

El factor de crecimiento endotelial vascular induce proteínas de matriz extracelular y osteopontina en la arteria umbilical

Manfred Infanger¹, Jirka Grosse², Kriss Westphal², Annekatriin Leder², Claudia Ulbrich², Martin Paul² y Daniela Grimm², Berlín, Alemania

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un mediador mitogénico, angiogénico y potente estimulador de la permeabilidad vascular. Desempeña un papel importante en los traumatismos, contribuye a la aparición de edema durante el estadio agudo de una lesión tisular y favorece su reparación. Recientemente, en pacientes quemados con lesión vascular asociada, demostramos un aumento significativo de las concentraciones séricas de este factor. En el presente estudio, examinamos sus efectos sobre vasos sanos tratados con una concentración de VEGF comparable a la obtenida en pacientes que son víctimas de grandes quemaduras. Se aplicó intraluminalmente VEGF 165 (0,2 ml de 10 ng/ml) o excipiente (suero fisiológico al 0,9%) a las arterias umbilicales a 37 °C. Acto seguido, se perfundió el cordón umbilical durante 4 h. Durante la perfusión, los parámetros funcionales y bioquímicos se mantuvieron dentro de límites fisiológicos normales. Posteriormente, se analizaron los vasos mediante morfometría, tinción con rojo sirio, microscopia de polarización, análisis Western blot e inmunohistoquímica. Además, las células endoteliales de la vena umbilical humana (CEVUH) en cultivo se trataron con VEGF o excipiente durante 90 min y 5,5 h para examinar las proteínas de matriz extracelular (ECM) y el receptor de las tirosininasas. En las arterias umbilicales tratadas con VEGF se demostró un edema tisular significativo y, al mismo tiempo, un aumento de la laminina y de colágeno de tipo I, III y IV, comparado con las arterias de control. Detectamos un aumento de Flt-1, Flk-1, osteopontina y beta₁-integrina. El VEGF indujo precozmente laminina en las CEVUH según lo determinado mediante flujocitometría. Paralelamente, al cabo de 90 min, el VEGF indujo una mayor cantidad de osteopontina, beta₁-integrina y ambos receptores de las tirosininasas en células endoteliales. La aplicación intraluminal de VEGF aumenta la producción de proteínas ECM, osteopontina y beta₁-integrina, mientras todavía genera edema tisular. El VEGF inicia el remodelado vascular al mismo tiempo que genera edema, aun cuando el vaso diana no esté lesionado. La osteopontina y la beta₁-integrina, ambas inducidas por VEGF, podrían desempeñar un importante papel en el proceso de remodelado vascular.

INTRODUCCIÓN

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un mitógeno específico de la célula endotelial *in vitro* y un mediador clave de la angiogénesis y la permeabilidad vascular *in vivo*¹⁻⁶. Esta proteína de 45 kDa consiste en dos subunidades, que induce casi exclusivamente la proliferación de células endoteliales. Se han descrito cinco isoformas humanas con un número diferente de aminoácidos⁷ (VEGF 121, 145, 165, 189 y 206). El VEGF 121 y el VEGF 165 son isoformas solubles y las más abundantes. El VEGF 165 es un importante estimulador de la proliferación de células endoteliales⁸, y el VEGF 121 es responsable del aumento de la

DOI of original article: 10.1016/j.avsg.2007.11.002.

M. I. y J. G. contribuyeron por igual a esta investigación.

¹Department of Trauma and Reconstructive Surgery, Charité-Universitätsmedizin, Berlín, Alemania.

²Institute of Clinical Pharmacology and Toxicology, Charité-Universitätsmedizin, Berlín, Alemania.

Correspondencia: Daniela Grimm, MD, Institute of Clinical Pharmacology and Toxicology, Charité-University Medicine Berlin, CBF, Garystrasse 5, D-14195 Berlín. Correo electrónico: daniela.grimm@charite.de

Ann Vasc Surg 2008; 22: 273-284

DOI: 10.1016/j.avsp.2008.06.002

© Annals of Vascular Surgery Inc.

Publicado en la red: 17 de marzo de 2008

permeabilidad vascular⁹. La expresión de VEGF está controlada por la diferenciación, transformación y aporte de oxígeno. El efecto del VEGF está mediado por dos receptores de la tirosinacinas, VEGFR-1/flt-1 (tirosinacinas I similar a fms) y VEGFR-2/flk (cinasa I hepática fetal)/KDR, que se localizan casi exclusivamente en las células endoteliales.

Las células endoteliales de la íntima están muy especializadas con funciones endocrinas, exocrinas, de adhesión celular, de coagulación y transporte, y desempeñan un importante papel en los mecanismos del flujo sanguíneo, regulación de la coagulación, adhesión leucocitaria y crecimiento de la célula muscular lisa vascular; también sirven de barrera a la difusión transvascular de líquidos y solutos. Pueden adaptarse rápidamente a los cambios de su medio^{7,10}. Cuando, por ejemplo, lesiones como las quemaduras o una lesión cerebral traumática afectan al tejido circundante, aumenta la permeabilidad vascular, lo que se traduce en un edema tisular local y general. El VEGF parece participar en estos procesos, puesto que Harrigan et al¹¹ demostraron que la infusión intraventricular de este factor favorece la angiogénesis con un edema cerebral mínimo. Nuestro grupo demostró que el nivel de VEGF aumenta significativamente en pacientes con quemaduras extensas, graves¹².

Además del VEGF, en el sistema de extravasación y remodelado vascular participan integrinas y componentes de la matriz extracelular (ECM). Recientemente, demostramos que la aplicación intraluminal de VEGF es beneficiosa para el proceso de curación en microcirugía vascular y que la curación de una anastomosis microvascular se acompaña de un aumento de proteínas ECM¹³. En los vasos sanguíneos son detectables muchas de estas proteínas, incluidos diversos tipos de colágeno, fibronectina, laminina y vitronectina¹⁴⁻¹⁶. Algunas de ellas son los ligandos de las integrinas, que son moléculas transmembrana heterodiméricas que constan de una subunidad alfa y otra beta. Los receptores de adhesión de la beta₁-integrina median la fijación de las células endoteliales a la ECM y facilitan su crecimiento, migración y capacidad para depositar proteínas de matriz. Son importantes factores de la reestenosis y la aterogénesis¹⁷. No se ha investigado todavía cómo influye el VEGF en la expresión de las integrinas y cómo afecta a los diversos componentes de la ECM.

No obstante, se sabe que la lesión de un número considerable de vasos, como lo observado en pacientes que son víctimas de una quemadura de, como mínimo, el 30% del área de superficie corporal, desencadena una notable expresión de VEGF¹². Entre la primera y tercera semanas después del

accidente, la concentración sérica de VEGF aumenta como mínimo ocho veces comparado con lo normal. Podría ser una importante razón de la muerte de muchos pacientes. Por lo tanto, estábamos interesados en estudiar los efectos de concentraciones elevadas de VEGF sobre los vasos normales.

Con este objetivo, aplicamos un modelo de perfusión *ex vivo* que ya ha demostrado ser útil para un corazón funcionando hemoperfundido aislado *ex vivo*^{18,19}. Este sistema de simulador permite estudios en condiciones de flujo fisiológico normal, así como el registro en línea del flujo y la presión. Posteriormente, examinamos la presencia de edema y evaluamos simultáneamente un posible efecto de remodelado. Determinamos la expresión de integrinas, proteínas de ECM y receptor de las tirosinacinas en la arteria umbilical bajo la influencia de VEGF. Además, investigamos los efectos del factor sobre las células endoteliales de la vena umbilical humana (CEVUH) para examinar los cambios de las proteínas ECM y mostrar cómo este factor actúa en el endotelio umbilical *ex vivo* e *in vitro*.

MÉTODOS

Selección y transporte de órganos

Se obtuvieron 20 cordones umbilicales a partir de la Neonatal Unit del Charité-University Hospital (Berlín, Alemania). Su procedencia era de mujeres sanas y normotensas (valores normales de presión arterial, sin infección ni diabetes) después de dar a luz por cesárea a un recién nacido a término. Los criterios de exclusión fueron la presencia de lesiones vasculares o anomalías del propio cordón umbilical. Se extrajeron segmentos aislados de 12 cm de longitud. Inmediatamente después del parto, el cordón umbilical se preparó cuidadosamente y se introdujo en una solución isotónica. A continuación, se transportaron hasta el laboratorio al cabo de una hora (conservados en suero fisiológico frío [4 °C]).

Preparación del cordón umbilical

Después de su examen macroscópico (exclusión de anomalías, p. ej., arteria umbilical única, acodadura o angulaciones, oclusión parcial o completa), se prepararon 20 cordones umbilicales. Una parte de estas muestras se consideraron controles no perfundidos (Cnp, n = 20). Usando microscopía, se prepararon y canularon la arteria y vena umbilical (tubo de alimentación pediátrico). Los catéteres se fijaron con material de sutura quirúrgica (Vicryl 3-0; Ethicon, St-Stevens-Woluwe, Bélgica) a los vasos. Más tarde, se inyectaron a través del catéter arterial 0,2 ml de

VEGF 165 (grupo VEGF n = 10, 10 ng/ml; Chemicon, Hofheim, Alemania) o excipiente (grupo Cp, n = 10, suero fisiológico al 0,9%) y 0,2 ml de colorante azul de Evans (Merck, Darmstadt, Alemania; al 2% diluido en suero fisiológico) (grupos perfundidos). Más tarde, las arterias del cordón umbilical se incubaron a 37 °C durante 90 min en la cámara de perfusión.

Modelo de perfusión del cordón umbilical

Después del acondicionamiento (90 min), los cordones umbilicales del grupo Cp y el grupo VEGF se conectaron con el modelo de perfusión, descrito recientemente^{18,19}, al mismo tiempo que sirvieron como controles las 20 muestras de cordón umbilical no perfundido (control cero) (Cnp). Acto seguido, se restableció una temperatura de 37 °C iniciándose la perfusión con una solución de dializado humano (1.872,3 ml de agua bidestilada estéril, 57,1 ml de solución de hemodiálisis SW 239 A9; Braun, Melsungen, Alemania) y 70 ml de una solución de hemodializado de bicarbonato (bicarbonato 8,4%, Braun) para la perfusión. La solución (pH 7,4) contenía 140 mmol/l de Na⁺, 2 mmol/l de K⁺, 1,75 mmol/l de Ca⁺⁺, 0,75 mmol/l de Mg⁺⁺, 112 mmol/l de Cl⁻, 32 mmol/l de HCO₃⁻; 84 g/l de NaHCO₃, 3 mmol/l de CH₃COO⁻ y 2 g/l de glucosa. De acuerdo con el protocolo, la circulación de perfusión contenía 1.250 ml de solución de dializado. Aunque la solución de perfusión se bombeó a través del cordón umbilical durante 4 h, mediante un intercambiador de calor conectado a un baño de agua se mantuvo a 37 °C y se oxigenó mediante un flujómetro (DK800R; Krohne, Duisburg, Alemania) con una mezcla de oxígeno y dióxido de carbono (95% de O₂ y 5% de CO₂). Los datos hemodinámicos se monitorizaron usando un microcontrolador introducido en un ordenador personal con un programa específico (Mediport Biotechnik, Berlín, Alemania) evaluando continuamente los parámetros siguientes: tasa de flujo, presión de perfusión arterial y venosa. Efectuamos un análisis continuo de la solución con respecto a su pH y temperatura (37 °C) al igual que análisis de los gases de la solución durante el experimento (ABL 555; Radiometer, Copenhagen, Dinamarca). Además, en el medio de perfusión se determinó la concentración de sodio, potasio, calcio y bicarbonato^{18,19}. A las 1, 2 y 3 h, se inyectó 1 ml de azul de Evans en la arteria umbilical a través de una válvula de tres vías (llave de paso).

Experimento de cultivo de células

Las CEVUH y un medio de crecimiento de células endoteliales (listo para usar) se adquirieron a partir

de Promocell (Heidelberg, Alemania). Los 30 cultivos de células se trataron con excipiente (suero fisiológico al 0,9%) o VEGF 165 (10 ng/ml) durante 90 min o 5,5 h. De cada grupo, cinco muestras se fijaron con etanol (70%) y otras cinco muestras se sometieron a congelación rápida para análisis Western blot.

Evaluación histológica y microscopia de polarización

Para la histología, se obtuvieron cortes transversos de tejido del cordón umbilical (n = 10, cada grupo) y se tiñeron con hematoxilina-eosina y rojo sirio como colorantes específicos de estructuras del tejido conjuntivo^{13,20}. Los cortes se sumergieron en el fijador Methacarn, se fijaron en parafina y se cortaron en secciones de 3 µm de grosor. Se efectuó una tinción estandarizada usando el sistema Robot-Stainer (Robot-Stainer HMS 760; Microm International, Walldorf, Alemania). Los vasos se visualizaron utilizando un microscopio Zeiss (Overkochen, Alemania) Axiophot. Se analizó el endotelio, la estructura vascular, la gelatina de Wharton y epitelio amniótico. La microscopia de polarización se efectuó de acuerdo con Junqueira et al²⁰. El colágeno de tipo I se presenta en color amarillo, naranja o rojo, mientras que el de tipo III aparece de color verde.

Inmunohistoquímica

Los anticuerpos utilizados para este estudio se dirigieron contra el colágeno de tipo IV (1:100; Dako, Hamburgo, Alemania), laminina (prediluida, equipo de Sigma, Taufkirchen, Alemania), VEGF-A (1:50, Chemicon), Flk-1, Flt-1 (ambos 1:50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) y osteopontina (1:100, Developmental Studies Hybridoma Bank, Department of Biological Sciences, University of Iowa, Iowa City, IA). Los complejos antígeno-anticuerpo se visualizaron con la técnica de la inmunoperoxidasa indirecta^{21,22}.

Análisis automático de las imágenes

El análisis automático de las imágenes se aplicó para evaluar cuantitativamente los cambios intersticiales del edema en tejidos perfundidos de cordón umbilical y la distribución de las proteínas ECM, usando para ello un dispositivo de análisis de imágenes asistido por ordenador^{18,19,21,22} (Olympus Optical, Hamburgo, Alemania).

Análisis flujocitométrico de la laminina

En cada prueba, se añadieron anticuerpos monoclonales a 10⁵ de células individuales que se habían

preparado y fijado en etanol (70%), como se ha descrito previamente²³. Las células se incubaron con el anticuerpo anti-laminina no conjugado (laminina, Sigma), durante 60 min, a temperatura ambiente en la oscuridad y se lavaron tres veces con suero fisiológico neutralizado con fosfato que contenía un 2% de suero de ternera fetal. Las células se trataron de nuevo durante 60 min a temperatura ambiente con isotiocianato de fluoresceína, se conjugaron con el antisuero anti-inmunoglobulina G de conejo (Dako) y se lavaron. Las suspensiones de células se analizaron con un flujocitómetro Facscan (Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania) provisto de un láser de argón, como se ha descrito previamente²³. Se consideraron positivas las células que ejercieron intensidades de fluorescencia por encima del límite superior de la distribución del control negativo.

Contenido de agua

Los cortes de tejido de cordón umbilical se pesaron y desecaron durante 24 h a 95 °C. Después de pesarlos, el porcentaje del contenido de agua del cordón umbilical se calculó del modo siguiente:

$$\%H_2O = \left[\frac{\text{peso en humedo} - \text{peso en seco}}{\text{peso en humedo}} \right] \times 100$$

Análisis Western blot

Al término de la perfusión, las arterias se separaron cuidadosamente de la gelatina de Wharton utilizando instrumentos de microdissección. La extracción de proteínas, la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico y la inmunotransferencia se efectuaron siguiendo los protocolos habituales^{18,19,22,24}. Se efectuaron seis repeticiones. Para el presente estudio se utilizaron anticuerpos contra los antígenos siguientes: colágeno tipo IV (1:1.000, Dako), laminina (1:1.000, Chemicon), beta₁-integrina (1:1.000; BD Transduction Laboratories, San Jose, CA), osteopontina (1:1.000; Developmental Studies Hybridoma Bank), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH, 1:1.000; Affinity BioReagents, Golden, CO), VEGF (1:1.000, Chemicon), Flk-1 y Flt-1 (1:1.000, ambos a partir de Santa Cruz Biotechnology).

Evaluación estadística

El análisis estadístico se efectuó usando el programa SPSS 11.5 (SPSS, Inc, Chicago, IL). Todos los datos se expresaron como medias ± desviación estándar. Examinamos todos los parámetros para las

desviaciones de la distribución gaussiana mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov y comparamos los casos mediante el uso de pruebas t para datos independientes o la prueba de Mann-Whitney (en función de los resultados de la prueba de normalidad). Las diferencias se consideraron significativas con un valor de $p < 0,05$.

RESULTADOS

Después de un tiempo de incubación de 90 min con VEGF o excipiente, seguido de un período de perfusión de 4 h, se determinaron la morfología y contenido de agua del cordón umbilical, así como su contenido en proteínas ECM, beta₁-integrina, osteopontina y VEGF y su receptor tirosinacinasas.

Morfología, edema tisular y contenido de agua umbilical

Las muestras tratadas con VEGF mostraron un aumento significativo del edema tisular visualizado mediante la extravasación del azul de Evans ($p < 0,018$, figs. 1A-1C). Se observó una clara diferencia en el espacio intersticial en las arterias del cordón umbilical tratadas con vehículo o con VEGF perfundidas durante 4 h. Con el objetivo de demostrar que el aumento de tamaño del intersticio se debe al depósito de agua, se determinó el contenido de agua del cordón umbilical. Los resultados indicaron que los tratados con VEGF mostraron un contenido elevado de agua (grupo VEGF $94 \pm 1\%$) comparado con los controles (grupo Cnp $91 \pm 1\%$, grupo Cp $93 \pm 1\%$).

Después de 4 h de perfusión, la tinción con hematoxilina-eosina reveló una morfología normal de la arteria umbilical (figs. 1D y 1E). El endotelio había permanecido sin modificar y la perfusión o el tratamiento con VEGF no alteró las estructuras de la gelatina de Wharton ni el epitelio amniótico. Sin embargo, en el espacio intersticial de las paredes arteriales umbilicales humanas perfundidas por el medio que contenía VEGF era visible edema tisular (fig. 1F).

El VEGF modifica las proteínas ECM

Colágeno tipo I y III. Para determinar el contenido de colágeno tipo I y III, aplicamos una tinción de rojo sirio de acuerdo con Junqueira et al²⁰. El microscopio óptico mostró una arteria umbilical no perfundida (fig. 2A), una perfundida con edema moderado en el intersticio (fig. 2B) y una tratada con VEGF con edema bien desarrollado en el espacio intersticial (fig. 2C). El microscopio de polarización

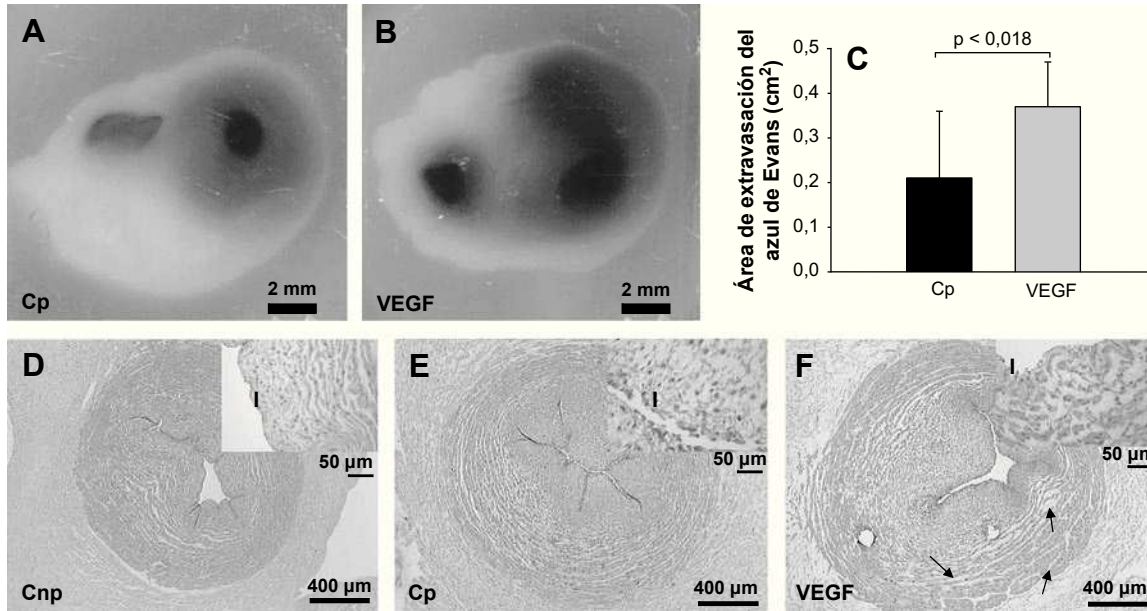


Fig. 1. Extravasación del azul de Evans de la arteria umbilical tratada con el excipiente (A) y del vaso tratado con VEGF (B). El edema tisular se determinó mediante análisis cuantitativo de las imágenes y aumentó significativamente con VEGF (C). La tinción con hematoxilina-eosina reveló una histología normal de la arteria umbilical en el punto de tiempo cero (D) y después de 4 h de perfusión (E). F El tratamiento VEGF indujo un edema tisular moderado en el espacio intersticial (flechas). Aumento original x 100, encarte x 400. Cnp: controles no perfundidos; I: íntima; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

reveló colágeno de tipo I y III en cordones umbilicales recién preparados (fig. 2D). La perfusión no afectó a la cantidad y proporción de colágeno de tipo I y III (fig. 2E). El colágeno de tipo III se detectó en toda la pared de la arteria umbilical de los grupos Cnp y Cp (figs. 2B y 2E), mientras que la gelatina de Wharton mostró una cantidad elevada de colágeno de tipos I y III. Sin embargo, comparado con los grupos Cnp y Cp, el VEGF había aumentado claramente el contenido de colágeno de tipo III en la pared arterial (fig. 2F), mientras que, tras la aplicación de VEGF, el de tipo I (amarillo, naranja) estaba aumentado en el área perivascular (fig. 2F) y en la gelatina de Wharton (fig. 2F).

Colágeno de tipo IV. El colágeno de tipo IV, otra proteína de la ECM y componente de las membranas basales, aumentó después del tratamiento con VEGF ($p < 0,05$ comparado con los grupos de control Cnp y Cp), según lo determinado mediante análisis Western blot (figs. 3A y 3B) y el análisis cuantitativo de la imagen (figs. 4A-4D). Es interesante destacar que, en el epitelio amniótico, se detectó colágeno de tipo IV adicional (fig. 4C).

Laminina. Normalmente la laminina se localiza en las membranas basales de las células endoteliales y en la media arterial. Su distribución siguió siendo similar en todos los cordones umbilicales, con independencia del tratamiento. Sin embargo, su cantidad

aumentó significativamente en la arteria umbilical después del tratamiento con VEGF, comparado con los vasos de control ($p < 0,05$, figs. 3A y 3C). Se detectó en la gelatina de Wharton y en el epitelio amniótico del cordón umbilical (figs. 4E-4H).

Impacto de VEGF en la osteopontina y la β_1 -integrina

La osteopontina se identificó en todos los cordones umbilicales examinados, con independencia de la perfusión (figs. 4I-4L). Sin embargo, su cantidad aumentó en los medios de las arterias tratadas con VEGF comparado con los controles correspondientes ($p < 0,05$, figs. 3A y 3D). La tinción inmunohistoquímica y el análisis cuantitativo de las imágenes reveló un claro aumento de la osteopontina en toda la pared de los vasos tratados con el factor (fig. 4L), incluidas las células endoteliales de la íntima y las células musculares lisas vasculares de la media. Además, la osteopontina se identificó en la gelatina de Wharton y el epitelio amniótico después del tratamiento con el factor.

De forma parecida, la β_1 -integrina estuvo presente hasta un grado similar en las arterias umbilicales humanas (Cnp) perfundidas. No obstante, en las arterias umbilicales, que contenían VEGF intraluminal, se demostró el acúmulo de

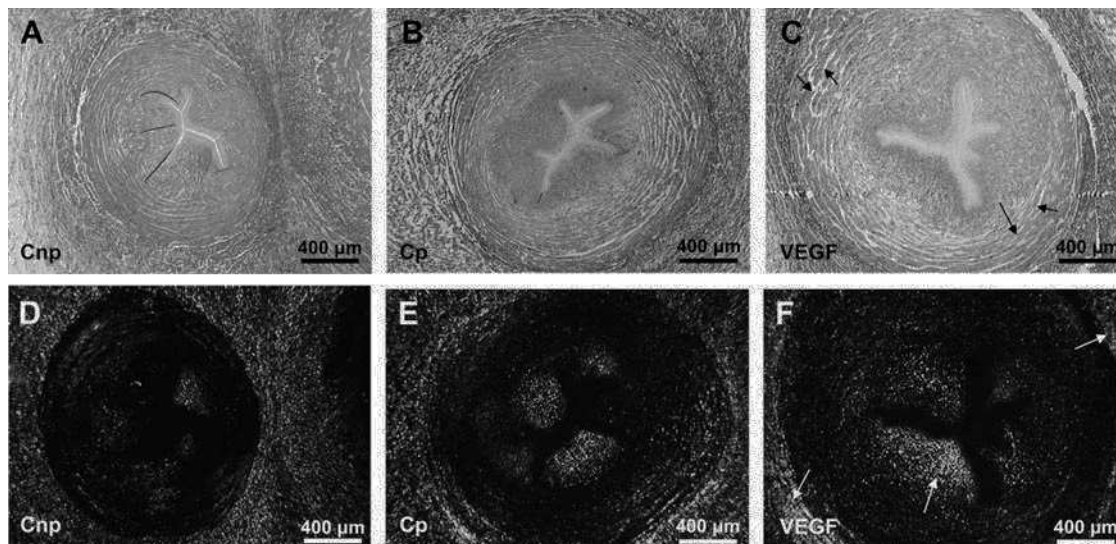


Fig. 2. Tinción con rojo sirio del cordón umbilical. **A** Control sin perfusión (Cnp, arteria umbilical). **B** Perfusión de 4 h de la arteria; en el intersticio sólo se detecta un edema moderado. **C** Arteria umbilical tratada con VEGF con edema en el espacio intersticial (*flechas*). **D** El microscopio de polarización reveló colágeno de tipo I y III en el cordón umbilical. La gelatina de Wharton presenta una elevada cantidad de colágeno de tipo I y III. El colágeno de tipo III se detecta en toda la pared de la arteria umbilical de los grupos Cnp y Cp. La perfusión no afecta a la cantidad de colágeno (**E**). **F** VEGF aumentó claramente el contenido de colágeno de tipo III en la pared arterial (*flechas*). En el área perivascular aumentó el colágeno de tipo I (amarillo, naranja) (*flechas*). Cnp: controles no perfundidos; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

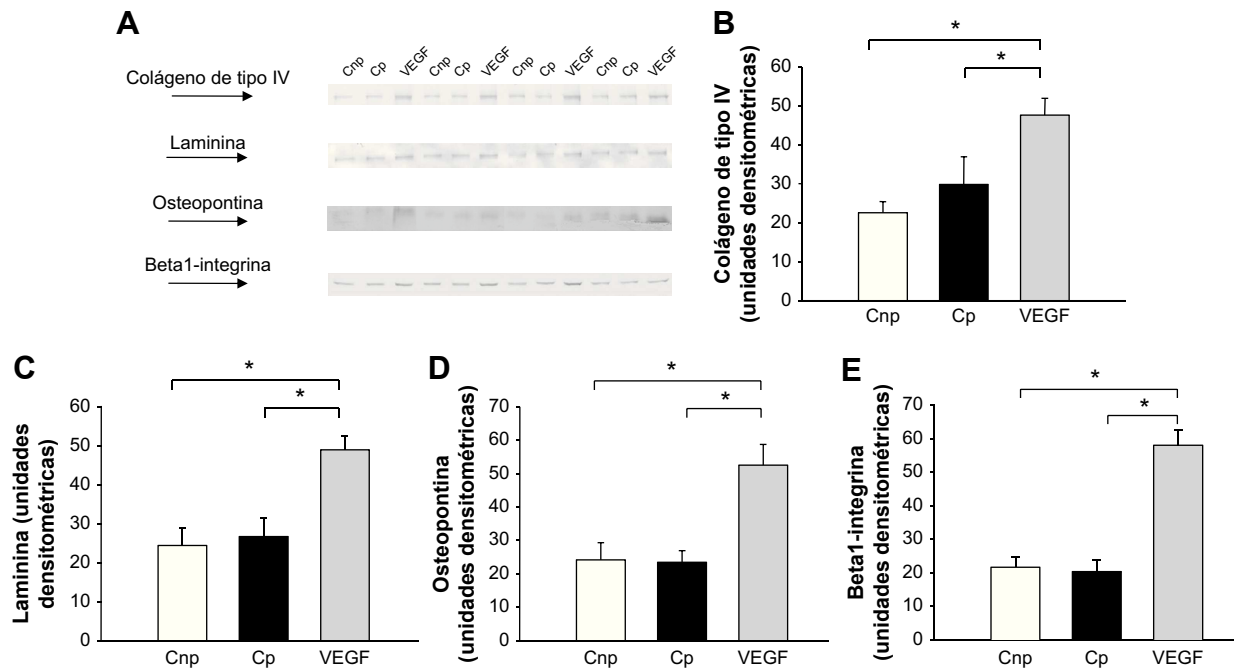


Fig. 3. Análisis Western blot y evaluación densitométrica. La aplicación intraluminal de VEGF indujo colágeno de tipo IV, laminina, osteopontina y beta₁-integrina (**A**) comparado con Cnp y Cp. Se proporcionan los resultados de la evaluación densitométrica (**B-E**). **p* < 0,05. Cnp: controles no perfundidos; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

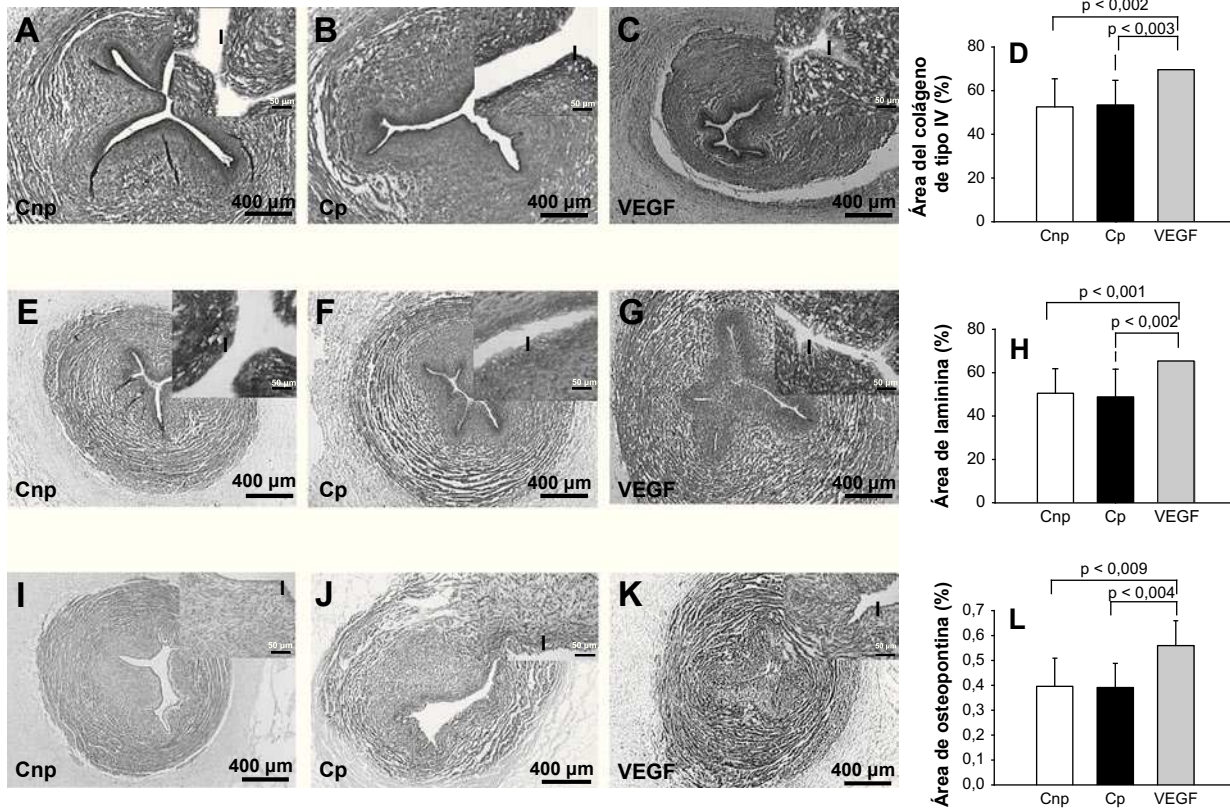


Fig. 4. Análisis inmunohistoquímico del colágeno de tipo IV (A-D). No se identificaron diferencias entre las arterias umbilicales perfundidas y no perfundidas. La aplicación de VEGF aumentó moderadamente el colágeno de tipo IV. La proteína de la laminina fue similar en vasos perfundidos y no perfundidos. El tratamiento con VEGF aumentó la cantidad de proteína de laminina (E-H). La aplicación de VEGF aumentó la osteopontina en la arteria umbilical (I-L) comparado con Cnp y Cp. I: íntima. Aumento x 100, encarte x 400. Cnp: controles no perfundidos; I: íntima; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

integrinas ($p < 0,05$, figs. 3A y 3E), sugestivo de su participación en la señalización de VEGF.

Efectos de la aplicación de VEGF sobre el receptor de la tirosinacinasas

De interés adicional fue el efecto que el VEGF añadido externamente ejerció sobre la producción intracelular de factor y receptor de las tirosinacinasas. Por esta razón, se investigó la cantidad de Flk-1, Flt-1 y de VEGF.

Flk-1. Flk-1 estuvo presente en las células endoteliales de la íntima, con independencia de que se hubieran sometido a perfusión. Después de tratamiento con VEGF, su cantidad se duplicó pero los receptores permanecieron limitados a las células endoteliales de la íntima arterial ($p < 0,05$; figs. 5A, 5C y 6A-6C).

Flt-1. En comparación, apenas se detectaron moléculas Flt-1 en las células endoteliales, tanto en las arterias perfundidas como no perfundidas, lo que se demostró mediante los análisis Western blot

(figs. 5A y 5D), al igual que en los cortes de las arterias de los cordones umbilicales de Cp y Cnp (figs. 6D y 6E). Sin embargo, el tratamiento con VEGF aumentó la cantidad de Flt-1 ($p < 0,05$ comparado con Cnp y Cp). Los análisis de Western blot revelaron un aumento de siete veces del antígeno (fig. 5B) y en los cortes teñidos mediante anticuerpos-anti-Flt-1, Flt-1, se pudo detectar en el endotelio de la íntima al igual que a su alrededor (figs. 6D-6F).

VEGF. La proteína VEGF intracelular se detectó en la arteria umbilical en cantidades similares en las muestras no perfundidas (Cnp) y perfundidas (Cp) (figs. 5A y 5B). La investigación inmunohistoquímica del cordón umbilical demostró la presencia débil del factor en la íntima de las arterias umbilicales perfundidas y no perfundidas (figs. 6G y 6I). En comparación, las células de las secciones de las arterias tratadas con VEGF manifestaron una potente unión a los anticuerpos-anti-VEGF (figs. 6G-6I). Esto se confirmó mediante el análisis Western blot. Las células teñidas positivamente no

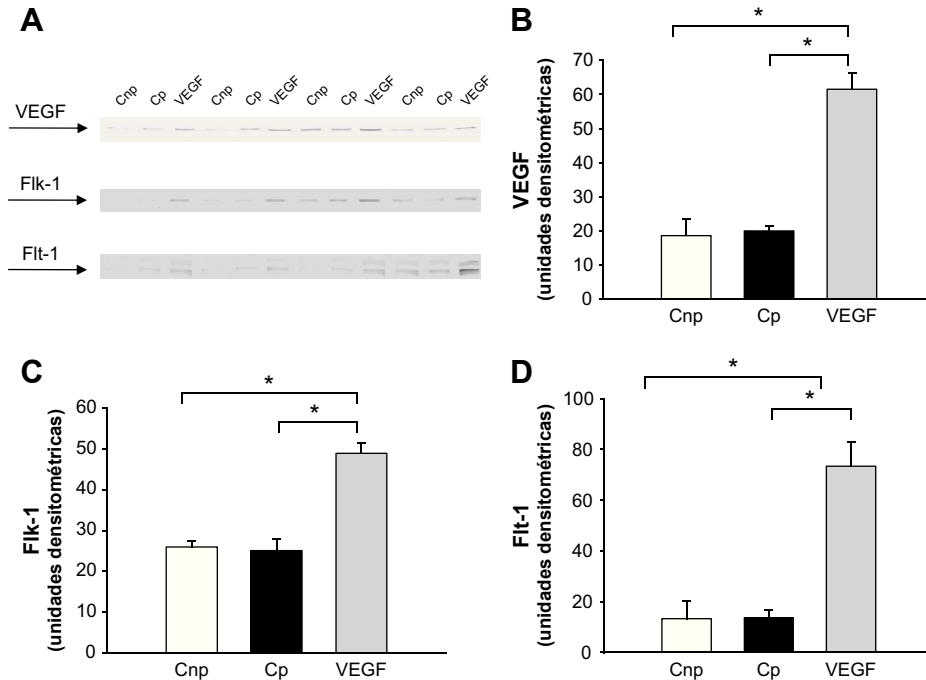


Fig. 5. Análisis Western blot y evaluación densitométrica. El VEGF aumentó ambos receptores tirosinacinasas (Flk-1 y Flt-1) en la arteria umbilical. El VEGF se detectó en los vasos Cnp y Cp, y aumentó con la aplicación intraluminal del factor (A). Se proporcionan los resultados de la evaluación densitométrica (B-D). * $p < 0,05$. Cnp: controles no perfundidos; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

parecen limitarse a las células endoteliales de la íntima sino que también comprenden las células musculares lisas de la media (fig. 6I).

El VEGF induce las proteínas de ECM en las CEVUH

Para verificar el importante papel de las células endoteliales en nuestro sistema, investigamos los efectos de la aplicación de VEGF sobre las células endoteliales de vena umbilical humana. Después de 90 min de tratamiento con VEGF se produjo un aumento de laminina que se determinó mediante flujocitometría y análisis Western blot ($p < 0,05$ comparado con vehículo, fig. 7). Al cabo de 90 min de la aplicación de VEGF el colágeno tipo IV y la osteopontina aumentaron significativamente ($p < 0,05$ comparado con vehículo). Paralelamente, tuvo lugar un aumento significativo de beta₁-integrina. También se produjo un aumento precoz de ambos receptores tirosinacinasas, Flt-1 y Flk-1 ($p < 0,05$ comparado con vehículo, fig. 8).

DISCUSIÓN

El presente estudio es el primer análisis exhaustivo de los efectos de VEGF sobre la arteria umbilical. Aplicamos un modelo de perfusión establecido

recientemente para un corazón funcional hemoperfundido, aislado *ex vivo*, y demostramos el papel de las células endoteliales. Se han descrito previamente las características y ventajas del modelo de perfusión^{8,19}. Como se ha publicado anteriormente, nuestro modelo de perfusión permite que los estudios farmacológicos y biológicos vasculares sobre órganos sigan desarrollándose de forma muy similar a como lo harían *in vivo*. En la presente investigación usamos este modelo para perfundir arterias umbilicales durante 4 h, tras su nuevo calentamiento a 37 °C durante 90 min. Mientras se perfunde una arteria en condiciones estables, los parámetros funcionales y de química clínica pueden mantenerse en unos límites fisiológicos, como se ha descrito en los estudios publicados²⁵. Esto aumenta la probabilidad de que los cambios del vaso observados después de la perfusión también pudieran haber ocurrido *in vivo* bajo la influencia idéntica de VEGF circulante.

Impacto de VEGF en la extravasación vascular

En diversos estudios se ha demostrado que el ARNm y la proteína de VEGF están distribuidos ampliamente en los tejidos, órganos o suero normal. Respaldan el concepto de que el factor podría desempeñar un importante papel en el mantenimiento y el

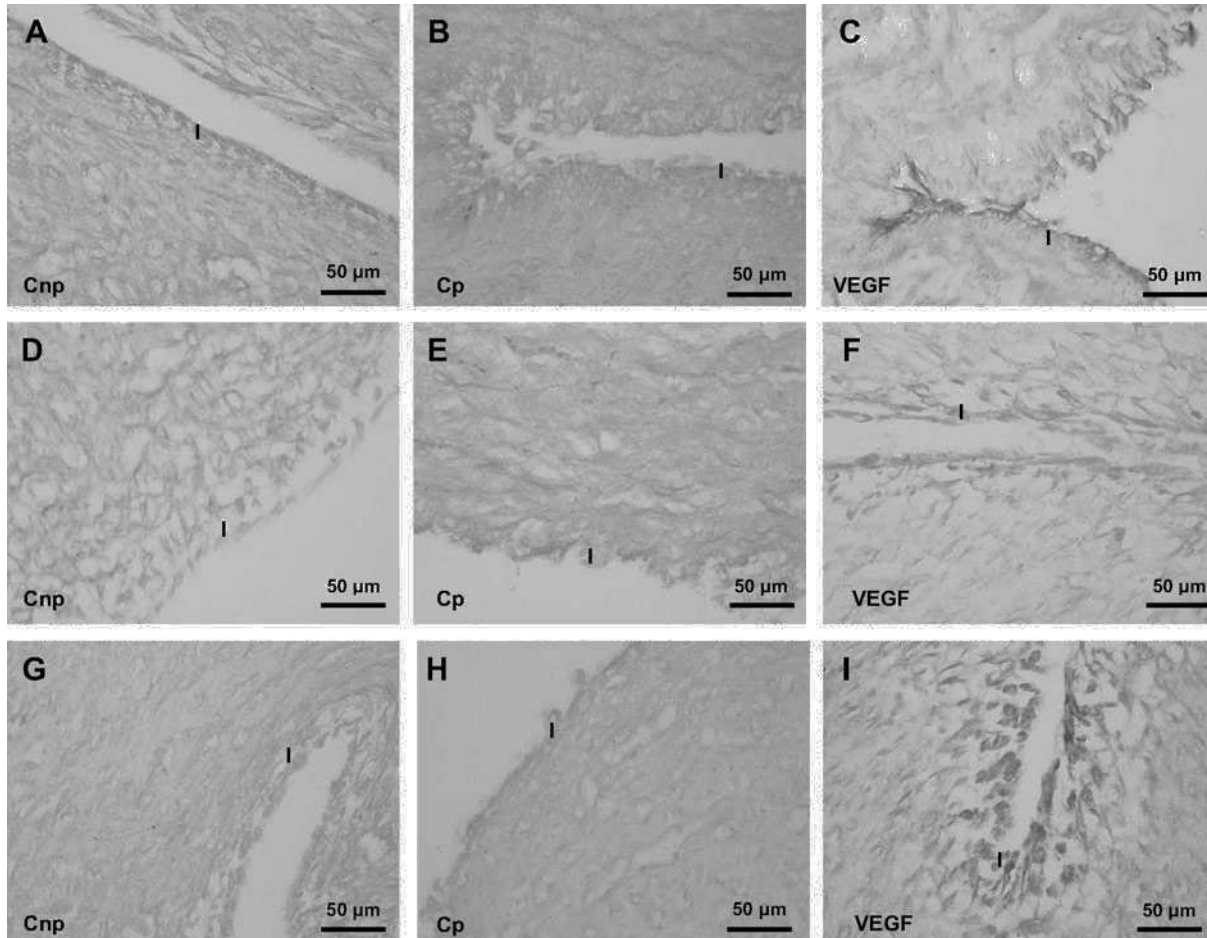


Fig. 6. Las células endoteliales Flk-1 positivas se detectaron en la íntima de todos los vasos en todos los grupos (A-C). Paralelamente, también identificamos células endoteliales Flt-1 positivas en la íntima del grupo VEGF pero no en los vasos Cnp y Cp (D-F). Las proteínas de VEGF se detectaron en las células endoteliales de todos los vasos pero aumentó claramente tras la aplicación de VEGF (G-I). Aumento x 400. Cnp: controles no perfundidos; I: íntima; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

control de la función vascular^{12,26}. En el presente estudio, aplicamos una solución fisiológica de VEGF en la arteria umbilical. El tiempo de incubación fue de 90 min. La aplicación intraluminal del factor indujo un edema tisular en el cordón umbilical sin una lesión visible. Se detectó extravasación después de 4 h de la perfusión y dependió en alto grado del tratamiento previo con VEGF, pero en el modelo de perfusión no se detectó. Por lo tanto, se hace evidente que en pacientes con concentraciones séricas elevadas de VEGF, debido a una lesión extensa pero localizada, el edema puede deberse exclusivamente a VEGF.

Efectos de VEGF sobre el receptor de las tirosinacinasas

También demostramos que el medio de perfusión que contiene VEGF desencadena la expresión de las

proteínas del factor por las células endoteliales que forman la íntima de la arteria umbilical. La observación coincide con los resultados previos obtenidos de células endoteliales incubadas en presencia de VEGF externo en condiciones de microgravedad²⁴. El VEGF se une al receptor de las tirosinacinasas de la superficie celular expresado predominantemente en las células endoteliales, de los que los más importantes son VEGFR-1 (Flt-1) y VEGFR-2 (Flk-1). La tinción inmunohistoquímica de Flk-1 y Flt-1 reveló claramente la presencia de VEGF 165 en las células endoteliales de la íntima de las arterias umbilicales. Además, la aplicación de VEGF aumentó la expresión de sus receptores. Al inicio del experimento, Flk-1 pudo detectarse en las arterias umbilicales hasta cierto grado, mientras que Flt-1 no estuvo presente en ese punto de tiempo. Después de 4 h de perfusión, Flk-1 estuvo claramente regulado al alza en la íntima y Flt-1 pudo detectarse.

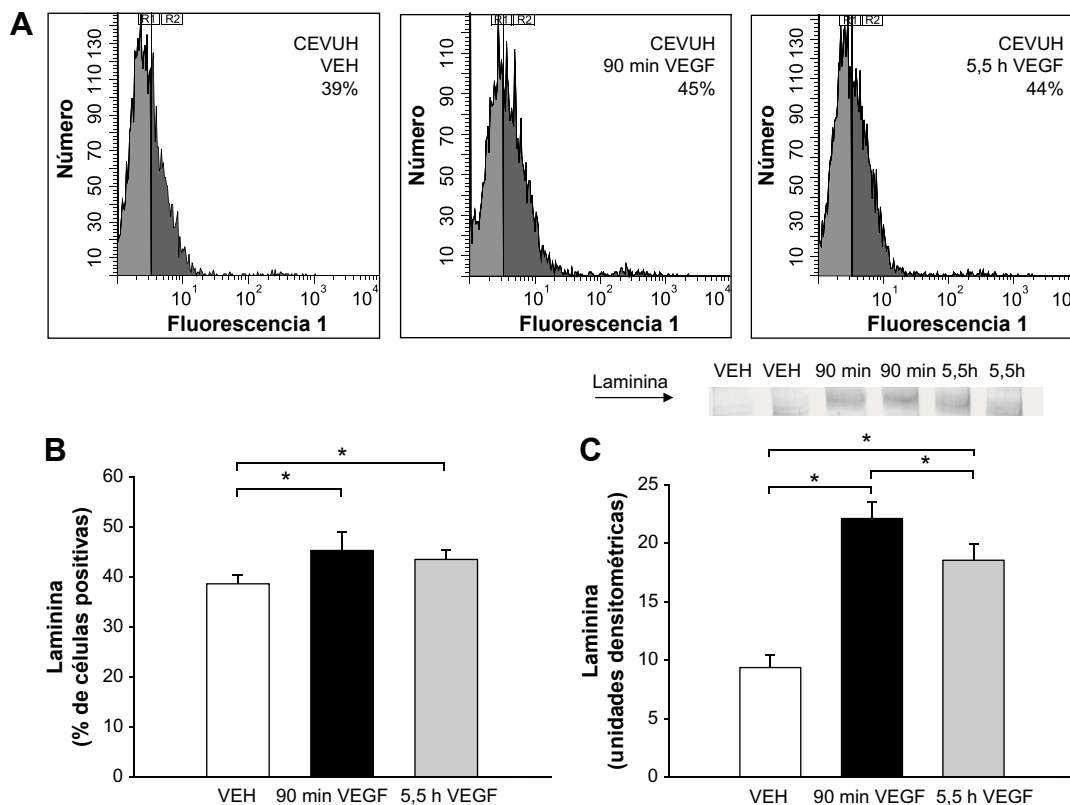


Fig. 7. Análisis flujocitométrica de la laminina en células endoteliales de la vena umbilical humana (**A**, **B**). Estas células aumentaron precozmente la cantidad de proteína de laminina. El análisis Western blot confirmó este hallazgo (**C**). * $p < 0,05$. CEVUH: células endoteliales de la vena umbilical humana; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; VEH: vehiculo.

En general se suponía que el VEGF actúa como un factor de crecimiento específico de la célula endotelial y atenúa la vasculopatía induciendo una proliferación endotelial principalmente a través de Flk-1. Pruebas recientes sugieren que Flt-1 y Flk-1 se expresan también en las células del músculo liso medial después de un traumatismo de los vasos sanguíneos. En este caso, la aplicación intraluminal de VEGF sólo aumenta ambos receptores de las tirosinacinasas en el endotelio de la arteria umbilical, lo que indica que nuestro modelo de perfusión funciona sin la inducción de una lesión de perfusión. VEGF y Flt-1 desempeñan un papel esencial en la formación de nuevas íntimas después de una lesión²⁷.

VEGF, Flk-1 y Flt-1 son capaces de estimular la proliferación, migración y actividad proteolítica de las células endoteliales. VEGF también induce permeabilidad, vasodilatación y angiogénesis vascular²⁸. Además, el grado de expresión de este factor está controlado por la diferenciación, transformación y aporte de oxígeno. Flt-1 y Flk-1 se localizan casi exclusivamente en las células endoteliales^{26,29,30}. La densidad de ambos receptores tirosinacinasas es baja en el tejido sano pero está regulada

al alza en el tejido tumoral o a su alrededor en los casos de neoangiogénesis y/o mayor permeabilidad vascular, tal como en la angiogénesis tumoral³¹. Nuestro grupo y otros investigadores³² hemos demostrado que el propio VEGF es un importante factor que da lugar a la regulación al alza del receptor de VEGF.

Efectos de VEGF sobre la ECM

En un estudio reciente¹³, demostramos que la aplicación intraluminal de VEGF aceleró la reendotelización y mejoró la curación vascular después de un traumatismo. En la pared del vaso se observó un aumento significativo de diversas proteínas ECM, como la fibronectina y el colágeno de tipo I, III y IV. Formulamos la hipótesis de que la aplicación local de VEGF, tras una lesión vascular, favorecería el proceso de remodelado vascular, a pesar de la inducción de edema. Hasta la fecha, no se disponía de datos concernientes al impacto de VEGF en la expresión de proteínas ECM de las arterias umbilicales. La ECM es necesaria para la composición de la pared vascular y forma hasta un 80% del peso en

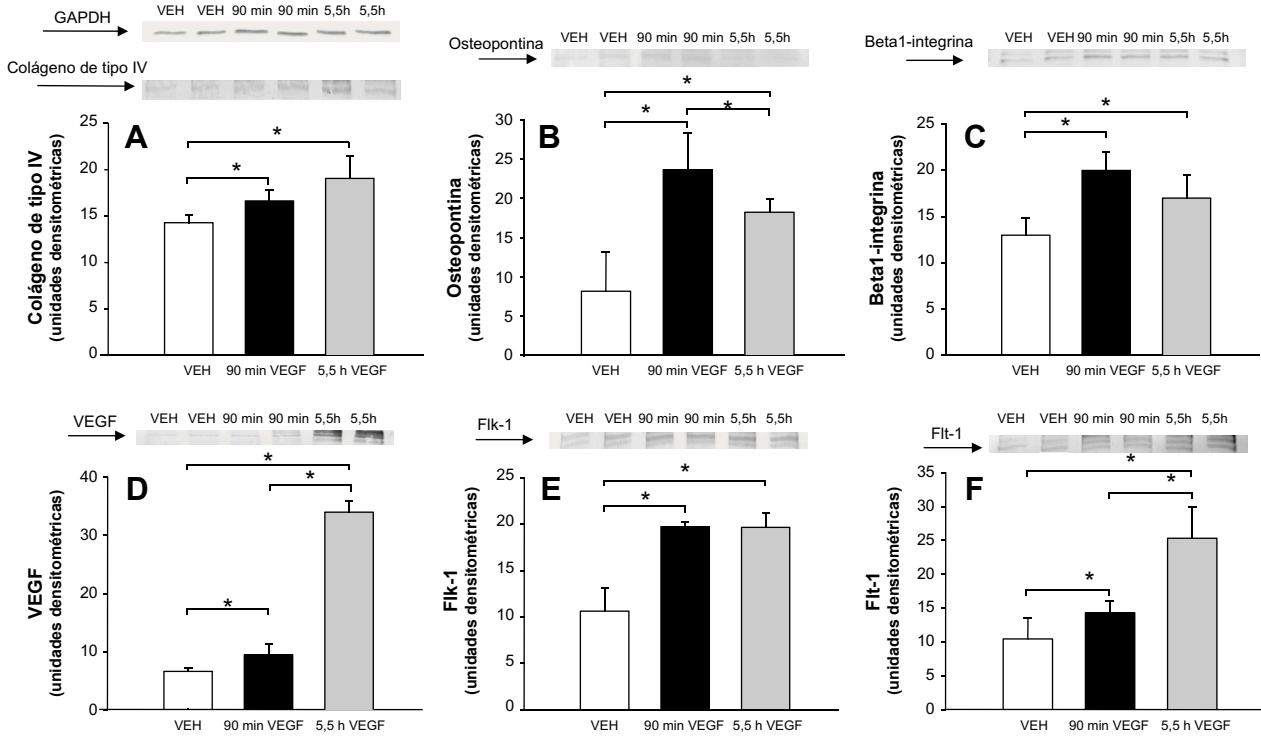


Fig. 8. Análisis Western blot del colágeno tipo IV y la proteína de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) en células endoteliales de la vena umbilical humana (CEVUH) (A). En cada banda la misma carga de proteínas está indicada por GAPDH. El VEGF aumentó el colágeno de tipo IV al cabo de 90 min. Además, el VEGF aumentó precozmente la osteopontina (B), beta₁-integrina (C), VEGF (D), Flk-1 (E) y Flt-1 (F). **p* < 0,05. GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; VEH: vehículo.

seco de los vasos sanguíneos¹³. Los vasos contenían principalmente colágeno de tipo I y III^{13,33}, mientras que el colágeno de tipo IV y la laminina pudieron detectarse en la membrana basal subendotelial rodeada de células musculares lisas vasculares¹⁶. Además, el colágeno de tipo IV se detecta en la gelatina de Wharton junto con el colágeno de tipo I y III, como se muestra en la figura 2.

Las arterias umbilicales tratadas con VEGF mostraron claramente mayores cantidades de colágeno de tipo III y IV y laminina. Se distribuyeron en toda la arteria umbilical, mientras que el colágeno de tipo I se acumula principalmente en el área perivascular. Por lo tanto, demostramos por primera vez que VEGF desencadena la producción de laminina y diversos tipos de colágeno en células endoteliales de la íntima. También demostramos que las CEVUH tratadas con VEGF mostraron una mayor producción de laminina según lo determinado por flujocitometría y análisis de Western blot.

Además, observamos que las arterias umbilicales tratadas con VEGF regulan al alza la osteopontina en un período breve. Ésta parece desempeñar un papel clave en el remodelado vascular *in vivo*, al igual que como mediador del crecimiento y como

componente importante de la inmunidad e inflamación celular. También actúa como factor de supervivencia, como adhesivo celular y factor quimiotáctico de las células endoteliales³⁴. Además, cuando se sobreexpresa en ratones transgénicos³⁵ es capaz de provocar el engrosamiento espontáneo de la media así como la formación de neointima tras lesión vascular. Por otra parte, la beta₁-integrina es regulada al alza por VEGF. Forma un receptor de la adhesión que media la unión de las células endoteliales a la ECM, lo que facilita su crecimiento, migración y capacidad para depositar proteínas de matriz. Las integrinas son importantes factores en la reestenosis y la aterosclerosis arterial¹⁷, y podrían ser importantes en el remodelado vascular.

CONCLUSIONES

En resumen, el modelo de perfusión informatizado aplicado ofreció posibilidades muy interesantes para la investigación de la compleja interacción entre VEGF y la pared vascular de la arteria umbilical. Por esta razón, pudimos demostrar por primera vez que el factor activó las células endoteliales de

la íntima de la arteria umbilical que produjeron mayores concentraciones de proteínas ECM. El VEGF también influyó en la media y la adventicia adyacentes y provocó un edema vascular precoz. El factor reguló al alza la osteopontina al igual que el VEGF intracelular y su receptor de tirosininasas al cabo de 90 min, tanto *ex vivo* como *in vitro*. Es bien conocido que todas las moléculas mencionadas previamente participan en el proceso de remodelado vascular. Éste se inicia al mismo tiempo que la formación del edema acompañante. Sin embargo, una tarea futura será investigar cómo podemos prevenir el edema inducido por el VEGF en los vasos sanos alejados de la lesión. Un tratamiento con inhibidores del VEGF, iniciado directamente después de una quemadura o una lesión traumática, puede reducir el extenso edema tisular. La consecuencia sería un mejor pronóstico tras una lesión grave.

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a Jessie Webb por la revisión del manuscrito y a la Srta. Ursula Schwikowski por su ayuda con las figuras.

BIBLIOGRAFÍA

- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, et al. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science* 1983;219:983-985.
- Ferrara N, Henzel WJ. Pituitary follicular cells secrete a novel heparin binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1989;161:851-858.
- Plouët J, Schilling J, Gospodarowicz D. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by At T20 cells. *EMBO J* 1989;8:3801-3808.
- Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, et al. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996;93:1493-1495.
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, et al. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 1989;246:1306-1309.
- Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, et al. Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 1989;246:1309-1312.
- Aird WC. Spatial and temporal dynamics of the endothelium. *J Thromb Haemost* 2005;3:1392-1406.
- Houck KA, Ferrara N, Winer J, et al. The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 1991;5:1806-1814.
- Devries C, Escobedo JA, Ueno H, et al. The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 1992;255:989-991.
- Schiffirin EL. The endothelium and control of blood-vessel function in health and disease. *Clin Invest Med* 1994;17:602-620.
- Harrigan MR, Ennis SR, Masada T, et al. Intraventricular infusion of vascular endothelial growth factor promotes cerebral angiogenesis with minimal brain edema. *Neurosurgery* 2002;50:589-598.
- Infanger M, Schmidt O, Kossmehl P, et al. Vascular endothelial growth factor serum level is strongly enhanced after burn injury and correlated with local and general tissue edema. *Burns* 2004;30:305-311.
- Infanger M, Shakibaei M, Kossmehl P, et al. Intraluminal application of vascular endothelial growth factor enhances healing of microvascular anastomosis in a rat model. *J Vasc Res* 2005;42:202-213.
- Sixma JJ, van Zanten GH, Saelman EU, et al. Platelet adhesion to collagen. *Thromb Haemost* 1995;74:454-459.
- Polanowska-Grabowska R, Simon CG, Jr, Gear AR. Platelet adhesion to collagen type I, collagen type IV, von Willebrand factor, fibronectin, laminin and fibrinogen: rapid kinetics under shear. *Thromb Haemost* 1999;81:118-123.
- Hallmann R, Horn N, Selg M, et al. Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev* 2005;85:979-1000.
- Xu H, Zeng L, Peng H, et al. HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin mitigates VEGF-induced "inside-out" signaling to extracellular matrix by preventing RhoA activation. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006;291:F995-F1004.
- Kossmehl P, Schonberger J, Shakibaei M, et al. Increase of fibronectin and osteopontin in porcine hearts following ischemia and reperfusion. *J Mol Med* 2005;83:626-637.
- Kossmehl P, Kurth E, Faramarzi S, et al. Mechanisms of apoptosis after ischemia and reperfusion: role of the renin-angiotensin system. *Apoptosis* 2006;11:347-358.
- Junqueira LCU, Cossermelli W, Brentani R. Differential staining of collagens type I, II and III by sirius red and polarization microscopy. *Arch Histol Jpn* 1978;41:267-274.
- Grimm D, Cameron D, Griese DP, et al. Differential effects of growth hormone on cardiomyocyte and extracellular matrix protein remodeling following experimental myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1998;40:297-306.
- Grimm D, Huber M, Jabusch HC, et al. Extracellular matrix proteins in cardiac fibroblasts derived from rat hearts with chronic pressure-overload: effects of beta-receptor blockade. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:487-501.
- Infanger M, Ulbrich C, Baatout S, et al. Modeled gravitational unloading induced downregulation of endothelin-1 in human endothelial cells. *J Cell Biochem* 2007;101:1439-1455.
- Infanger M, Kossmehl P, Shakibaei M, et al. Induction of three-dimensional assembly and increase in apoptosis of human endothelial cells by simulated microgravity: impact of vascular endothelial growth factor. *Apoptosis* 2006;11:749-764.
- Gan L, Sjogren LS, Doroudi R, et al. A new computerized biomechanical perfusion model for ex vivo study of fluid mechanical forces in intact conduit vessels. *J Vasc Res* 1999;36:68-78.
- Jakeman LB, Winer J, Bennett GL, et al. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 1992;89:244-253.
- Zhao Q, Egashira K, Hiasa K, et al. Essential role of vascular endothelial growth factor and Flt-1 signals in neointimal formation after periaortic injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2284-2289.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* 1997;18:4-25.
- Shibuya M, Yamaguchi S, Yamane A, et al. Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor-type tyrosine kinase gene (FLT) closely related to the fms family. *Oncogene* 1990;5:519-524.

30. Terman BI, Dougher VM, Carrion ME, et al. Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 1992;187:1579-1586.
31. Barleon B, Siemeister G, Martiny-Baron G, et al. Vascular endothelial growth factor up-regulates its receptor fms-like tyrosine kinase 1 (FLT-1) and a soluble variant of FLT-1 in human vascular endothelial cells. *Cancer Res* 1997;57:5421-5425.
32. Plate KH, Breier G, Millauer B, et al. Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res* 1993;53:5822-5827.
33. Farquharson C, Robins SP. Immunolocalization of collagens type I and III in the arterial wall of the rat. *Histochem J* 1989;21:172-178.
34. Leali D, Dell'Era P, Stabile H, et al. Osteopontin (Eta-1) and fibroblast growth factor-2 cross-talk in angiogenesis. *J Immunol* 2003;171:1085-1093.
35. Isoda K, Nishikawa K, Kamezawa Y, et al. Osteopontin plays an important role in the development of medial thickening and neointimal formation. *Circ Res* 2002;91:77-82.