



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

Las tesinas de Belgrano

**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Licenciatura en Ciencias Biológicas**

**Estudio de la expresión y secreción del
proteoglicano Decorina en diferentes líneas de
células endoteliales en cultivo**

Nº 307

Juan Ignacio Falcón

Tutora: Silvia L. Debenedetti

Departamento de Investigaciones
Noviembre 2010

Índice

Introducción.....	3
Objetivos.....	10
Materiales y Métodos	10
Resultados.....	12
Determinación colorimétrica de GAGs	12
Obtención y aislamiento de los PRGs de los sobrenadantes de las células en cultivo	13
Determinación de la concentración de proteínas en los sobrenadantes y en las membranas biológicas.....	16
Estudio del PRG Decorina en membranas biológicas por Inmunobloting.....	17
Estudio del PRG Decorina en el sobrenadante de las líneas celulares por Inmunobloting	18
Estudio del movimiento celular de las diferentes líneas en cultivo por quimiotaxis	18
Discusión.....	20
Bibliografía.....	21

Abreviaturas:

MEx: Matriz Extracelular.

LBv: Lámina Basal Vasular.

LB: Lamina Basal.

PRGs: Proteoglicanos.

GAGs: Glicosaminoglicanos.

Introducción

La Matriz Extracelular y la Lámina Basal

Los tejidos de los mamíferos están constituidos por células de un mismo, o diferente fenotipo celular que comparten un origen común. La organización y las funciones de un tejido específico están moduladas por los contactos célula-célula y las relaciones de las células con su microambiente (contactos célula-matriz extracelular).

La matriz extracelular (MEx) proporciona sostén mecánico a los tejidos, así como también cumple otras diversas funciones.

Diferentes combinaciones de los componentes de la MEx le confieren propiedades específicas: fuerza en un tendón, diente o hueso; amortiguación en un cartílago y adhesión en la mayoría de los tejidos. Además, la composición de la matriz, que puede variar, según el sitio anatómico y el estado fisiológico-patológico de un tejido, le permite a la célula saber donde está y que debe hacer. Los cambios en los componentes de la MEx, los cuales son remodelados, degradados y resintetizados localmente en forma constante, pueden modular las interacciones de una célula con el entorno. La matriz también sirve como depósito para muchas moléculas de señalización extracelular que controlan el crecimiento y la diferenciación celular. Por otra parte, provee un entramado sobre el cual las células pueden moverse, sobre todo en las etapas tempranas de la constitución de los tejidos. La morfogénesis depende críticamente de la adhesión célula-matriz como también de la adhesión entre las células (1).

Tres tipos de biomoléculas son los principales componentes en la MEx de todos los tejidos.

Los proteoglicanos son altamente viscosos, amortiguan el contacto entre las células y unen una gran variedad de moléculas extracelulares.

Las fibras de colágeno, proteínas fibrosas, proveen fuerza mecánica y elasticidad.

Las proteínas multiadhesivas de la matriz, que se fijan e interconectan los receptores de adhesión de la superficie celular y otros componentes de la MEX.

Los epitelios están anclados a una Lamina Basal (LB), que cubre toda su superficie; esta es una malla laminar de componentes de la MEX.

El epitelio y la mayoría de los grupos organizados de células están anclados a la **LB**, la cual se estructura de manera diferente conforme a los tejidos (Figura 1). Esencialmente es un reticulado laminar de colágeno tipo IV. La LB cumple importantes funciones en la regeneración de tejidos luego del daño y en el desarrollo embrionario.

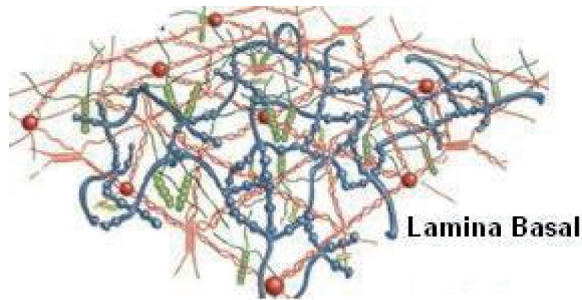


Figura 1: Esta imagen se esquematiza el reticulado laminar conocido como **Lamina Basal**.

Componentes de la LB

Como se describió anteriormente las principales biomoléculas de la LB son:

- Proteínas como el **colágeno Tipo IV**, componente principal de toda LB.
- Proteínas de adhesión como la **laminina** y la **fibronectina**.
- Diversos **proteoglicanos** (PRGs), estos están formados por una cadena polipeptídica unida de manera covalente a residuos de Glucosaminoglicanos, mejor conocidos como GAGs, los cuales a su vez están compuestos por cadenas no ramificadas de polisacáridos.

El **colágeno tipo IV** es una proteína trimérica constituida por tres polipéptidos denominados cadenas de colágeno α (Figura 2). Las tres cadenas α pueden ser idénticas (homotriméricas) o diferentes (heterotriméricas). Una molécula trimérica de colágeno contiene 1 o más segmentos de 3 hebras, cada uno con una estructura helicoidal triple. Cada hebra aportada por la cadena α forma una hélice con giro hacia la izquierda y 3 de tales hebras de cadena α se enrollan entre sí para formar una hélice triple con giro hacia la derecha. La formación de la triple hélice de colágeno se debe a la gran abundancia de tres aminoácidos: glicina (Gly), prolina (Pro) y una prolina modificada llamada hidroxiprolina (HProli), que constituyen el motivo repetitivo Gly-X-Y, donde X e Y puede ser cualquier aminoácido pero por lo general suelen ser Pro y HProli.

La Gly es fundamental ya que su cadena lateral es la única capaz de entrar en el centro de la hélice de triple hebra.

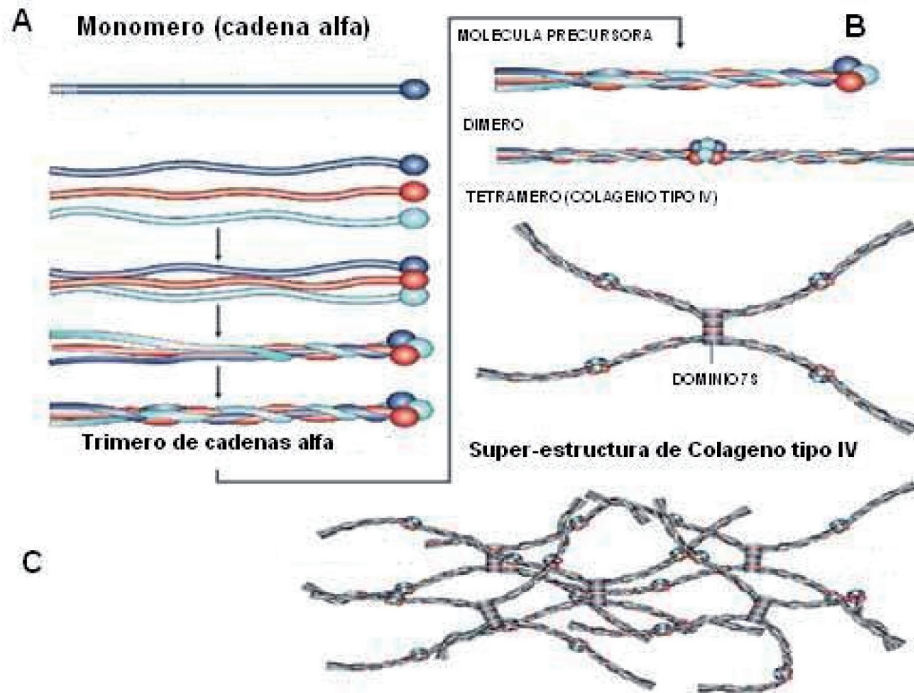


Figura 2: Esquema de la formación de una molécula de colágeno tipo IV. **A.** Molécula precursora de la triple hélice de colágeno. **B.** Estructura del Dímero de colágeno tipo IV y la formación del tetramero. **C.** Súper estructura del Colágeno.

Las **proteínas multiadhesión** de la matriz son moléculas largas y flexibles que contienen múltiples dominios responsables de la unión a diversos tipos de colágeno, otras proteínas de la matriz, polisacáridos, receptores de adhesión de la superficie celular. Estas proteínas son componentes importantes para organizar los otros componentes de la MEx y para regular la adhesión entre las células y la matriz.

Uno de los miembros de la familia de las glucoproteínas extracelulares es la **laminina**, la cual esta constituida por tres cadenas polipeptídicas diferentes que se mantienen unidas gracias a los puentes disulfuro y adoptando una disposición espacial que recuerda a una cruz, es decir, con tres brazos cortos y uno largo (Figura 3).

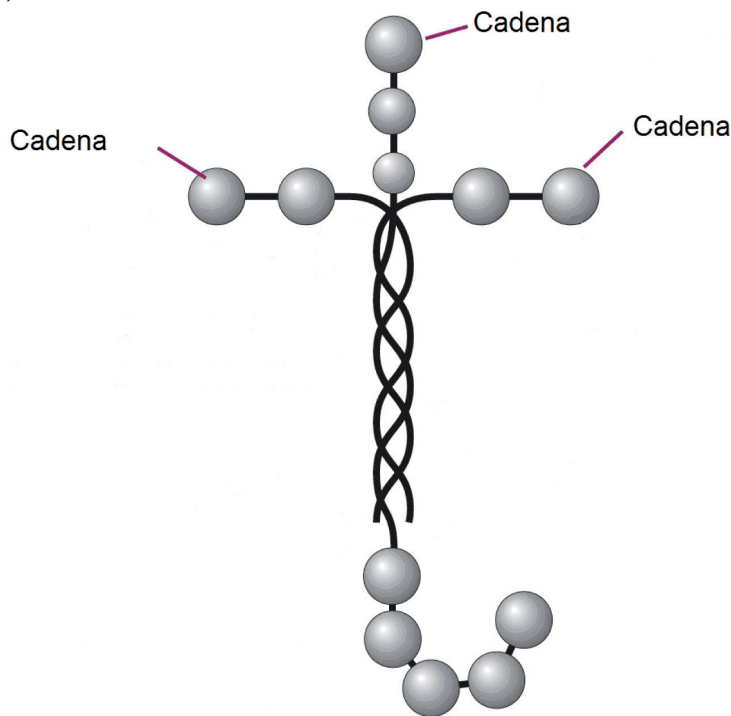


Figura 3: Esquema representativo de la proteína **Laminina**, donde se pueden ver los tres brazos que le dan su característica disposición espacial.

Al igual que las fibronectinas, estas se ven involucradas en los procesos de migración celular, diferenciación de las células y el crecimiento.

La **laminina** se encuentra fuertemente unida a los receptores de la superficie celular, como así también a otras moléculas de estas, **proteoglicanos** y otros componentes de la LB.

Es cuestión de estudio todavía la interconexión que se cree que existe entre las redes separadas que forman la **laminina** y el **colágeno tipo IV**, estas redes entrelazadas confieren fuerza y flexibilidad a las LB.

La **fibronectina** está formada por dos polipéptidos unidos entre sí por puentes disulfuro en su extremo C terminal; cada polipéptido esta compuesto por "bloques de construcción" distintos con una configuración espacial lineal. Estos bloques a su vez forman 5 a 6 dominios (Figura 4) (2).

La **fibronectina** cumple importantes funciones durante las dinámicas actividades de los tejidos en el desarrollo embrionario.

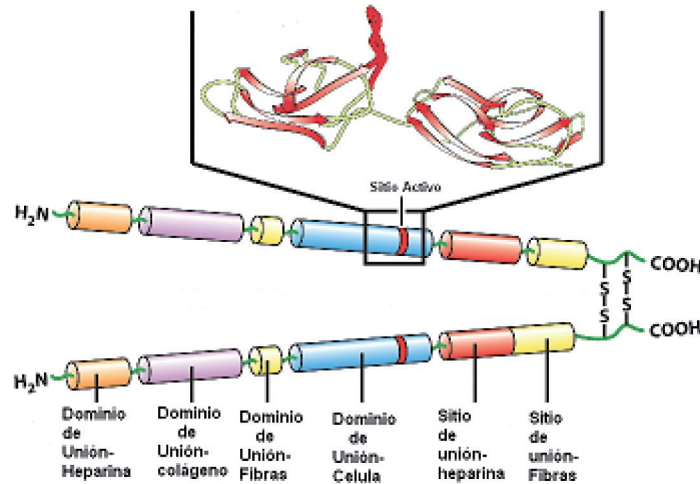


Figura 4: El esquema representa la estructura espacial de la proteína **fibronectina** y sus diferentes sitios de unión.

Como fue descrito anteriormente, los PRGs están formados por una cadena polipeptídica unida de manera covalente a los GAGs.

Un GAGs es un heteropolisacárido lineal, con una secuencia repetida característica de disacáridos. Uno de los monosacáridos constituyente del disacárido es un amino azúcar D-glucosamino o galactosamino y la otra unidad es generalmente, un residuo de ácido urónico, ya sea: ácido D-glucurónico o ácido idurónico.

Según la secuencia repetitiva, los GAGs más comunes son: **condroitín sulfato (CS)**, **dermatán sulfato (DS)**, **heparán sulfato (HS)**, **keratán sulfato (KS)**, **ácido hidurónico (HA)** y **heparina** (Figura 5).

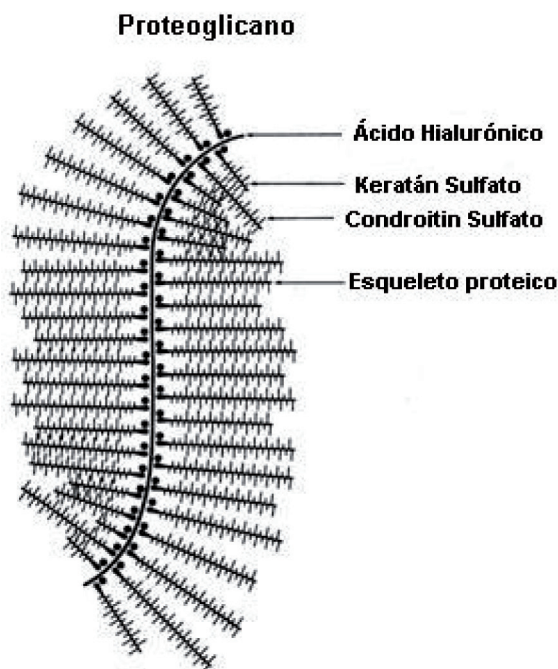


Figura 5: El siguiente esquema ejemplifica una molécula del PRG Agrecano.

Las cadenas de GAGs están unidas de manera covalente a residuos de serina o asparragina del esqueleto proteico.

Los PRGs de la superficie celular intervienen en la adhesión célula-célula, migración celular, y los procesos dinámicos mediados a través de las interacciones entre las cadenas de los PRGs y los componentes de la MEx. Los Gags constituyentes de los PRGs son componentes integrales de la LB.

Los PRGs y los GAGs cumplen un rol importante en las fisiopatologías de la LB relacionadas a enfermedades como la diabetes, arterosclerosis y en los procesos metastáticos. Además los GAGs permiten la inmovilización de factores de crecimiento celular y de las enzimas de la MEx, como así también localizan proteínas y enzimas en sus sitios de acción facilitando sus funciones fisiológicas y en algunos casos evitan la degradación proteolítica.

Recientemente se ha descripto que los PRGs y GAGs están involucrados en la regulación de la secreción de las proteínas, la expresión de los genes en algunos tejidos, y la unión de los Gags a factores de transcripción.

Durante el desarrollo embrionario de los vertebrados existen cambios marcados en la expresión de los PRGs, sugiriendo que estas macromoléculas juegan un papel importante en la diferenciación celular (3).

El Endotelio Vascular

En el **sistema microvascular**, es en donde se lleva a cabo el intercambio de oxígeno, anhídrido carbónico, agua, sales, nutrientes y metabolitos. Este intercambio se realiza sobre todo en los capilares. En este sistema las arteriolas regulan el flujo de la sangre hacia el dominio capilar. Estas poseen una pared muscular bastante gruesa y son las principales responsables de la resistencia al flujo sanguíneo. Disminuyen la presión arterial hasta alcanzar un nivel bajo a fin de proteger la pared arterial, por lo que se las denomina vasos de resistencia.

Los capilares se continúan en las vénulas poscapilares que se unen para formar vénulas musculares. Estas vénulas poscapilares son la porción más importante del conjunto de vasos en lo referido a la migración celular.

Arteriola

Se define arbitrariamente a la arteriola como el vaso sanguíneo arterial de diámetro menor de 100 μm . Su túnica íntima se compone de células endoteliales aplanadas. Desde la porción basal de las células endoteliales se extienden divertículos a través de la lámina basal y la lámina elástica interna, que forman contactos mioendoteliales con las células musculares lisas de la túnica media. La túnica media está compuesta por 1-3 capas de células musculares lisas, dispuestas en círculos concéntricos; mientras que la túnica adventicia se compone de tejido conectivo laxo.

La porción terminal de una arteriola se denomina metaarteriola o esfínter precapilar y regula el flujo sanguíneo que lleva al dominio capilar al variar el grado de contracción. Las arteriolas se denominan vasos de resistencia (Figura 6) (4).

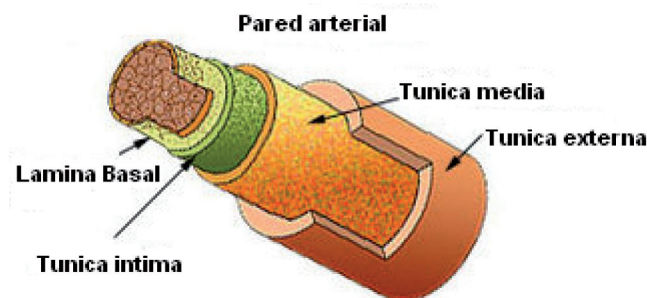


Figura 6: Acá se puede ver la estructura de las paredes de una arteria.

Capilares

Los capilares son los vasos sanguíneos más pequeños con un diámetro luminal promedio de 10 μm . Los capilares se anastomosan y forman un reticulado continuo, el **dominio o territorio capilar** (Figura 7).

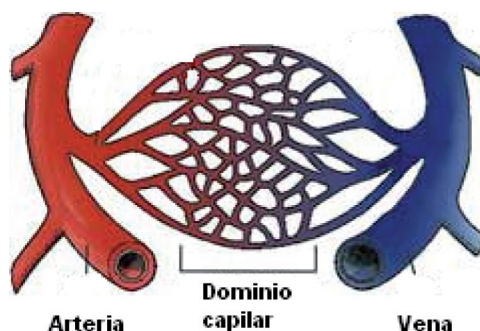


Figura 7: Los capilares se anastomosan para formar el reticulado llamado **dominio capilar**.

La pared capilar está compuesta por una capa de células endoteliales y una LB que incluye pericitos dispersos.

En los capilares más pequeños una sola célula endotelial puede rodear toda la luz del vaso, mientras que dos o tres rodean la luz de los capilares más grandes.

Se considera que la superficie endotelial de los capilares representa alrededor del 85% de la superficie total de endotelio en el aparato circulatorio.

Heterogeneidad fenotípica del endotelio vascular

El endotelio microvascular, en un adulto normal, ha sido dividido en diferentes fenotipos sobre la base de la morfología: continuo, fenestrado y discontinuo (5).

Los capilares continuos son los más comunes y se encuentran en todos los tejidos musculares, en el encéfalo y en el tejido conectivo. Las células endoteliales están engrosadas en la zona del núcleo, pero en la periferia presenta un diámetro de 0,2 μm . Una característica particular es la presencia de grandes cantidades de vesículas de diámetro uniforme de aproximadamente 70 μm . El endotelio está limitado en su parte externa por una LB continua. En los capilares continuos, el citoplasma endotelial es continuo y no hay fusiones luminal y abluminal de las membranas plasmáticas excepto en las uniones intercelulares.

Los capilares fenestrados se encuentran en la lámina propia del tubo digestivo, en los capilares renales y en las glándulas endocrinas. Estos capilares se caracterizan por la presencia de zonas endoteliales muy aplanadas de 0,1 μm o más de espesor, en las que hay fenestraciones redondeadas de un diámetro promedio de 70 nm. Las fenestraciones están cerradas por un diafragma más delgado que la membrana trilaminar, salvo en un único engrosamiento central. El citoplasma contiene escasas vesículas, las células están unidas mediante contactos de oclusión como en los capilares continuos, la LB es continua.

Los capilares sinusoides o discontinuos tienen un diámetro luminal de aproximadamente 30 a 40 μm o incluso mayor, es decir, bastante más grande que los capilares comunes.

Estos grandes capilares se encuentran en hígado, bazo, médula ósea, hipófisis y glándulas suprarrenales.

Son más anchos y contorneados que otros capilares. Sus células endoteliales presentan fenestras grandes. Su LB es incompleta o ausente, los sinusoides poseen hendiduras intercelulares grandes, que permiten el paso de proteínas e incluso de elementos formes de la sangre.

La única diferencia entre los capilares fenestrados y discontinuos es el diámetro de los poros y la presencia o ausencia de un diafragma, el endotelio fenestrado está incluido en el endotelio discontinuo. Las células del endotelio discontinuo usualmente tienen agrupados orificios de un diámetro entre 80-200 nm.

Todas estas diferentes características reflejan el potencial de diferenciación que tienen las células endoteliales para formar capilares en un órgano o tejido por vasculogénesis o angiogénesis. La interacción del endotelio con el medio ambiente de un órgano o tejido, a través de factores solubles o vía célula-célula, conduce a un particular fenotipo del endotelio.

Vasculogénesis y proceso de diferenciación endotelial

La vasculogénesis es la formación de vasos sanguíneos por diferenciación *in situ* de las células endoteliales a partir de sus precursores, los angioblastos. La vasculogénesis es uno de los procesos fundamentales que conduce al desarrollo de la vasculatura primaria del embrión. Durante la embriogénesis de los mamíferos, los angioblastos son producto de la diferenciación de las células del mesodermo en los estadios tempranos del desarrollo.

Las líneas de células madres (SC) embrionarias de murinos pueden ser obtenidas a partir del macizo celular interno del blastocisto del ratón. El mantenimiento de estas líneas celulares pluripotenciales

posibilita generar el proceso de diferenciación *in vitro*. Las SC pueden mantener su pluripotencialidad en cultivo debido a la presencia por ejemplo del factor inhibitorio de leucemia (LIF) (6).

Vittet y colaboradores han descrito la expresión secuencial de diferentes marcadores de las células endoteliales a lo largo del proceso de diferenciación, utilizando un modelo experimental *in vitro* con empleo de SC. La secuencia de expresión de dichos marcadores caracterizados por RT-PCR fue: receptor para el factor de crecimiento endotelial (VEGF-R), Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1), moléculas adhesivas como cadherina (VE) y otras moléculas específicas como MECA-32 y MEC-14.

PECAM-1 es una glicoproteína integral de membrana de un peso molecular (PM) de 130 KDa que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas, que esta compuesta por seis dominios extracelulares, una región transmembrana corta y una cola citoplasmática de longitud variable. La misma se localiza en los bordes de los contactos célula-célula de las células adyacentes. Además está involucrada en la adhesión célula-célula. La caracterización del PECAM-1 como una molécula de adhesión es sustentada por experimentos que muestran su participación en diferentes procesos biológicos como la migración celular, y la angiogénesis, etc. Para esto emplearon el anticuerpo monoclonal MEC 13.3 que reconoce específicamente a el PECAM-1 (7).

Calabrese y colaboradores estudiaron la ontogénesis murina y detectaron en diferentes estadios del desarrollo la expresión de PECAM-1 a través del empleo del anticuerpo monoclonal MEC 13.3 (8).

El estudio del patrón de expresión de esta glicoproteína por citometría de flujo, sobre suspensiones celulares a partir de diferentes órganos sugirió la importancia de los contactos célula endotelial-matriz extracelular durante el proceso de diferenciación endotelial (9).

Durante la angiogénesis el PECAM-1 participa en las interacciones célula endotelial-célula endotelial y célula endotelial-matriz extracelular, y está involucrada en interacciones homofilicas y heterofilicas, reguladas en parte por el dominio citoplasmático del PECAM-1. El procesamiento alternativo (splicing) del ARNm de PECAM-1 genera en murinos ocho isoformas de PECAM-1 que solo difieren en la longitud de su dominio citoplasmático, *in vivo* hay dos isoformas que se expresan de manera predominante (10).

Para investigar el rol de las isoformas del PECAM-1 en la modulación de las funciones de adhesión celular, Sheibani y colaboradores, emplearon una línea celular de riñón de caninos (MDCK). Esta línea fue transfectada con los ADN complementarios de dos de las isoformas de PECAM-1 murino. Encontraron que la expresión de las dos isoformas de PECAM-1 influye de manera diferente en la línea celular, sugiriendo que una de las dos isoformas es una pieza fundamental en las funciones de adhesión celular mediadas por cadherinas.

La migración y la proliferación celular son controladas por múltiples factores tales como: factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento transformante- β y las interacciones de adhesión celular mediadas por receptores de la superficie celular tales como las integrinas.

La iniciación de la migración celular involucra cambios en las interacciones célula-matriz caracterizadas por un remodelado de la matriz y en una alteración de la expresión de los receptores de la matriz, los cuales son procesos dirigidos en parte por factores de crecimientos (11).

El biglicano y la decorina son miembros del grupo de los pequeños PRGs ricos en leucina y tienen unidos los GAGs, dermatán sulfato y/o condroitín sulfato; estos afectan la migración celular por la modulación de las interacciones de los receptores de la superficie celular con los ligandos de la matriz.

Kinsella y colaboradores estudiaron la expresión y procesamiento proteolítico del biglicano, el cual está presente en el lamedopodio de las células endoteliales en migración obtenidas a partir de la sección torácica de la aorta de terneros, está selectivamente inducido por la presencia del factor de crecimiento básico fibroblástico (bFGF) endógeno luego de las múltiples heridas de la monocapa de células, sugiriendo que el metabolismo del biglicano esta involucrado en el control de la migración celular.

Estudios *in vitro* sugirieron que la síntesis de la decorina esta involucrada en el fenómeno de angiogénesis. Por otro lado distintos autores reportan resultados contradictorios en cuanto a la producción y secreción de decorina según el tipo de célula endotelial analizado, por ejemplo la línea de células endoteliales humanas EA hy 926, no sintetiza decorina en los cultivos en monocapa, y tampoco lo hace cuando las células cambian de morfología (12). Por otra parte trabajos realizados con otra línea de células endoteliales de aorta bovina (BAE) dieron como resultado la síntesis de decorina cuando las células en cultivo cambiaban su morfología de monocapa poligonal al fenotipo en brotación. Estos resultados acentúan aún más la intervención de la decorina en el fenómeno de angiogénesis.

La LB vascular es un soporte dinámico, que tiene una íntima relación con las células endoteliales activadas durante los procesos de migración celular.

La producción y secreción de los componentes constituyentes de la LB adquieren relevancia durante los eventos tempranos de la angiogénesis.

Objetivos

La decorina, que forma parte de la familia de los pequeños proteoglicanos ricos en leucina, está formada por los glicosaminoglicanos dermatán sulfato y/o condroitín sulfato. Estos glicosaminoglicanos están involucrados en la modulación de las interacciones entre los receptores de la superficie celular y los ligandos de la matriz extracelular, lo cual tiene un efecto sobre la migración celular. En este sentido, algunos estudios realizados con células endoteliales de origen humano y bovino han sugerido que la expresión de decorina estaría relacionada con la migración celular.

Con el objetivo de adquirir un mejor conocimiento de los eventos moleculares que tienen lugar durante el proceso de neovascularización, en este trabajo de tesina se analizó en diferentes líneas de células endoteliales el perfil de expresión y secreción de la decorina, uno de los componentes de la lámina basal vascular. Por otra parte, se investigó si la migración de células endoteliales está vinculada a la expresión de la decorina.

Materiales y métodos

Cultivo celulares.

La línea celular endotelial H5V, se obtuvo a partir de corazón de ratones, esta línea cardiaca es el resultado de la transformación de células endoteliales con el antígeno T mediano del poliovirus (13). Las líneas celulares endoteliales 1G11 y REC-A4 fueron obtenidas a partir de microvasculatura pulmonar y renal respectivamente (14-15). Los cultivos se mantuvieron a 37 °C, con DEMEN al 10% glutamina, en atmósfera controlada hasta la obtención de una monocapa de células confluyente.

Se determinó el número y viabilidad de las células a través del recuento de las mismas obtenidas luego de la tripsinización controlada, en una cámara de Neubauer. Para la determinación de la viabilidad celular se empleó el método de exclusión del colorante Azul de Tripan (16). Antes de la cosecha de las células se procedió a la extracción de los sobrenadantes de los cultivos de las diferentes líneas y se los mantuvo a -70 °C.

Los cultivos en monocapa confluyente de las distintas líneas de células endoteliales contenidas en cápsulas de Petri fueron cosechados con una solución de Tripsina/EDTA para obtener de esta manera el clivaje de las uniones células-células y células-matriz extracelular.

Obtención de lisados celulares y sobrenadantes de los cultivos. Separación de membranas biológicas por centrifugación diferencial.

Los lisados celulares de las distintas líneas (H5V, 1G11, REC-A4) se obtuvieron en un buffer de lisis (Tris/HCl 50 mM, EDTA 2mM, EGTA 2mM, NaCl 150 mM, Triton x-100 2%, Benzamidina 0.01 M) a través de ciclos de congelamiento y descongelamiento (17). La centrifugación diferencial permitió la separación de la fracción nuclear y las membranas biológicas, esta separación se da gracias a las diferentes velocidades empleadas en la centrifugación, lo que permite poder obtener diferentes fracciones en los diferentes rangos de velocidades que van de menor a mayor. Las fracciones más pesadas precipitan primero y a medida que se aumenta la velocidad precipita lo más liviano. La fracción nuclear se aisló a una velocidad de 1000 rpm durante 5 min, y la fracción microsomal se aisló a una velocidad de 10000 rpm durante 45 min en una centrifuga Sorvall.

Cromatografía de intercambio iónico en columna.

Para el aislamiento de los proteoglicanos (PRGs) del sobrenadante se realizó una columna cromatográfica de intercambio iónico (DEAE-SEPHADEX). La resina se resuspendió en un buffer urea 8 M, Triton 0.5 %, Tris/HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M pH 7.5.

Aislamiento de (PRGs) a partir de los sobrenadantes de células en cultivo.

El aislamiento de los proteoglicanos a partir del sobrenadante de diferentes líneas de células endoteliales en cultivo (1G11, REC-A4 y H5V) se realizó en un buffer urea 8M, NaCl 0.15M, Triton 0.5%, Tris/HCl 0.1 M y pH 7.5. Se llevó a cabo la interacción en batch de cada uno de los sobrenadantes de los cultivos celulares con la resina DEAE-SEPHADEX resuspendida en el buffer antes descrito, durante un periodo de 15 min y con agitación suave cada 5 min.

La separación de la resina se realizó por centrifugación (Sorvall refrigerada) a una velocidad entre los 1500 y 3000 rpm durante 5 a 10 minutos a temperatura ambiente, esto se realizó para favorecer el empaquetamiento en la columna.

Una vez empaquetada la resina en la columna se la lavó con el buffer antes mencionado.

Para la obtención de la elución de la muestra, se realizó un gradiente de concentración de NaCl (0.15M - 2M) en buffer urea 8 M, TRIS/HCl 0.1 M, Triton 0.5 %, NaCl 0.1 M pH 7.5. Este tratamiento generó un progresivo aumento de la fuerza iónica que desprendió a los PRGs de la resina obteniendo de esta manera la elución de las muestra de la columna.

Las muestras eluidas se recolectaron con un colector automático (60 gotas por tubo).

Para la detección de las fracciones se llevó a cabo la técnica colorimétrica Azul de 1-9 Dimetilmetileno (DMMB), la lectura se realizó a una abs de 530nm (18). Las mediciones se realizaron en un espectrofotómetro Hitachi U 2000.

Una vez realizada la determinación colorimétrica se procedió a la recuperación de las muestras que mostraron metacromasia, para su posterior precipitación en etanol absoluto (3,5 vol).

Determinación de la concentración de proteínas en las muestras biológicas.

Con el empleo del Kit BCA protein ASSY se determinó la concentración de las proteínas en las fracciones correspondientes a las membranas biológicas y en los PRGs aislados de los sobrenadantes obtenidos de diferentes células en cultivo (H5V, 1G11 y REC-A4).

Inmunobloting y cuantificación densitométrica.

El estudio de la expresión de la decorina en el sobrenadante y en las membranas biológicas obtenidas a partir de las líneas celulares endoteliales H5V, 1 G 11 y REC-A4 en cultivo fue realizado por Inmunobloting con el empleo del anticuerpo anti decorina (Santa Cruz Biotechnology, INC H-80) sc-22753 y revelado por el sistema avidina/biotina/peroxidasa.

Para la caracterización de las muestras se realizó un gel desnaturalizante al 10% SDS-PAGE. Se realizó la transferencia de las proteínas contenidas en el gel desnaturalizante a la membrana de nitrocelulosa durante unas 2hs 30min. a 60 v, la misma se lavo repetidas veces con TBS-T al 5% (0.05 M Tris, 0.2 M NaCl, 0.1 % Tween-20).

Posteriormente se bloqueó lo inespecífico con leche descremada, durante 1hs a temperatura ambiente en el vortex con agitación suave, durante la hora se realizaron dos cambios de TBS-T al 5% leche.

La membrana se introdujo en una bolsa de parafilm con el borde superior abierto, dentro de la misma se colocó la dilución del anticuerpo primario en TBS-T al 5% leche. Se selló el margen superior de la bolsa y se incubo durante toda la noche.

Una vez terminado el tiempo de incubación se recupero la dilución del anticuerpo primario y se lavo la membrana con TBS-T al 5% leche tres veces (15, 10, 10 min, agitando suave en el vortex). Se incubo con el anticuerpo secundario biotinilado y diluido en TBS-T 5% leche, y luego de una serie de lavados con la solución mencionada y sin leche, se empleó el sistema ABC en TBS-T al 5% sin leche durante 45-60 min. a temperatura ambiente con agitación en el vortex.

Para terminar el revelado se preparó el sustrato de la peroxidasa y se sumergió la membrana en la solución hasta desarrollar color.

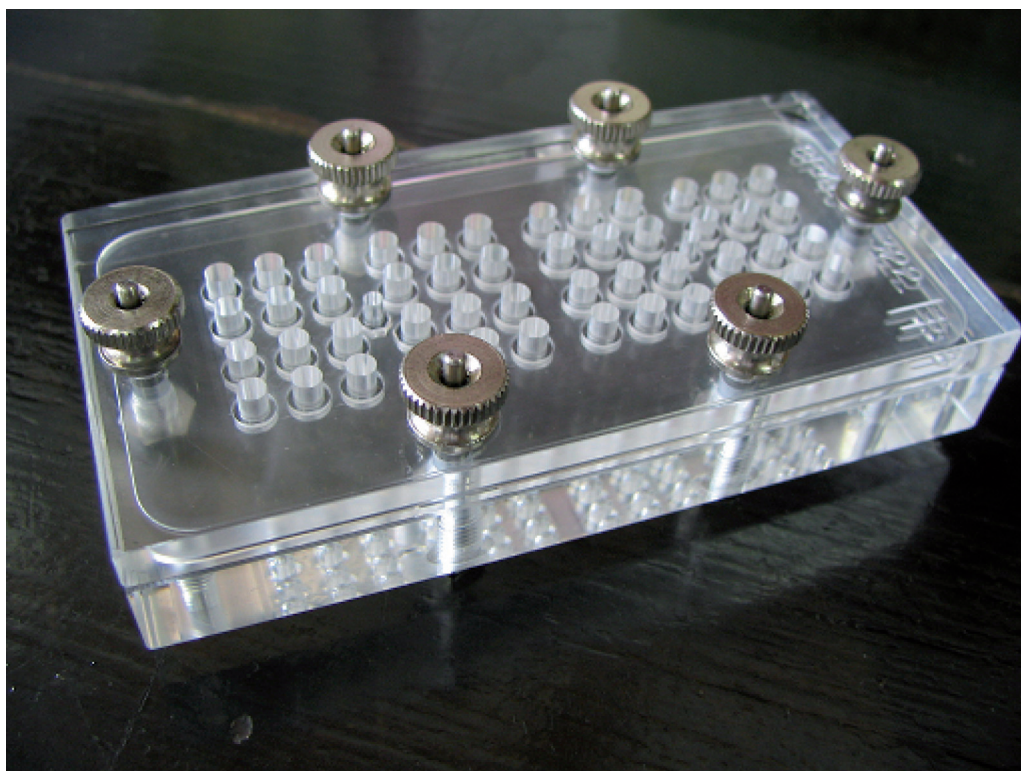
Sobre la membrana se realizó la cuantificación densitométrica de las bandas obtenidas, por aplicación del programa Gel Pro-3.1.

Estudio del movimiento celular por quimiotaxis.

Se realizó el estudio de la migración celular en cámara de Boyden de las diferentes líneas de células en cultivo. La suspensión celular obtenida luego de la cosecha empleando una solución de EDTA tamporada fue sometida a la técnica de migración por quimiotaxis.

Las células fueron cultivadas durante 4 hs en cámara de Boyden frente al estímulo del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF). La muestra celular fue analizada utilizando una membrana de 8 µm de poro, con o sin cubierta de colágeno tipo I. Una vez finalizado el periodo de 4 hs. de incubación se lavo la superficie de arriba de la membrana y se coloreo la superficie inferior de la misma con Hematoxilina-eosina, luego se procedió al recuento de las células que migraron.

En la figura 1 se puede observar la Cámara de Boyden.

Gráfico 1: Fotografía de la Cámara de Boyden.**Evaluación estadística de los resultados obtenidos.**

La interpretación y evaluación estadística de los resultados obtenidos fue realizado por la aplicación del programa Graph Pad.

Resultados**Determinación colorimétrica de Gags**

La determinación colorimétrica de Gags a través de la reacción de metacromasia con el colorante 1-9 dimetilmtilenblue (DMMB), fue realizada según la técnica descrita por Mourao (18).

Esta determinación colorimétrica tiene como objetivo la evaluación de los PRGs eludíos de la columna de intercambio iónico, a través de los GAGs constituyentes.

Protocolo Experimental.

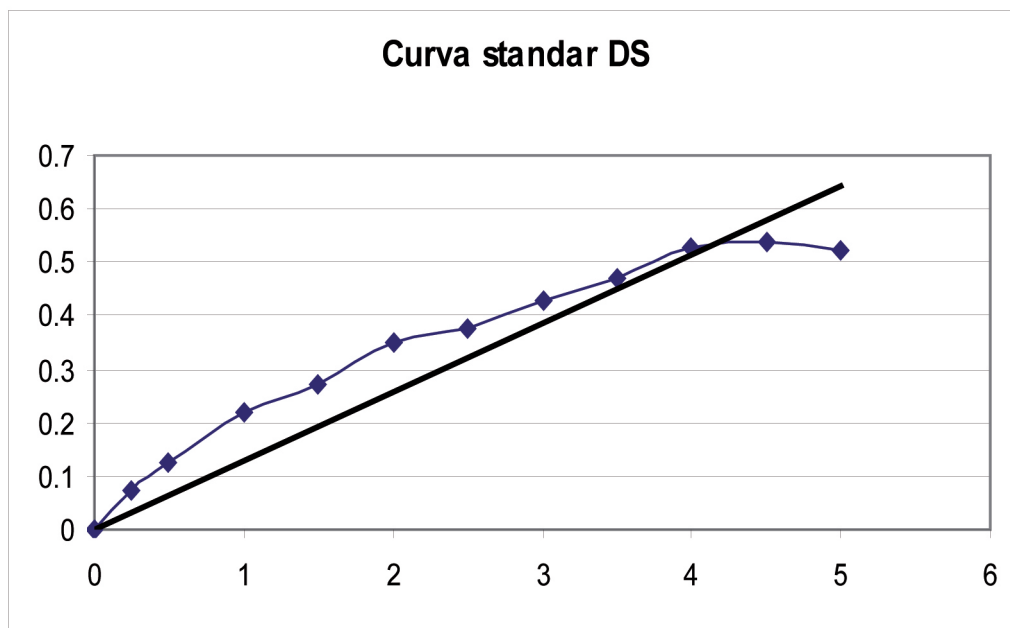
La tabla 1 detalla el protocolo experimental realizado para la puesta a punto de la técnica colorimétrica.

Tubo	$\mu\text{g/vol. final}$	DS 50 $\mu\text{g/ml}$ μl	H ₂ O μl	DMMB ml	Abs _{530nm}	Abs _m
Bco.	-	-	100	2.5	-	-
1	0.25	5	95	2.5	0.083/0.059	0.071
2	0.5	10	90	2.5	0.133/0.118	0.123
3	1	20	80	2.5	0.225/0.217	0.221
4	1.5	30	70	2.5	0.246/0.298	0.272
5	2	40	60	2.5	0.334/0.363	0.349
6	2.5	50	50	2.5	0.350/0.402	0.376
7	3	60	40	2.5	0.417/0.439	0.428
8	3.5	70	30	2.5	0.444/0.491	0.468

9	4	80	20	2.5	0.535/0.522	0.529
10	4.5	90	10	2.5	0.541/0.533	0.537
11	5	100	-	2.5	0.500/0.539	0.520

En el gráfico 1 se muestra la curva estándar y la ecuación de la recta correspondiente al protocolo experimental detallado arriba.

Gráfico 1: Esquema de la curva estándar.



Ecuación de la recta
 $Y = 0.1288x$
 $R^2 = 0.8687$

Obtención y aislamiento de los PRGs a partir de los sobrenadantes de las células en cultivo.

A partir de los sobrenadantes de las diferentes células endoteliales en cultivo se obtuvieron y aislaron los PRGs, por medio de cromatografía de intercambio iónico en columna. Sobre los eluidos obtenidos a partir de la columna se realizó la determinación colorimétrica con el colorante 1-9 DMMB.

Los gráficos 2, 3 y 4 corresponden a los diferentes perfiles de elución obtenidos para las diferentes líneas celulares frente a un gradiente de concentración de cloruro de sodio (NaCl).

El sobrenadante de la línea celular 1G11 mostró metacromasia desde la fracción 36 hasta la 44 (Gráfico 2); mientras que la metacromasia detectada para el sobrenadante correspondiente a la línea celular H5V abarcó las fracciones 35 hasta la 52 (Gráfico 3).

El gráfico 4 muestra las absorbancias registradas para los PRGs aislados a partir del sobrenadante de la línea REC-A4. Tanto para la línea 1G11 como para la línea H5V se obtuvo un halo blanco luego de la precipitación con etanol absoluto (ver materiales y métodos). Sin embargo para las fracciones con metacromasia positiva correspondiente a los eluidos obtenidos a partir de la línea REC-A4, no fue posible detectar halo blanco luego de la concentración con etanol absoluto.

Este resultado sugiere que los bajos valores de metacromasia registrado son inespecíficos.

Gráfico 2: Detección de metacromasia con el colorante 1-9 DMMB en el sobrenadante de la línea 1G11.

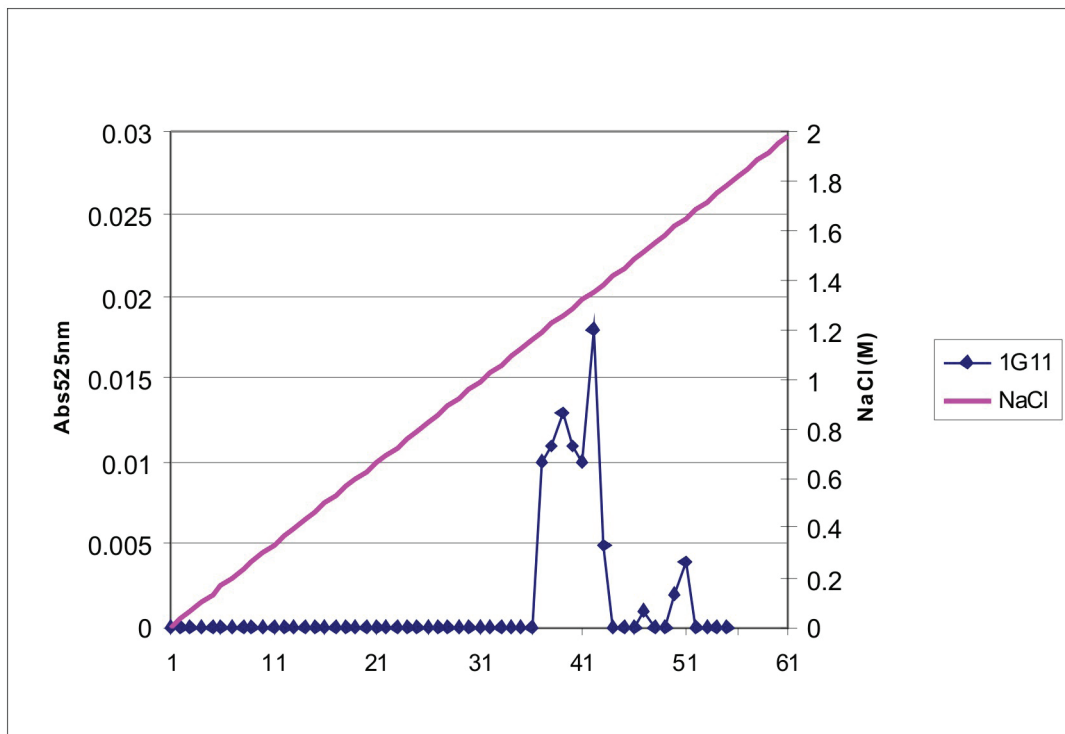


Gráfico 3: Detección de metacromasia con el colorante 1-9DMMB en el sobrendante de la línea H5V.

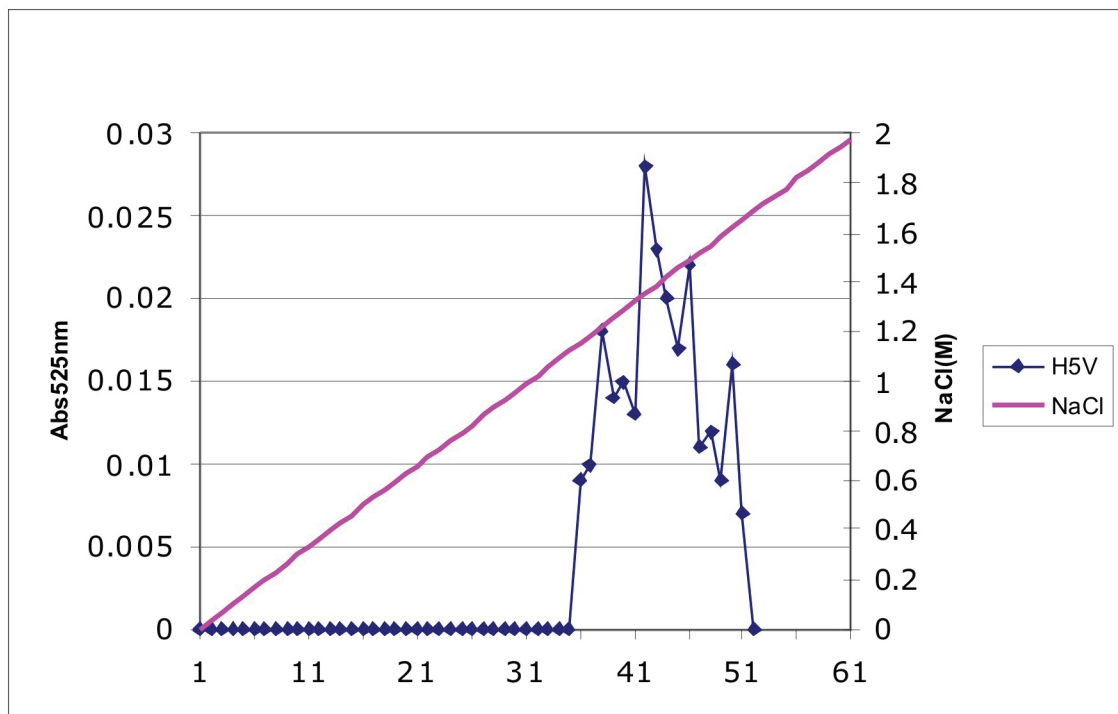
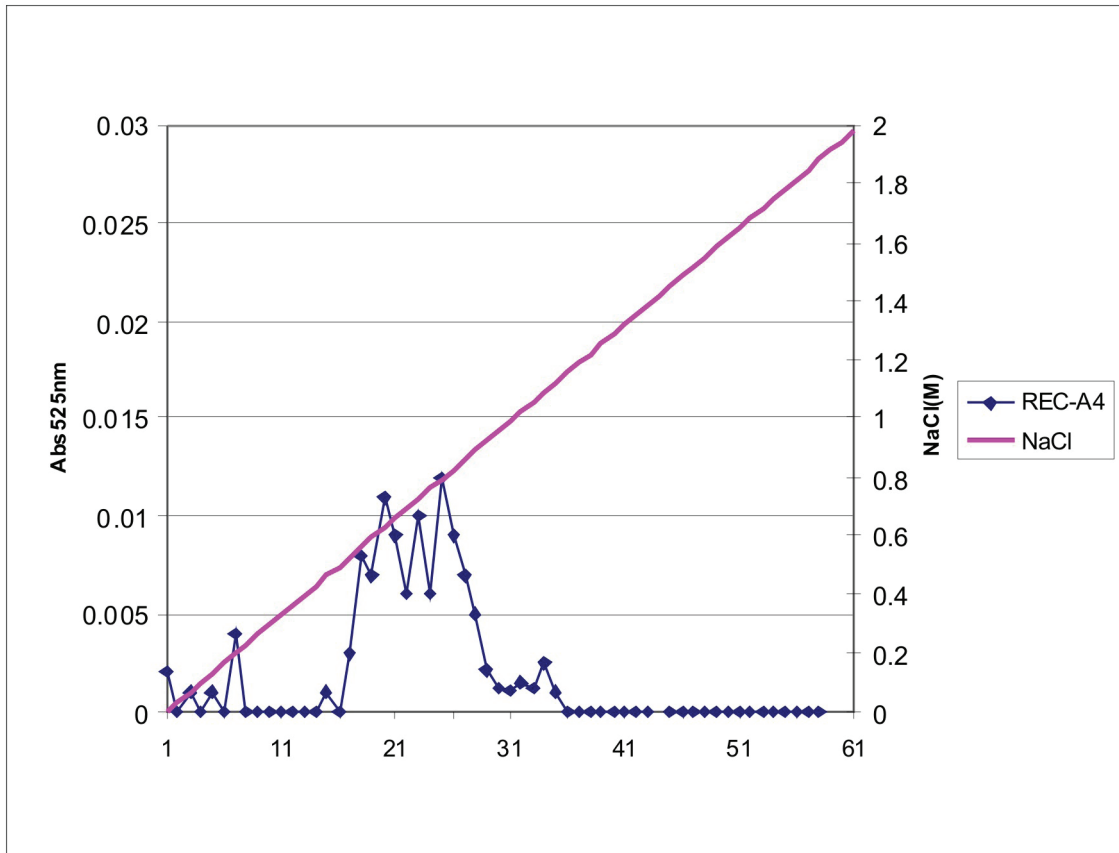


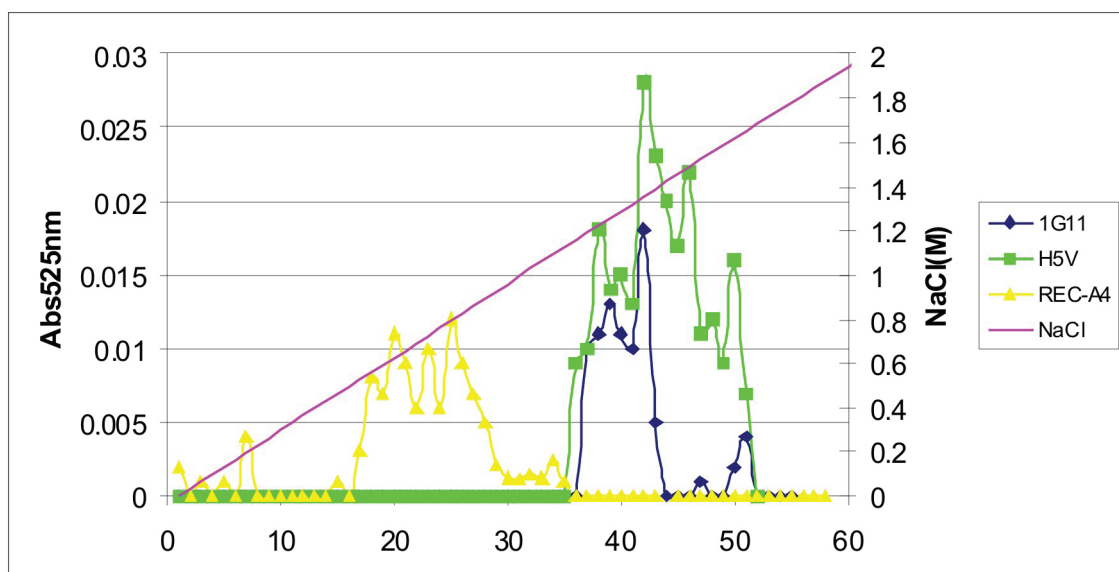
Gráfico 4: Detección de metacromasia con el colorante 1-9 DMMB en el sobrenadante de la línea REAC-A4.



En el gráfico 5, gráfico comparativo, puede observarse los diferentes perfiles de elución de los sobrenadantes de las distintas líneas celulares empleadas.

Las fracciones con metacromasia positiva obtenidas a partir del sobrenadante correspondiente a la línea H5V requirió para su elución una concentración de NaCl entre 1.2 a 1.7 M. Mientras que las fracciones con metacromasia positiva correspondiente a la línea 1G11 eluyó en un rango de concentración entre 1.2 a 1.4 M.

Gráfico 5: Detección comparativa de metacromasia en las tres líneas celulares.



Los resultados descritos sugieren:

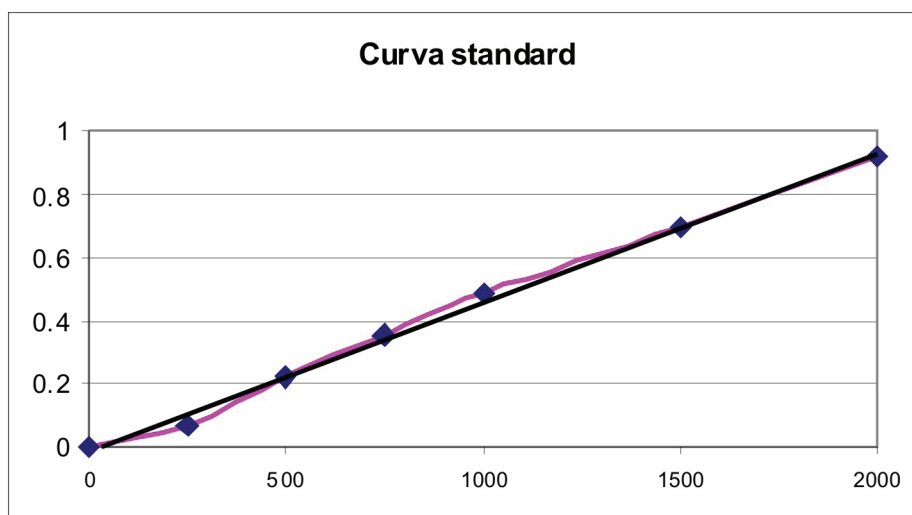
- Las diferentes concentraciones de NaCl requeridas para la elusión de los PRGs correspondientes a las líneas 1G11 y H5V podría estar relacionada con una diferente carga negativa.
- Los PRGs secretados al medio por la línea REC-A4 podrían no ser detectados por la metodología empleada.

Determinación de la concentración de proteínas en los sobrenadantes y en las membranas biológicas.

La concentración de proteínas en los sobrenadantes y en las membranas biológicas obtenidas a partir de las diferentes líneas celulares, se evaluó a través de una microtécnica colorimétrica.

El gráfico 6 muestra la curva standard obtenida a partir del protocolo experimental antes descrito.

Gráfico 6



Ecuación de la recta:

$$Y = 0.0005x$$

$$R^2 = 0.9965$$

La tabla 2 detalla el protocolo experimental realizado para la determinación de la concentración de proteínas.

µg/ml Albúmina	Reactivo (µl)	Abs _{540nm}
0	200	0
250	200	0.072
500	200	0.219
750	200	0.353
1000	200	0.485
1500	200	0.698
2000	200	0.915

Memb. biológicas	Reactivo	Abs	µg/ml (proteínas)	Sobrend.	Reactivo	Abs	µg/ml (proteínas)
1G11	200	0.499	988	1G11	200	0.527	659
H5V	200	0.177	354	H5V	200	0.320	400
REC-A4	200	1.273	1.273	REC-A4	200	0	0

Los resultados sugieren:

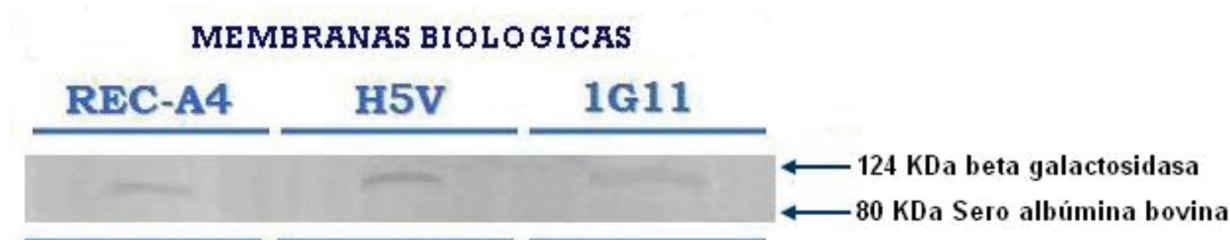
- Una diferente producción de proteínas totales en las membranas biológicas para las tres líneas celulares analizadas, como así también en el sobrenadante.

4. Estudio del PRG Decorina en membranas biológicas por Inmunoblotting.

La identificación del PRG Decorina en las membranas biológicas de las diferentes líneas celulares se realizó por medio de la técnica **Inmunoblotting**, con el empleo del anticuerpo anti decorina (Santa Cruz Biotechnology, INC H-80) sc 22753.

El gráfico 7 muestra una fotografía de la membrana de nitrocelulosa obtenida para las membranas biológicas correspondientes a las diferentes líneas celulares.

Gráfico 7: Fotografía de la membrana de nitrocelulosa (Membranas Biológicas).



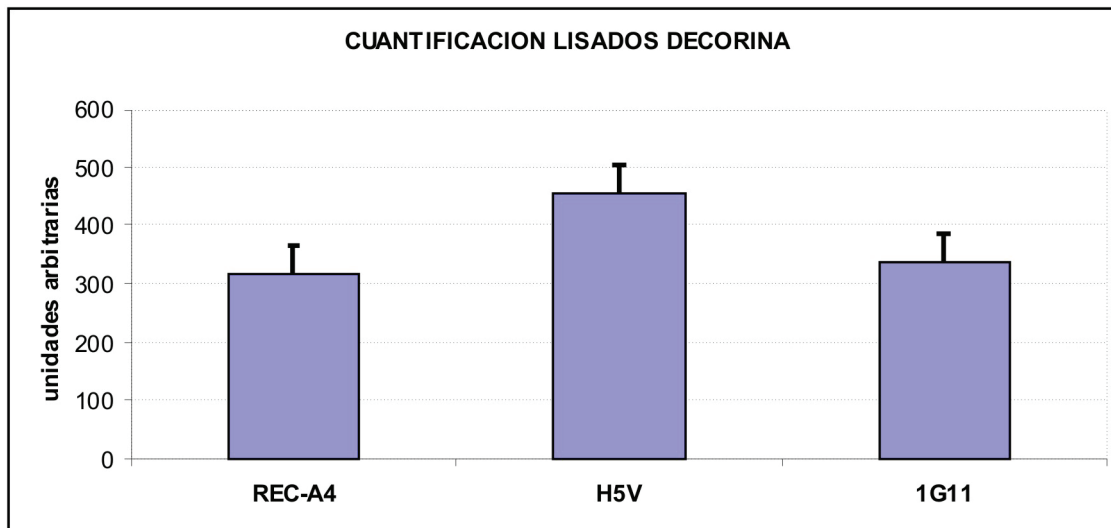
En la imagen se puede observar la identificación de una banda de un PM comprendido entre 124-80 KDa.

4.1. Cuantificación densitométrica de las bandas de decorina a partir de las membranas biológicas.

La cuantificación densitométrica de las bandas de las membranas biológicas se realizó sobre la membrana de nitrocelulosa por medio de la aplicación del programa Gel Pro-3.1.

El gráfico 8 muestra la densidad de las bandas para la decorina medida en las membranas biológicas.

Gráfico 8: Análisis densitométrico de las membranas biológicas.



Como puede observarse la cuantificación de la decorina en los lisados celulares no mostro diferencias significativas entre las lineas REC-A4 y 1G1.

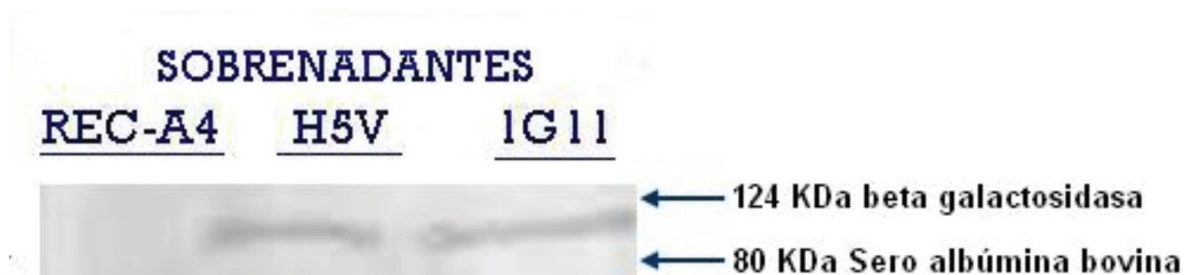
Los resultados obtenidos sugieren:

- Las tres líneas celulares endoteliales producen una isoforma de decorina de un peso molecular comprendido entre 80-124 KDa.
- La densidad detectada en las bandas de decorina varía entre las líneas celulares. Estos valores son similares para las líneas REC-A4 y 1G11; mientras que la línea H5V registró un valor superior.

5. Estudio del PRG decorina en el sobrenadante de las líneas celulares por inmunobloting.

El estudio del PRG decorina en el sobrenadante de las diferentes líneas celulares se realizó por inmunobloting, esta técnica se describió para el estudio del PRG en las membranas biológicas. El gráfico 9 muestra la fotografía obtenida para los sobrenadantes.

Gráfico 9: Fotografía de la membrana de nitrocelulosa (sobrenadantes).



En la determinación de decorina en los sobrenadantes no se pudo identificar la misma en la línea REC-A4.

Los resultados obtenidos sugieren:

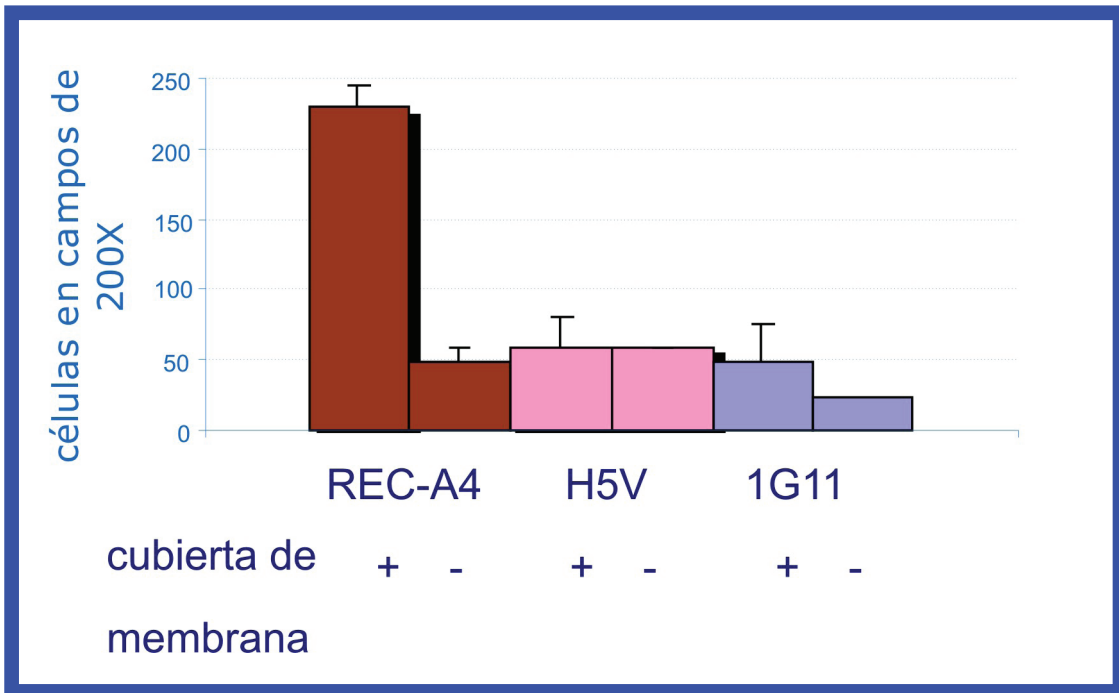
- La exportación de decorina se detectó en las líneas celulares H5V y 1G11.
- La no detección del PRG producido por las células REC-A4 podría ser el resultado de su degradación en el espacio extracelular.

6. Estudio del movimiento celular de las diferentes líneas en cultivo por quimiotaxis.

El grafico 10 muestra el desplazamiento (número de células por campo) de las líneas celulares en presencia o ausencia de una cubierta de colágeno tipo I

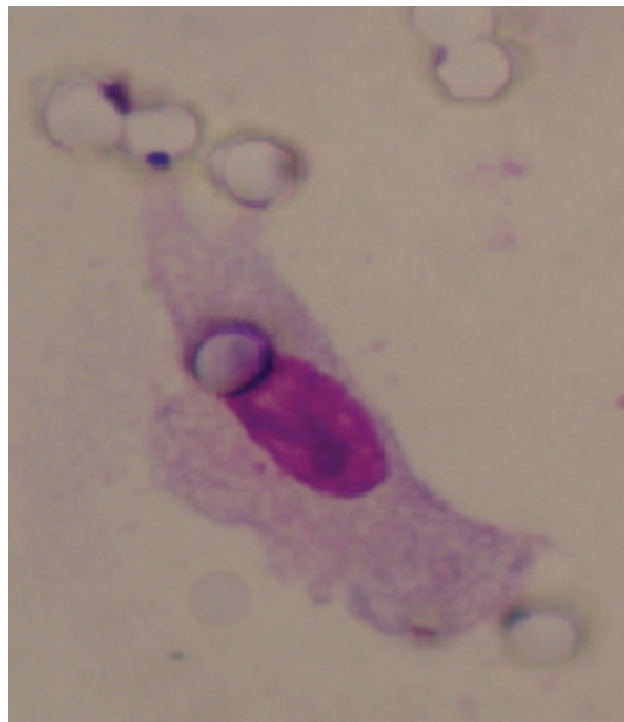
En este estudio se pudo observar la diferencia migratoria que existe en las tres líneas empleadas en el trabajo. La línea REC-A4 mostró un comportamiento migratorio mayor a las otras dos líneas (1G11 y H5V). El La fotografía de una célula migrando se esquematiza en el grafico 11.

Gráfico 10: Esquema representativo de la migración celular de las diferentes líneas empleadas.



En el esquema se puede observar la diferencia migratoria que existe entre las tres líneas.

Gráfico 11: Fotografía de una célula en plena migración, se puede observar fácilmente los lamelipodios.



Los resultados obtenidos sugieren:

- Que podría existir una degradación de la decorina en el espacio extracelular de las células correspondientes a la línea REC-A4. En dicha degradación el PRG podría liberar factores de crecimiento que estimularían la migración celular.
- Como así también podría deberse a que en la degradación del PRG, los residuos peptídicos o los GAGs intervengan en la interacción con la fibronectina.

Discusión

La MEx vascular esta compuesta por la Lamina basal vascular (LBV) y el compartimiento intersticial. Dos décadas atrás se creía que ésta era solo un soporte mecánico celular, sin embargo hoy se sabe que cumple un rol dinámico en el control de las funciones celulares.

La LBV es la capa donde se anclan las células endoteliales. Esta delgada capa esta involucrada en diversas funciones entre las cuales podemos citar: la reparación de los tejidos luego de la injuria y el desarrollo embrionario. Los principales componentes constituyentes de la LBV son, proteínas tales como la **Fibronectina, Colágeno de tipo IV y Laminina**, y diversos **PRGs**. Estos últimos componentes son parte estructural de la LBV, e intervienen en diferentes funciones celulares, como por ejemplo la migración celular.

En el presente trabajo se estudió la expresión de uno de los constituyentes de la LBV, el PRG Decorina, perteneciente a la familia de los pequeños PRGs ricos en leucina.

El empleo de diferentes líneas celulares tales como REC-A4, H5V y 1G11 nos permitió analizar el perfil de producción y secreción del mencionado PRG.

La expresión de los pequeños PRGs ricos en leucina: biglicano, PG100 y decorina sería regulada de manera diferencial en las células endoteliales de la macrovasculatura humana (EAhy 926), frente a un estímulo inflamatorio como el factor tumoral necrosante- α (TNF- α) (12).

El estímulo con factor de crecimiento fibroblástico (FGF) o la injuria endotelial de los cultivos en monocapa confluyente de células endoteliales de aortas bovinas (BAE), indujo la síntesis y degradación de otro PRG perteneciente a la familia de los pequeños PRGs ricos en leucina: biglicano. Estas células distribuyen el biglicano en el lamelipodio durante la migración (11).

Los estudios *in vitro* descriptos anteriormente no permiten dilucidar el rol de la decorina durante los eventos de reparación tisular.

El análisis en diferentes muestras obtenidas a partir de biopsias a pacientes que cursaban procesos inflamatorios sugirieron que: la formación de los tubos capilares requiere del remodelado dinámico de la MEx vascular. En este remodelado adquiere importancia la interacción de la decorina con las biomoléculas constituyentes de la MEx vascular (19). Por ejemplo la decorina esta involucrada en la unión al colágeno, en la formación de las fibras y en la orientación ortogonal de las mismas (20).

Además en este remodelado la actividad de los factores de crecimientos presentes regularía la angiogénesis. La interacción entre los factores de crecimiento y la decorina modularían la disponibilidad de los mismos.

Específicamente se ha descrito que la decorina se une al factor de crecimiento transformante- β (TGF- β), neutralizando la acción antiangiogénica de esta citoquina.

La interacción decorina-TGF- β bloquearía la unión de la citoquina inflamatoria a sus receptores celulares, haciéndolas sensibles al estímulo angiogénico del Factor de crecimiento Fibroblástico 2 (FGF 2) (19).

En este proceso multifactorial que regula el remodelado tisular durante la injuria, la decorina ejercería además un efecto preventivo en la apoptosis endotelial. Además estimularía la expresión y activación de las enzimas asociadas al proceso angiogénico: Colagenasa y Fosfolipasa A2.

Las condiciones experimentales de nuestro estudio, sin estímulos extracelulares, posibilitaron analizar la producción y secreción del PRG decorina en cultivos en monocapa confluyente sobre distintas líneas endoteliales.

Nuestros resultados reflejan un perfil de expresión y secreción diferente de decorina en las distintas líneas analizadas.

La expresión de decorina estudiada en las membranas biológicas de las diferentes líneas presentó un perfil distinto de producción. Todas las líneas muestran una isoforma de decorina de un PM comprendido entre 80-124 KDa, aunque con un perfil de expresión diferente.

Cuando se analizó la secreción al espacio extracelular, la decorina pudo ser detectada solo en el sobrenadante de las líneas 1G11 y H5V.

Las tres líneas de células endoteliales empleadas producen decorina en las condiciones experimentales de trabajo, es decir frente al estímulo de factores de crecimiento que se encuentran en el suero fetal bovino que suplementa el medio de cultivo.

La expresión diferencial podría relacionarse en una diferente capacidad de anclaje de las células a la LB que sintetizan ellas mismas durante el desarrollo de la monocapa

Como se describió anteriormente el PRG decorina fue detectado en el sobrenadante de las líneas 1G11 y H5V. Sin embargo no pudo determinarse su expresión en el sobrenadante de la línea REC-A4. Esto podría reflejar una posible degradación por parte de las enzimas proteolíticas presentes en el medio. Dentro de las listas de estas enzimas podemos mencionar la **Metaloproteasa 2 (MPP2)** y la **Plasmina**.

Las células endoteliales tienen un origen embriológico común: los **angioblastos**, sin embargo en un organismo adulto se diferencian en tres fenotipos: Fenestrado o Sinusoide, Continuo y Discontinuo. Este potencial de diferenciación está vinculado con las interacciones que tienen las células endoteliales con el medio ambiente de un órgano o de un tejido, o las interacciones células-células o células- factores de crecimiento. En consecuencia no todas las células endoteliales producen la misma calidad de lámina basal, por lo tanto frente a diferentes estímulos extracelulares tales como procesos inflamatorios, injuria de tejidos y neovascularización, la respuesta va a ser diferente.

El conocimiento de los eventos moleculares involucrados en el anclaje de las células endoteliales a su LB posibilitaría el desarrollo de nuevas terapias para el control del proceso de neovascularización durante la reparación tisular.

Bibliografía

- Lodish Berk, Matsudaria Kaiser, Krieger Scout, Zipursky Darnell. Biología celular y Molecular. 5^{ta} edición, Cap. VI, Editorial Médica Panamericana, 2005.
- Gerald Karp. Biología celular y Molecular, conceptos y experimentos. 4^{ta} edición, Cap. IV, Editorial Médica Mc Grawhill, 2005.
- Richard L. Jackson, Steven J. Busch, y Alan D. Cardin. Glycosaminoglycans molecular properties, protein interactions, and role in physiological processes. *Physiological Reviews*, 71, (2), 1991.
- Finn Geneser. Histología. Edit. Panamericana. Cap 15. 1987.
- Werner Risau. Differentiation of endothelium. *FASEB J.*, 9, 926-933, 1995.
- Daniel Vittet, Marie-Helene Prandini, Rolande Berthier, Annie Schweitzer, Herve Martin-Sisteron, Gerges Uzan, y Elissabeta Dejana. Embryonic Stem Cells Differentiate in vitro to Endothelial Cells Through Successive Maturation Steps. *Blood*, 88, (9), 3424-3431, 1996.
- Vecchi A. Garlanda, C. Lampugnani, M. Resanti, M. Matteucci, C Stoppaciario, A. Schnurch, H Risau, W. Ruco, L. Mantovani, A., Dejana E. Monoclonal antibodies specific for endothelial cells of mouse blood vessels. Their application in the identification of adult and embryonic endothelium. *Eur. J. Cell Biol.*, 63, 247-254, 1994.
- Graciela Calabrese, Marta Fernandez de Recondo, Eduardo Recondo y Rosa Wainstok de Calmanovici. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 expression during mouse postimplantation development. *Cellular and Molecular Biology*, 44, (3), 537-541, 1998.
- Graciela Cristina Calabrese, y Rosa Wainstok. Tissue expresión of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 at pre and postnatal murine development. *Biocell*, 28, (3), 251-258, 2004.
- Nader Sheibani, Christine M. Sorenson y William A. Fraizer. Differential Modulation of cadherin-mediated cell-cell adhesion by platelet endothelial cell adhesion molecule-1 isoforms through activation of extracellular regulated kinases. *Molecular Biology of the cell*, 11, 2793-2802, 2000.
- Michael G. Kinsella, Christena K. Tosi, Hannu T. Jarvelainen y Thomas N. Wigth. Selective expression and processing of biglycan during migration of bovine aortic endothelial cells. *JBC*, 272, (1), 318-325, 1997.
- Lassi Nelimarkka, Varpu Kainulainen, Elke Schonherr, Susanna Moisander, Matti Jortikka, Mikko Lammi, Klaus Elenius, Markku Jalkanen y Hannu Jarvelainen. Expression of small extracellular chondroitin/dermatan sulfate proteoglycans is differentially regulated in human endothelial cells. *JBC*, 272, (19), 12730-12737, 1997.
- Garlanda C, Parravicini C, De Rossi M, Wainstok de Calmonovici R, Carrozzi F, Bussolino F, Mantovani A, Vecchi A. Progressive growth in immunodeficient mice and host cell recruitment by mouse endothelial cells transformed by polyoma middle-size T antigen: implications for the pathogenesis of

- opportunistic vascular tumors. *Proc Nat. Acad Sci USA* 91, 7291-7295, 1994.
- Dong OG, Bernasconi S., Lostaglio S., De Calmonovici RW., Martin-Padura I., Breviario F., Garlanda C., Ramponi S., Mantovani A., Vecchi A. A general strategy for isolation of endothelial cells from murine tissues. Characterization of two endothelial cell lines from the murine lung and subcutaneous sponge implants. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17, (8), 1599-1604, 1997.
 - Gazzaniga S., Gonzales L., Mantovani A., Vecchi A., Wainstok R. Isolation and molecular characterization of a mouse renal microvascular endothelial cell line. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 40, (3-4), 82-88, 2004.
 - Mishell Shigi. Selected methods in cellular immunology. Cap I. Edit. Consultans. 1980.
 - Sabrina Cattaruzza, Monica Schiappacassi, Ana Ljunberg Rose, Padua Spessotto, Daniela Paissinato, Matthia Margelin, Maria Teresa Mucignat, Alfonma Calambatti. Distribution of PG-M/Versican Variants in human tissues and de novo expression of isoform V3 upon Endothelial cell activation, migration, and neoangiogenesis in vitro. *JBC* 277, (49), 47626-47635, 2002.
 - Mourao P., Pereira M., and Pavao M. Structure and anticoagulant activity of a fucosylate chondroitin sulfate from echinoderm. *JBC* 271 23973-23984, 1996.
 - Nelimarkka Lassi, Salminen Heli, Kuopio Teijo, Nillari, Ekfors Tauno, Laine Jukka, Pellniemi Lauri, and Jarvelainen Hannu. Decorin is Produced by Capillary Endothelial Cells in Inflammation-Associated Angiogenesis. *AJP*, 158, (2), 2001.
 - Kuwaba Kumiko, Kobayashi Miya, Nomura Yoshihiro, Irie Shinkichi and Koyama Yoh-ichi. Elongated dermatan sulphate in post-inflammatory healing skin distributes among collagen fibrils separated by enlarged interfibrillar gaps. *Biochem. J.*, 358, 157-163, 2001.

