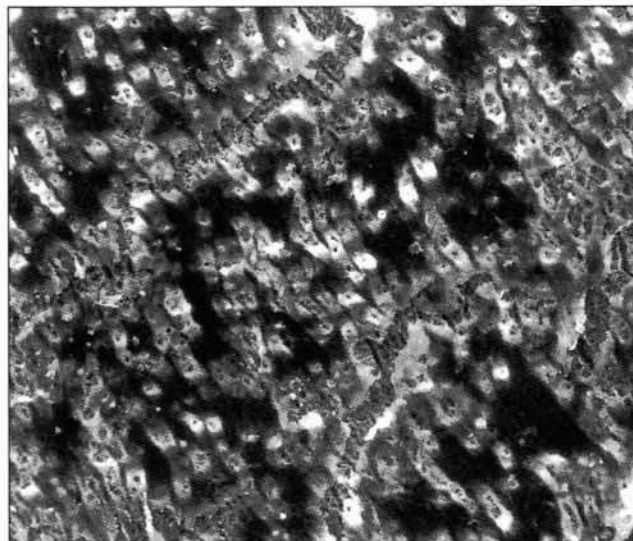


Fig. 2. Monocapa de células mesoteliales sobre la superficie protésica a las 24 horas de la siembra (100X).

das sobre materiales protésicos las propiedades antiadherentes de éstos hacen que las células no perduren durante mucho tiempo sobre su superficie. De todos los materiales probados parece ser el PTFE preincubado con fibronectina el que mejores resultados está dando (15), y es por ello por lo que decidimos utilizar este biomaterial en nuestros estudios de adhesión celular, utilizando el oxinato de In^{111} como indicador de la superficie cubierta a las 24 h de realizada la siembra.

Nuestros resultados muestran que cuando se realiza el marcaje con oxinato de In^{111} existe una gran afinidad del radiofármaco por la fibronectina, que es la molécula de adhesión más utilizada por ser la proteína que mejores resultados ha ofrecido en el campo de las siembras de prótesis vasculares al ser comparada con otras moléculas (4, 5, 9).

La propiedad que presenta el In de tener una gran afinidad por las proteínas explicaría los altos niveles de radioactividad observados en todos los tiempos de estudio en el grupo control, especialmente hasta las 22 h. En este tiempo, se observa una importante caída en los niveles de radiación, fácilmente explicable por la progresiva degradación y eliminación de la fibronectina de la superficie protésica (5).

Al comparar estos resultados con los obtenidos en los grupos en los que se ha realizado la siembra, la incorporación de In marcado es menor en éstos que

en el grupo control. Ello indicaría la presencia de una capa celular sobre la superficie protésica. Estos resultados concuerdan con las observaciones realizadas mediante microscopia electrónica de barrido, en las que se aprecia, a las 24 horas de la siembra, que la superficie protésica está totalmente tapizada por una capa celular, tanto en las pruebas realizadas con CE como con CM (2).

La estabilidad del marcaje a partir de las 4-6 h. y tras los sucesivos lavados es una prueba más que indica una buena adhesión celular sobre la superficie protésica, independientemente de la estirpe empleada para la siembra.

Nuestros resultados muestran un mayor marcaje en las prótesis sembradas con CM frente a las sembradas con CE. Este hecho puede ser debido a una mayor incorporación de In por parte de estas células, lo cual parece lógico si tenemos en cuenta la enorme capacidad de síntesis observada en estas células tanto por microscopia electrónica de barrido como de transmisión.

Por otra parte, estudios previos sobre el marcaje de CE con oxinato de In^{111} en sistemas de flujo muestran que la incorporación de In a las CE es posible (16) y que, además, lo hace en cantidades lo suficientemente elevadas como para poder ser detectado mediante contador de centelleo. Sin embargo, después de ser sometido a flujo las CE se desprenden

RETENCION DE In^{111}

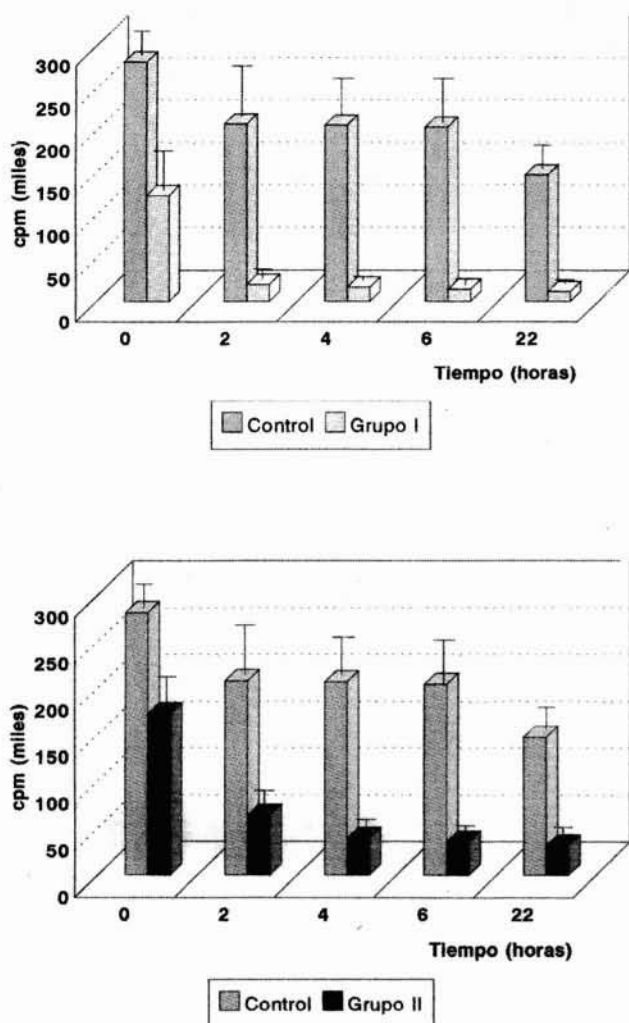


Fig. 3. Retención de In^{111} por parte de las células endoteliales y mesoteliales en relación al grupo control.

del biomaterial, lo que se traduce en una disminución en los niveles de radioactividad detectados. Pero estos resultados no son compartidos por todos los autores, ya que algunos equipos son contrarios a la utilización del oxinato de In^{111} por considerarlo poco apto para el marcaje de CE (17). A pesar de sus detractores, nosotros hemos observado una buena incorporación de Indio marcado tanto en CE como en CM, y su comportamiento en un sistema estático no pone de manifiesto ningún tipo de alteración en la cubierta celular, ni a las 24 h. de realizada la siembra, ni en los tiempos posteriores estudiados.

Por todo ello podemos concluir que:

a) el oxinato de In^{111} es un buen marcador tanto para CE como para CM, lo que nos permite utilizarlo para demostrar de una forma directa la existencia de una cubierta celular sobre la superficie protésica, hecho que vendría siempre refrendado por las observaciones realizadas a microscopia electrónica de barrido.

b) las CM tiene mayor capacidad que las CE para incorporar el radiofármaco, debido entre otros factores a su mayor capacidad de síntesis.

c) el In tiene una gran afinidad por las proteínas, en nuestro caso concreto por la fibronectina, lo que hace necesario que el marcaje celular se realice antes del proceso de siembra, teniendo de esta manera la certeza de que toda la radioactividad encontrada sobre la superficie protésica es debida a la incorporación del radiofármaco por parte de las células y no a su unión a la fibronectina o a la propia superficie protésica.

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

BIBLIOGRAFÍA

1. BUJÁN, J.; BELLÓN J. M.; NAVLET, J.; G.^a HONDUVILLA, N.; HERNANDO, A.; TURÉGANO, F.: Seeding of expanded polytetrafluoroethylene (ePTFE) vascular grafts. A morphological study of porcine endothelial and fibroblast cells. *Histol. Histopathol.* 1992; 7: 635-642.
2. BELLÓN, J. M.; BUJÁN, J.; G.^a HONDUVILLA, N.; MINGUELA, F.; HERNANDO, A.: Utilidad de las células mesoteliales obtenidas de epiplón humano para el recubrimiento de prótesis vasculares de politetrafluoroetileno (PTFE). Estudio comparativo con células endoteliales de vena umbilical. *Angiología*, 1994; 2: 44-48.
3. ANDERSON, J. S.; PRICE, T. M.; HANSON, S. R.: In

- vitro endothelialization of small-caliber vascular grafts. *Surgery*, 1987; 101: 577-586.
4. THOMSON, G. J. L.; VOHRA, R. K.; CARR, M. H.; WALKER, M. G.: Adult human endothelial cell seeding using expanded polytetrafluoroethylene vascular grafts: A comparison of four substrates. *Surgery*, 1991; 109: 20-27.
5. G.^a HONDUVILLA, N.; BUJÁN, J.; LIZARBE, M. A.; BELLÓN, J. M.; OLMO, N.; HERNANDO, A.: Adhesion and stability of fibronectin on PTFE before and after seeding with normal and synchronized endothelial cells. *Artif. Organs*, 1994 (En prensa)
6. BELLÓN, J. M.; BUJÁN, J.; G.^a HONDUVILLA, N.; HERNANDO, A.; NAVLET, J.: Endothelial cell seeding of polytetrafluoroethylene vascular prostheses coated with a fibroblastic matrix. *Ann. Vasc. Surg.*, 1993; 7: 549-555.
7. BEARN, P. E.; SEDDON, A. M.; MCCOLLUM, C. N.; MARSTON, A.: Mesothelial seeding of knitted Dacron. *Br. J. Surg.*, 1993; 80: 587-591.
8. SHAREFKIN, J. B.; LATHER, C.; SMITH, M.; RICH, N. M.: Endothelial cell labeling with Indium-111 oxine as a marker of cell attachment to bioprosthetic surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1983; 17: 345-357.
9. BUDD, J. S.; BELL, P. R. F.; JAMES.: Attachment of Indium-111 labelled endothelial cells to pretreated polytetrafluoroethylene vascular graft. *Br. J. Surg.*, 1989; 76: 1259-1261.
10. STANSBY, G.; BERWANGER, C.; SHUKLA, N.; SCHMITZ-RIXEN, T.; HAMILTON, G.: Endothelial seeding of compliant polyurethane vascular graft material. *Br. J. Surg.*, 1994; 81: 1286-1289.
11. HERNANDO, A.; G.^a HONDUVILLA, N.; BELLÓN, J. M.; BUJÁN, J.; NAVLET, J.: Coatings for vascular prostheses: Mesothelial cells express specific markers for muscle cells and have biological activity similar to that of endothelial cells. *Eur. J. Vasc. Surg.*, 1994; 8: 531-536.
12. KERN, P. A.; KNEDLER, A.; ECKEL, R. H.: Isolation and culture of microvascular endothelium from human adipose tissue. *J. Clin. Invest.*, 1983; 71: 1822-1829.
13. GIMBRONE, M. A.: Culture of vascular endothelium. *Prog. Hemost. Thromb.*, 1976; 31: 1-28.
14. BELLÓN, J. M.; BUJÁN, J.; G.^a HONDUVILLA, N.; NAVLET, J.; HERNANDO, A.; TURÉGANO, F.: Porcine endothelial cell seeding onto polytetrafluoroethylene (PTFE): A comparative study with grafts of different porosities. *Res. Surg.*, 1993; 5: 7-12.
15. BELLÓN, J. M.; BUJÁN, J.; G.^a HONDUVILLA, N.; HERNANDO, A.; NAVLET, J.: Adhesion of seeded endothelial cells to different materials used in vascular prostheses. *Res. Surg.*, 1993; 5: 69-75.
16. SCHNEIDER, P. A.; HANSON, S. R.; PRICE, T. M.; HARKER, L. A.: Confluent durable endothelialization of endarterectomized baboon aorta by early attachment of cultured endothelial cells. *J. Vasc. Surg.*, 1990; 11: 365-372.
17. KRAAL, G.; GELDOF, A. A. Radiotoxicity of Indium. *J. Immunol. Methods.*, 1979; 31: 193-195.