

**Universidad Autónoma de Baja California**  
**Instituto de Ingeniería**  
**Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería**



**Evaluación del proceso de angiogénesis *in vitro* en nanoestructuras de óxido de Titanio (TiO<sub>2</sub>) en endotelio aislado de arterias de pacientes con aterosclerosis.**

**Tesis que para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias**

PRESENTA

Martha Teresa García López Portillo

Director de Tesis

Dr. Ernesto Alonso Beltrán Partida

Co-Director

Dr. Benjamín Valdez Salas

Mexicali, B.C. Enero 2023.

## ***AGRADECIMIENTOS***

Le agradezco a Dios por la vida y su infinito amor, que es lo que me permitió realizar esta aventura.

Le doy gracias a mi esposo José Carlos y a mis hijos Alicia, Pedro y Mariana que me apoyaron en tiempos difíciles, con amor, tiempo y trabajo. Sin ustedes no lo habría logrado.

Le doy gracias a mi tutor el Dr. Ernesto Alonso Beltrán Partida por creer en mí, por su paciencia, comprensión, enseñanzas y apoyo a lo largo de estos cuatro años.

Gracias al Dr. Benjamín Valdez Salas por estar siempre al pendiente y su apoyo en todo momento.

Gracias a mi colega y amiga Dra. Ana Gabriela Leija Montoya por todos sus consejos, enseñanzas y por apoyarme con equipo y reactivos para realizar mis experimentos.

Gracias al Dr. Víctor Guadalupe García González por ayudarme siempre que se lo solicité.

Le agradezco al Dr. Nicolás Serafín Higuera por dejarme usar siempre su laboratorio y apoyarme con equipo y materiales.

Le doy gracias al Maestro Gustavo Coronilla que realizó los cortes histológicos.

Les agradezco a mis amigas y compañeras Sandra Leticia Castillo Uribe y Claudia Celeste Gutiérrez Pérez por apoyarme con sus conocimientos, su tiempo y por su compañía.

Finalmente, gracias a CONACYT por otorgarme una beca.

<b>ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>11</b>
<b>CAPÍTULO 1 .....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>13</b>
<b>CAPÍTULO 2 .....</b>	<b>15</b>
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>15</b>
2.1 <i>Enfermedades cardiovasculares.....</i>	15
2.2 <i>Vasos sanguíneos.....</i>	16
2.3 <i>Células endoteliales y macrófagos.....</i>	19
2.4 <i>Caracterización molecular de células endoteliales.....</i>	23
2.5 <i>Fisiopatología de la aterosclerosis.....</i>	25
2.6 <i>Marcadores de los fenotipos de macrófagos.....</i>	27
2.7 <i>Endoprótesis vasculares.....</i>	27
2.8 <i>Modelos y biomateriales para estudio de células endoteliales y macrófagos.....</i>	28
2.9 <i>Interacción célula-nanoestructura.....</i>	32
2.10 <i>Influencia de la topografía de superficie sobre la activación de los macrófagos.....</i>	34
2.11 <i>Papel de los macrófagos en la endotelización de endoprótesis vascular.....</i>	34
2.12 <i>Métodos de esterilización de las superficies de Titanio.....</i>	35
<b>OBJETIVOS DEL ESTUDIO .....</b>	<b>37</b>
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>39</b>
<b>EVALUACIÓN DE CÉLULAS ENDOTELIALES AISLADAS DE PACIENTE CON ATROSCLEROSIS SOBRE SUPERFICIES DE NANOTUBOS DE TIO<sub>2</sub> .....</b>	<b>39</b>
3.1 <b>ESTADO DEL ARTE.....</b>	39
3.2 <b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	41
3.2.1 <i>Diseño de estudio.....</i>	41
3.2.2 <i>Síntesis de nanotubos de dióxido de Titanio (NTs).....</i>	41
3.2.3 <i>Aprobación por el Comité de Ética y toma de muestras de tejido vascular .....</i>	42
3.2.4 <i>Técnica de tinción con hematoxilina y eosina.....</i>	42
3.2.5 <i>Técnica de aislamiento de células endoteliales por digestión mecánica y enzimática.....</i>	43
3.2.6 <i>Cultivo celular primario.....</i>	44

3.2.7 Evaluación de la morfología celular por microscopía electrónica de barrido (SEM).....	44
3.2.8 Inmunofluorescencia para caracterización de células endoteliales con anticuerpo conjugado anti-factor von Willebrand. ....	45
3.2.9 Técnica de inmunofluorescencia para análisis de citoesqueleto y uniones intercelulares de células endoteliales sobre superficies de NTs. ....	46
3.2.10 Evaluación de la viabilidad y proliferación celular.....	46
3.2.11 Evaluación de la viabilidad mitocondrial de células endoteliales sobre superficies de NTs por inmunofluorescencia.....	47
3.2.12 Análisis estadístico .....	48
<b>3.3 RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
3.3.1 Características de los pacientes con aterosclerosis.....	49
3.3.2 Estudio histopatológico .....	50
3.3.3 Aislamiento y cultivo celular .....	53
3.3.4 Adherencia y morfología celular de endotelio sobre superficies de TiO <sub>2</sub> .....	55
3.3.5 Caracterización de células endoteliales.....	59
3.3.6 Análisis de citoesqueleto de endotelio venoso sobre superficies de NTs por inmunofluorescencia.....	60
3.3.7 Evaluación de viabilidad de células endoteliales.....	62
3.3.8 Viabilidad mitocondrial de células endoteliales de vena.....	64
<b>3.5 DISCUSIÓN .....</b>	<b>66</b>
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>74</b>
<b>MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA DE MACRÓFAGOS MURINOS RAW 264.7 EN SUPERFICIES DE NTS CON TRES TRATAMIENTOS DE ESTERILIZACIÓN.....</b>	<b>74</b>
4.1 ESTADO DEL ARTE.....	74
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS .....	76
4.2.1 Diseño de estudio.....	76
4.2.2 Síntesis de NTs.....	76
4.2.3 Métodos de esterilización de superficies de NTs.....	76
4.2.4 Cultivo celular de macrófagos .....	77
4.2.5 Análisis de morfología celular por SEM.....	77
4.2.6 Evaluación de la viabilidad celular: Ensayo MTT.....	78

4.2.7 Inmunofluorescencia de citoesqueleto de macrófagos RAW 264.7.....	78
4.2.8 Análisis de expresión de macrófagos RAW 264.7 sembrados sobre las superficies.....	79
4.2.9 Análisis estadístico .....	80
<b>4.3 RESULTADOS .....</b>	<b>81</b>
4.3.1 Pruebas de viabilidad (ensayos MTT).....	81
4.3.2 Adherencia y morfología de los macrófagos RAW 264.7 sobre las superficies..	81
4.3.3 Citoesqueleto de actina en macrófagos RAW 264.7 sobre superficies de NTs con diferentes técnicas de esterilización. ....	86
4.3.4 Análisis de expresión de macrófagos RAW 264.7 sobre superficies de NTs esterilizadas. ....	89
4.4 DISCUSIÓN .....	94
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>100</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>101</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>114</b>

## Índice de tablas y figuras

Figura 1 Estructura general de la pared vascular (14).....	17
Figura 2 Organización de la vasculatura. La vasculatura se organiza en arterias (rojo) y venas (azul) interconectadas por capilares, así como por capilares linfáticos que terminan con puntas ciegas y vasos colectores (verde) que drenan fluidos hacia la circulación venosa. Las arteriolas, capilares y vénulas forman parte de la microvasculatura, y es el sitio donde existe mayor cantidad de uniones intercelulares. La anatomía de los vasos capilares se muestra en la parte superior de la imagen y la anatomía de los grandes vasos en la parte inferior (18). (MB= membrana basal).....	18
Figura 3 Inmunofluorescencia monocapa de CE venosas humanas. Núcleos en azul, vWF en rojo y vinculina en verde (16).....	19
Figura 4 Diferencias fenotípicas entre células tip y stalk. La cabeza de las células punta o tip (verde) extienden filopodias hacia el gradiente VEGF-A (naranja) y células tallo o stalk (moradas) forman el vaso y el lumen (23).....	22
Figura 5 Actuación de los macrófagos en diferentes etapas de progresión de la aterosclerosis. La aterosclerosis es iniciada por el depósito subendotelial de lípidos. Los monocitos circulantes son reclutados en la lesión por adhesión a células endoteliales activadas e ingresan al espacio subendotelial. Dentro de la placa los macrófagos fagocitan los lípidos depositados y se transforman en células espumosas, formando lesiones ateroscleróticas tempranas. Los macrófagos en la lesión inducen una respuesta inflamatoria, promueven mayor depósito de lipoproteínas, alteración de la matriz extracelular, manteniendo un proceso inflamatorio crónico. LDL oxidados (oxLDL) inducen necrosis de las células espumosas, lo que constituye el centro necrótico, que conducen a inestabilidad y ruptura de las placas avanzadas. Abreviaturas: CCL: ligando de quimiocinas; ECM: matriz extracelular; ER: retículo endoplásmico; Fas-L: ligando Fas; ICAM: molécula de adhesión intercelular; IFN: interferón; IL: interleucina; KLF4: Kruppel-like factor 4; MMP: matriz metaloproteínasa; NF-κB: factor nuclear de kappa B; NLRP3: leucina-rico repeat pyrin dominio rico en leucina repetido pirina- 3; oxLDL: lipoproteínas de baja densidad oxidadas; PSGL-1: ligando 1 de glucoproteína P-selectina; ROS: especies reactivas de oxígeno; SMC: células de músculo liso; SR-A:	

receptor tipoA scavenger; TNF: factor de necrosis tumoral; TLR: receptor tipo toll; VCAM: molécula de adhesión celular vascular;VLA-4:antígeno 4 muy tardío (35)...	26
Figura 6 Modelos de estudio comúnmente utilizados para la caracterización de CE en regeneración vascular, de tejidos blandos y óseos (4). Los parámetros marcados en negro se utilizan para caracterización, en azul los que son importantes para regeneración vascular y en verde los que se utilizan para regeneración de tejidos blandos y hueso.	29
Figura 7 Configuración del anodizado (a), mecanismo de separación de paredes de los poros durante la anodización (b), transición de nanoporos a nanotubos en micrografías SEM (c) (51).	30
Figura 8 Representación esquemática que ilustra los efectos de los nanotubos (NT) anodizados de TiO <sub>2</sub> mejorando el proceso angiogénico en términos de formación de una monocapa, viabilidad, proliferación y activación de factores endoteliales comparada con una superficie de óxido de Titanio (Ti6Al4V) no anodizada (5). .....	31
Figura 9 Representación esquemática de la adhesión de fibronectina, vitronectina y proteínas con las cargas de los NTs de TiO <sub>2</sub> (51).....	33
Figura 10 Cortes histológicos transversales de arteria femoral superficial (izquierda), en parafina (centro) y en portaobjetos con tinción de hematoxilina y eosina (H&E) (derecha).	51
Figura 11 Imágenes tomadas de arteria femoral superficial con ruptura de la placa de ateroma (tinción de H&E) a diferentes magnificaciones. Se observa esclerosis calcificada medial de Mönckeberg (flechas negras), trombo (T), capa elástica interna (flecha azul).....	51
Figura 12 Cortes histológicos transversales de vena femoral superficial (izquierda), en parafina (centro) y en portaobjetos con tinción de hematoxilina y eosina (H&E) (derecha).	52
Figura 13. Imágenes tomadas de vena femoral superficial de paciente con aterosclerosis que demuestran una túnica media menos desarrollada que en la arteria.....	52
Figura 14 Fotografía de los segmentos de arteria (superior derecha), mostrando la placa y vena (inferior izquierda) femoral superficial de paciente con AS.....	54
Figura 15 Micrografía de contraste de fases de cultivo primario de células endoteliales aisladas de arteria de paciente con AS. A. 4 días de cultivo, B. 19 días de cultivo. Barra de escala: 100µm. ....	54

Figura 16 Micrografías SEM de endotelio de vena sobre superficies de NTs a 4 h de cultivo. Adherencia (A), morfología elongada y depósito de matriz extracelular (A, B, C).....	55
Figura 17 Micrografías SEM de endotelio de vena sobre superficies de NTs a 4 h de cultivo que muestran filopodias a diferentes magnificaciones (A y B).....	56
Figura 18 Micrografías SEM (imagen con electrones secundarios) de endotelio de vena sobre superficies de Ti6Al4V sin anodizar (A y B) y con NTs (C y D) a 24 h de cultivo. ...	56
Figura 19 Micrografías SEM de CE de vena cultivadas sobre superficies control de Ti6Al4V (A y B) y con NTs (C y D) que muestran la presencia de filopodias.....	57
Figura 20 Microfotografías SEM de endotelio de vena a 3 días de cultivo sobre superficies lisas de Ti6Al4V (A, B y C) y anodizadas de TiO2 (D, E y F).....	58
Figura 21 Micrografías SEM de CE de vena a 3 días de cultivo sobre superficies control de Ti6Al4V (A y B) y sobre superficies con NTs (C y D) que muestran la presencia de filopodias. ....	59
Figura 22 Expresión de factor von Willebrand (verde) dentro de los cuerpos de Weiblen-Palade en citoplasma de CE venosas aisladas de paciente con aterosclerosis, por inmunofluorescencia. Núcleo (N).....	60
Figura 23 Distribución y expresión de vinculina y faloidina en CE de vena de paciente con aterosclerosis sobre superficies Ti6Al4V sin anodizar, A. El recuadro señala la magnificación en la imagen B, la flecha señala fibras de estrés. (azul:DAPI, rojo: Vinculina, verde: Faloidina). ....	61
Figura 24 Distribución y expresión de vinculina y faloidina en CE de vena de paciente con aterosclerosis sobre superficies con NTs, A. El recuadro señala la magnificación en la imagen B, la flecha señala fibras de estrés. (azul:DAPI, rojo: Vinculina, verde: Faloidina).....	61
Figura 25 Viabilidad celular de células endoteliales de arteria (CEA) y vena (CEV) cultivadas en poliestireno a 24 h. (***) valor p = 0.0006, estadísticamente significativo). ....	63
Figura 26. Viabilidad de células endoteliales de arteria cultivadas sobre Ti6Al4V y NTs a 72 h (valor p no significativo). ....	63
Figura 27 La proliferación celular fue evaluada por ensayo MTT. Los resultados fueron analizados con análisis de varianza de dos vías y comparaciones múltiples con Bonferroni (ns=valor p no significativo).....	64

Figura 28 Micrografías de inmunofluorescencia con MitoTracker que tiñe las mitocondrias en CE de vena vivas (rojo), se muestran los núcleos en azul (DAPI). Corresponden a imágenes panorámicas de superficies control en A y la magnificación del recuadro en B, de las superficies de NTs en C y D la magnificación del recuadro. ....	65
Figura 29 Intensidad de fluorescencia de Mito Tracker de CEV cultivadas sobre superficies sin anodizar y con NTs a 24h, Fluorescencia celular total corregida (CTCF) de CE individuales cuantificadas con el software ImageJ. Las CE crecen sobre ambas superficies, pero en mayor cantidad sobre los NTs. Resultados representados con medias $\pm$ SD (n=20, p< <b>0.05</b> control vs NTs).....	65
Figura 30 Resultados ensayo MTT de macrófagos RAW 264.7 cultivadas sobre superficies Los resultados fueron no significativos (ns) para un valor p < <b>0.05</b> .....	81
Figura 31. Micrografías SEM de macrófagos RAW 264.7 cultivados a 4 h sobre superficies anodizadas de TiO <sub>2</sub> esterilizadas con tres métodos distintos: a) Autoclave, b) Rayos UV, c) Etanol al 70%.....	82
Figura 32 Micrografías SEM de macrófagos RAW 264.7 cultivadas a 4 h sobre superficies de NTs esterilizadas con tres métodos de esterilización distintos, que muestran filipodias de maginificación ascendente de arriba hacia abajo.....	83
Figura 33 Micrografías SEM de macrófagos RAW 264.7 cultivados a 24 h sobre superficies de NTs esterilizadas con tres métodos distintos: a) Autoclave, b) Rayos UV, c) Etanol al 70%.....	84
Figura 34 Micrografías SEM de macrófagos RAW 264.7 cultivadas a 24 h sobre superficies de NTs esterilizadas con tres métodos de esterilización distintos, que muestran filipodias de maginificación ascendente de arriba hacia abajo.....	84
Figura 35 Microfotografías SEM de macrófagos RAW 264.7 cultivados a 4 días sobre superficies anodizadas de TiO <sub>2</sub> esterilizadas con tres métodos distintos: a) Autoclave, b) Rayos UV, c) Etanol al 70%. ....	85
Figura 36 Microfotografías SEM de macrófagos RAW 264.7 cultivadas a 4 días, sobre superficies de NTs esterilizadas con tres métodos de esterilización distintos, que muestran filipodias de maginificación ascendente de arriba hacia abajo.....	86
Figura 37 Imágenes de inmunofluorescencia de citoesqueleto de actina (verde) de macrófagos sobre superficies control de Ti6Al4V a 24 h de cultivo (A) la magnificación	

del recuadro (B), sobre superficies de NTs esterilizadas con autoclave (C) y la magnificación del recuadro (D). Sobre NTs esterilizados con rayos UV (E) y la magnificación del recuadro (F). Sobre NTs esterilizados con etanol (G) y la magnificación del recuadro (H). Núcleos (azul). Lamelipodias (flechas rojas) y filopodias (flechas blancas). ..... 88

Figura 38 Electroforesis en gel de agarosa de RNA de macrófagos RAW 264.7 sobre superficies esterilizadas cultivados a 3 días. PM=marcador de peso molecular, AC= autoclave control, ANT= Autoclave NTs, EC= Etanol control, ENT= Etanol NTs, UVC= UV control, UVNT= UV NTs. Las flechas señalan las bandas que corresponde a las subunidades 28S y 18S de RNA ribosomal..... 90

Figura 39 . Electroforesis en gel de agarosa de RNA de macrófagos RAW 264.7 sobre superficies esterilizadas cultivados a 6 días. PM=marcador de peso molecular, AC= autoclave control, ANT= Autoclave NTs, EC= Etanol control, ENT= Etanol NTs, UVC= UV control, UVNT= UV NTs. Las flechas señalan las bandas que corresponde a las subunidades 28S y 18S de RNA ribosomal..... 91

Figura 40 Electroforesis en gel de agarosa de RNA de macrófagos RAW 264.7 sobre superficies esterilizadas cultivados a 6 días. PM=marcador de peso molecular, AC= autoclave control, ANT= Autoclave NTs, EC= Etanol control, ENT= Etanol NTs, UVC= UV control, UVNT= UV NTs. Las flechas señalan las bandas que corresponde a las subunidades 28S y 18S de RNA ribosomal..... 92

Figura 41. Gráfica y tabla de resultados de RT-PCR cuantitativa del control positivo de macrófagos RAW 264.7 fenotipo M1. .... 93

## RESUMEN

**Introducción:** La aterosclerosis (AS) afecta la función del endotelio. Por lo tanto, es necesario estudiar células endoteliales (CE) procedentes de pacientes con AS en superficies nanoestructuradas. Los macrófagos presentan fenotipos proinflamatorio (M1) y antiinflamatorio (M2), la predominancia de uno de ellos puede promover el rechazo o la reparación tisular de la endoprótesis vascular, respectivamente. El método de esterilización del biomaterial puede promover alguno de éstos fenotipos.

**Metodología:** Se aislaron CE procedentes de arteria y vena femoral superficial de pacientes con AS y se evaluó *in vitro* la viabilidad, adherencia, proliferación, y cambios en el citoesqueleto, sobre superficies nanotubos de TiO<sub>2</sub> (NTs), mediante ensayos MTT, mitoTracker, SEM e inmunofluorescencia. Se estudió la influencia del método de esterilización de superficies de NTs sobre la polarización de los macrófagos murinos RAW 264.7 hacia los fenotipos M1 y/o M2 mediante SEM, inmunofluorescencia del citoesqueleto y análisis de expresión por RT-PCR cuantitativa.

**Resultados:** Las CE mostraron mayor adherencia, expresión de uniones intercelulares focales, desarrollo de filopodias, y gran depósito de matriz extracelular sobre superficies de NTs. La viabilidad no mostró diferencias estadísticamente significativas a diferentes periodos de cultivo sobre ambas superficies por ensayo MTT. Sin embargo, se observó mayor viabilidad mitocondrial sobre superficies de nanotubos (valor p de 0.0016). Los macrófagos presentaron menor proliferación celular sobre superficies esterilizadas con autoclave, que en superficies esterilizadas con rayos UV y etanol al 70%. Se observó morfología compatible con M1 sobre superficies tratadas con autoclave, morfologías compatibles con M1 y M2 en las tratadas con UV y compatibles con M1 en las tratadas con etanol. La viabilidad por ensayo MTT fue similar con los tres métodos de esterilización.

**Conclusiones:** Las CE aisladas de pacientes con AS tienden a formar una monocapa sobre superficies de NTs a corto plazo. El método de esterilización de superficies de NTs que favorece una mejor reparación es el de rayos UV, al promover el desarrollo de los fenotipos M1 y M2. No se recomienda el uso de autoclave porque promueve el fenotipo M1.

## ABSTRACT

**Introduction:** Atherosclerosis (AS) affects the endothelium's function. Therefore, the study of endothelial cells on nanostructures, from patients with AS becomes relevant. Macrophages can be M1 (proinflammatory) and M2 (anti-inflammatory). The predominant phenotype will determine the rejection, or tissue repair of the vascular endoprosthesis. The biomaterial sterilization can promote one of these phenotypes.

**Methodology:** Endothelial cells from patients' superficial femoral vein and artery with AS were isolated and the in vitro viability was evaluated, as well as its viability, adherence, proliferation, and cytoskeletal changes over surfaces with nanotubes made of TiO<sub>2</sub> (NTs), via MTT essays, mitoTracker, SEM and immunofluorescence. The sterilization method and its influence over the transformation of murine RAW 264.7 macrophages towards M1 and/or M2 phenotypes through SEM, cytoskeleton immunofluorescence and expression analysis was made through quantitative RT-PCR.

**Results:** The endothelial cells showed greater adherence, focal intracellular unions, filopodia development and mitochondrial viability over nanotubes surfaces (p value of 0.0016). The macrophage presented less cellular proliferation over sterilized surfaces with autoclave than in surfaces sterilized with UV rays and ethanol 70%. Compatible morphology of M1 and M2 treated with UV and ethanol was observed. The viability shown by MTT assay was similar with the three sterilization methods.

**Conclusion:** The endothelial cells of patients with AS form a monolayer over NTs surfaces in a short time length. UV rays offer a better tissue repair, in comparison to autoclave and ethanol, since it promotes M1 and M2 phenotypes. Autoclave is not recommended because it promotes an M1 phenotype.

# CAPÍTULO 1

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares por aterosclerosis son una de las principales causas de muerte a nivel mundial (1), caracterizándose por la formación de una placa en la capa más interna de las arterias, constituida por las células endoteliales (CE). Esta placa causa estrechamiento de los vasos y puede ocasionar bloqueo de la luz del vaso, interrumpiendo la irrigación sanguínea de los tejidos. Con el objetivo de mejorar la llegada de oxígeno y nutrientes a través de la sangre se colocan endoprótesis vasculares, sin embargo, éstos se asocian a complicaciones que pueden ser neoaterosclerosis, trombosis y reestenosis que pueden repetir la isquemia o infarto de la zona del cuerpo afectada y llevar a la muerte o pérdida de la función del tejido. Por este motivo, desde que se comenzaron a colocar las endoprótesis los biomateriales utilizados en su fabricación han ido cambiando con el objetivo de mejorar el paso crítico para la reperfusión de la luz del vaso, el cual es la reendotelización. Por lo tanto, el biomaterial debe promover la proliferación selectiva de las células endoteliales, proceso conocido como angiogénesis (2).

Los biomateriales utilizados en las endoprótesis varían en composición y topografía de superficie, la cual contribuye y regula la adherencia celular. Debido a las propiedades mecánicas con las que cuenta el titanio, este se utiliza ampliamente en medicina, dentro de las áreas de odontología, ortopedia y cardiovascular. Cuando el Ti se modifica con nanoestructuras como los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  (NTs) se mejoran sus propiedades de superficie, estas características de superficie a escala nanométrica estimulan y controlan varios eventos moleculares y celulares en la interface tejido/implante, las cuales pueden ser observadas por diferencias en la morfología celular, orientación, organización del citoesqueleto, proliferación y expresión genética (3).

Además, de la diversidad de los biomateriales también se han utilizado un gran número de CE para realizar experimentos *in vitro*, éstas generalmente proceden de vena umbilical humana (HUVEC), de aorta bovina, de células endoteliales coronarias, que comparten la característica de estar sanas (4, 5). Sin embargo, existen pocos estudios en la

literatura que utilicen como modelo de estudio de angiogénesis a células endoteliales procedentes de pacientes con aterosclerosis, por lo que es importante recordar que la razón por la que se coloca una endoprótesis es principalmente derivado de la aterosclerosis, por lo que es necesario trabajar con modelos celulares *in vitro* que analicen el comportamiento de éstas células procedentes de pacientes enfermos sobre biomateriales nanoestructurados, para comprobar que conservan su capacidad de proliferación y con ello una adecuada reendotelización.

En la fisiopatología de la aterosclerosis existe otro tipo celular, además del endotelio, que contribuye al desarrollo de la placa, los macrófagos. Los macrófagos son células especializadas en la fagocitosis y que forman parte de la respuesta inmune. Se han identificado varios fenotipos de macrófagos dentro de la placa, los M1 o proinflamatorios y los M2 o antiinflamatorios. Se sabe que ambos son importantes en la reparación de tejidos y que debe existir un equilibrio entre ambos subtipos. Los M1 predominan en procesos inflamatorios crónicos y el fenotipo M2 se ha asociado a regresión de la placa (6).

Como ya se ha mencionado, la influencia de pequeños cambios en las superficies de los biomateriales puede impactar en la proliferación y migración de las células, y también la superficie puede ser afectada por el tipo de esterilización, el cual es el paso final del tratamiento de las superficies de materiales de uso médico. Por lo tanto, los NTs son afectados en su composición química al igual que su morfología de superficie en mayor o menor medida según el método de esterilización utilizado (3).

## CAPÍTULO 2

### ANTECEDENTES

#### 2.1 Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (CVD) constituyen la principal causa de muerte en el mundo (7), bajo éste término podemos incluir a la enfermedad arterial coronaria, la enfermedad arterial periférica (EAP) y a las enfermedades cerebrovasculares. La causa principal de estas enfermedades es la AS que consiste en un proceso inflamatorio crónico de la pared arterial. La etapa final de la AS se manifiesta como una lesión de la capa íntima de la pared arterial y acumulación de placas. La subsecuente erosión o ruptura de esta placa aterosclerótica conduce al desarrollo de trombosis o formación de coágulos que obstruyen la luz del vaso sanguíneo (8).

Las manifestaciones clínicas de AS dependen del lecho vascular afectado, si se afectan las arterias coronarias se presenta infarto agudo al miocardio, cardiopatía isquémica o muerte súbita. En el cerebro, provoca un accidente cerebrovascular o ataque isquémico transitorio. En las arterias periféricas, la expresión clínica es la claudicación intermitente o la isquemia aguda de los miembros inferiores. Los factores de riesgo son los mismos para los distintos territorios vasculares (9).

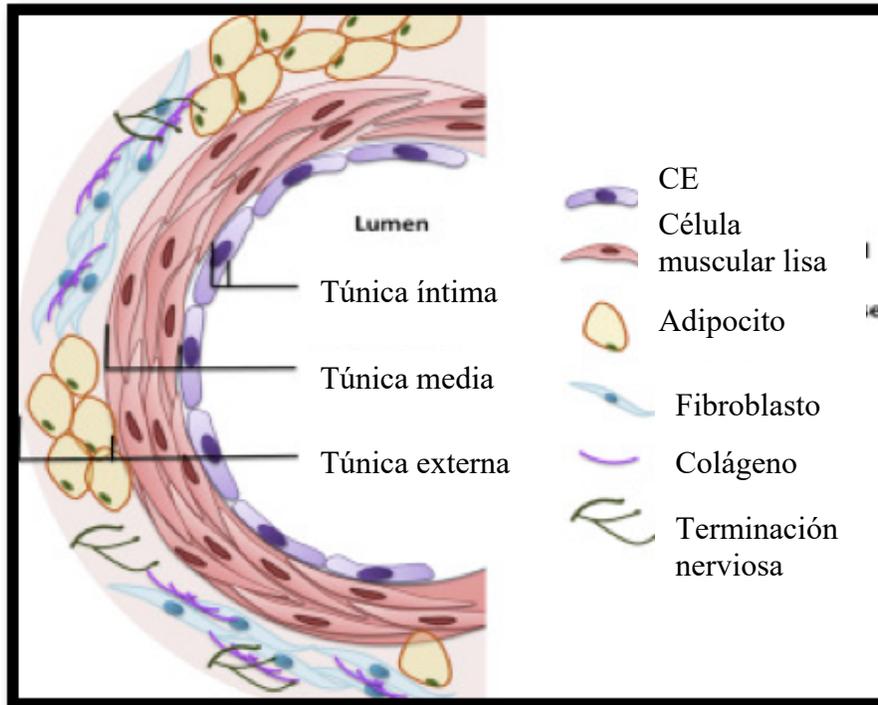
La enfermedad vascular periférica (EVP), afecta a 202 millones de personas en el mundo (10) y representa la segunda manifestación más común de la aterosclerosis a nivel mundial (11). La prevalencia de la EVP incrementa conforme a la edad y en forma general se le define como la obstrucción o estenosis de arterias no miocárdicas, más frecuentemente de las arterias de miembros inferiores pero que incluye las arterias renales y arterias de otros órganos vascularizados. Esta afección resulta en una pérdida gradual de flujo sanguíneo lo cual deriva en la pérdida de oxígeno y nutrientes en los tejidos ocasionando síntomas como claudicación, ulceraciones y cambios en la coloración de la piel del miembro afectado. Esto da origen a isquemia crítica de la extremidad (ICE) que puede conducir a la pérdida de la extremidad si no se da el tratamiento efectivo a tiempo. Uno de los principales factores de riesgo para ICE es la presencia de diabetes mellitus tipo 2. Los síntomas asociados a ICE son

lesiones en piel (úlceras o gangrena) y dolor de reposo, ambos comprometen la calidad de vida del paciente. La ICE se asocia con alta mortalidad y morbilidad (12). Existen estudios que demuestran que el 30% de los pacientes no son elegibles para el tratamiento de revascularización por lo que requieren una amputación mayor y el 25% de estos pacientes mueren dentro del primer año de inicio de la ICE (13).

Dependiendo del grado de estenosis causada por la aterosclerosis existen diferentes grados de severidad de la EVP según la clasificación de Fontaine, los cuales son: grado I correspondiente a EVP asintomática, el II a claudicación intermitente, el grado III a dolor de reposo y grado IV cuando existe isquemia, ulceración o gangrena. Los grados III y IV amenazan la pérdida de la extremidad (14). Actualmente, el tratamiento de la EVP se basa en estrategias que buscan restaurar la perfusión sanguínea de los tejidos isquémicos y con esto aliviar el dolor de reposo, la cicatrización de úlceras y prevenir la pérdida de la extremidad. Para la enfermedad macrovascular localizada el tratamiento puede ser angioplastia, aterectomía, endoprótesis vascular o stent y cirugía de bypass (12).

## 2.2 Vasos sanguíneos.

Los vasos sanguíneos están compuestos de tres capas: la íntima, que consiste en una monocapa de CE unidas a una membrana basal, las CE y la membrana basal en conjunto constituyen el endotelio; una capa medial, de células musculares lisas y la adventicia o túnica externa (Figura 1). El endotelio cubre todo el árbol vascular, desde el corazón hasta los capilares más pequeños formando la superficie interna de todos los vasos sanguíneos, y funciona como una barrera entre la sangre de la luz vascular y los tejidos circundantes. La capa medial muscular lisa regula la constricción y dilatación de los vasos sanguíneos. La adventicia contiene terminaciones nerviosas, tejido adiposo perivascular y elementos del tejido conectivo (fibroblastos y fibras de colágeno) que aseguran su adherencia a los órganos circundantes (15).



*Figura 1 Estructura general de la pared vascular (15)*

Los vasos sanguíneos están organizados de acuerdo al siguiente orden: corazón, arterias, arteriolas, capilares, vénulas, venas y corazón, y sus funciones principales son transportar oxígeno, nutrientes y células inmunes a todos los tejidos del cuerpo (16).

El endotelio es un órgano activo, endócrino que regula su ambiente y responde a estímulos externos (17). La heterogenicidad endotelial está determinada durante el desarrollo embrionario y en la etapa adulta por señales bioquímicas y factores biomecánicos específicos de cada órgano o tejido (18).

Las paredes de los vasos pueden ser morfológicamente diversas, el endotelio de arteria y vena es una monocapa continua, en cambio el de los capilares puede ser continuo, fenestrado o discontinuo (Figura 2). El endotelio fenestrado se localiza en tejidos involucrados en la filtración y secreción, localizados en glándulas, glomérulo renal y mucosa intestinal; el endotelio discontinuo es característico de los lechos vasculares sinusoidales, localizados en hígado y médula ósea. Las CE están envueltas por una membrana basal. Los vasos también difieren en su pared, las arterias presentan una capa más gruesa de células lisas musculares lisas, ya que su función es mantener el tono vascular, mientras que las venas poseen una capa muscular lisa delgada y se caracterizan por permitir la migración

transendotelial de los leucocitos durante la inflamación (leucoféresis). Además, las venas poseen válvulas para facilitar el retorno de la sangre al corazón (Figura 2) (19).

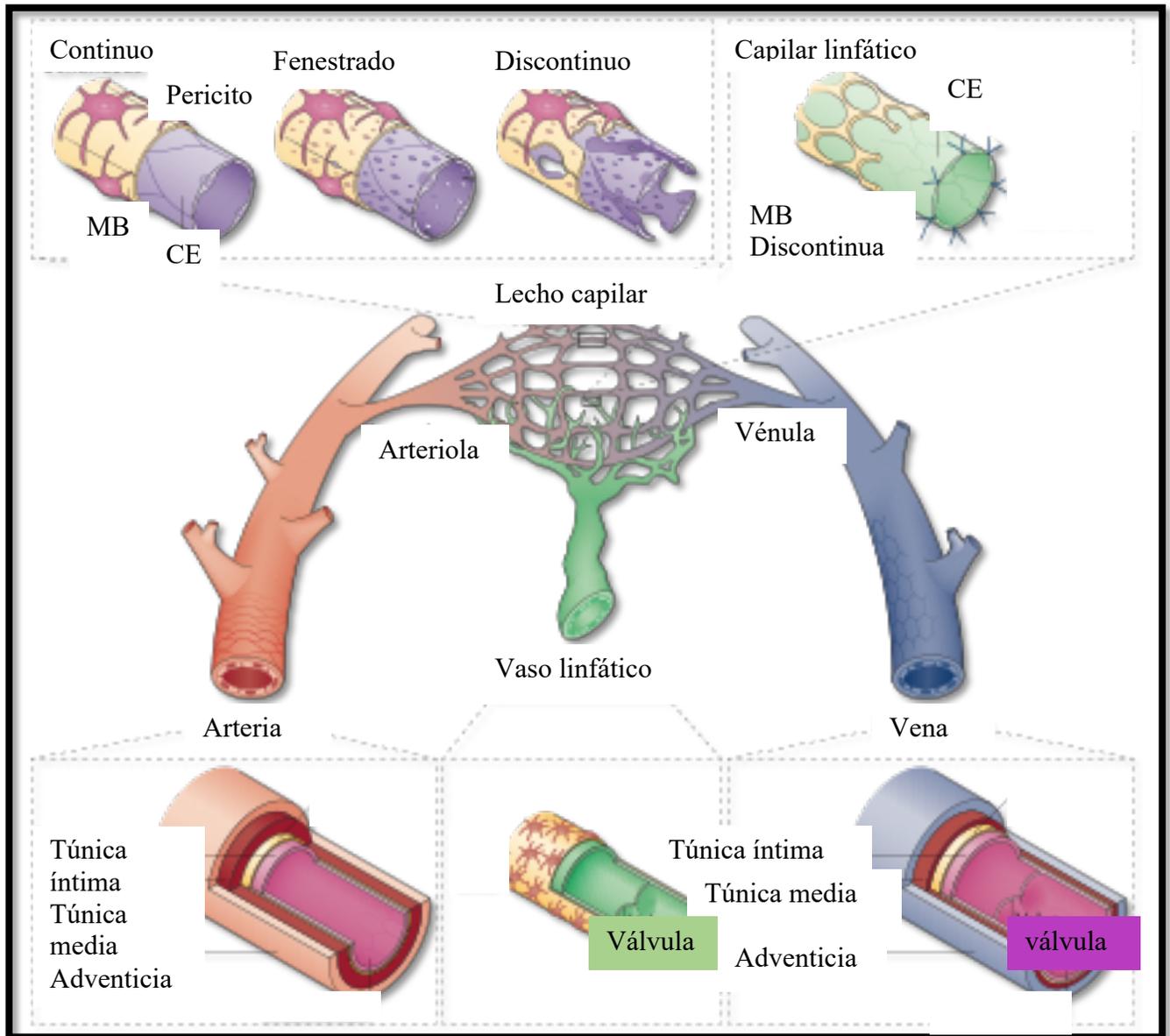


Figura 2 Organización de la vasculatura. La vasculatura se organiza en arterias (rojo) y venas (azul) interconectadas por capilares, así como por capilares linfáticos que terminan con puntas ciegas y vasos colectores (verde) que drenan fluidos hacia la circulación venosa. Las arteriolas, capilares y vénulas forman parte de la microvasculatura, y es el sitio donde existe mayor cantidad de uniones intercelulares. La anatomía de los vasos capilares se muestra en la parte superior de la imagen y la anatomía de los grandes vasos en la parte inferior (19). (MB= membrana basal).

También existen diferencias funcionales entre las arterias y las venas. Las arterias específicamente llevan sangre desde el corazón hacia la periferia y las venas conducen la

sangre desde la periferia hacia el corazón. Generalmente, las arterias llevan sangre oxigenada y las venas con baja tensión de oxígeno (20).

### 2.3 Células endoteliales y macrófagos.

Las CE son delgadas y ligeramente elongadas, presentan gran heterogenicidad en el árbol vascular, ya que sus características son diferentes según el vaso u órgano del que formen parte. Las CE arteriales son largas y delgadas o elípticas, las venosas son cortas y anchas, esta diferencia se debe a que soportan estrés cortante (shear stress) de 1-5 dinas/cm<sup>2</sup> en el caso de las venas y de 10 a 40 dinas/cm<sup>2</sup> para las arterias (20). Otra característica importante de las CE son las uniones intercelulares que median la adhesión y comunicación intercelular. Las dos principales uniones son las estrechas o también llamadas zonas ocludentes, y las uniones adherentes. Un tercer tipo son las uniones gap, que son estructuras tipo canal, compuestas por proteínas llamadas conexinas. Las uniones intercelulares en las CE de arteria son más estrechas que las de CE venosas (20).

En cultivos *in vitro* la monocapa de CE adquiere un patrón que asemeja un piso de adoquín. Las dimensiones de la célula son 30 a 50  $\mu m$  de largo, 10 a 30  $\mu m$  de ancho y tienen un espesor de 0.1 a 10  $\mu m$ . En la Figura 3, se puede observar una monocapa de CE venosas humanas teñidos por inmunofluorescencia que muestran en azul los núcleos, en rojo el factor von Willebrand (vWF) y en verde vinculina (17).

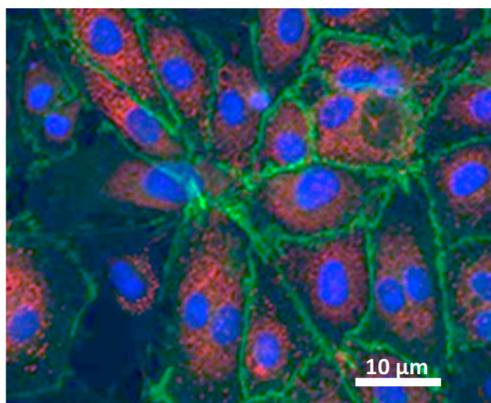


Figura 3 Inmunofluorescencia monocapa de CE venosas humanas. Núcleos en azul, vWF en rojo y vinculina en verde (17)

La vinculina es una proteína del citoesqueleto de membrana en placas de adhesión focal que están involucradas en las uniones célula-célula y célula-matriz extracelular, funcionando como conectores de moléculas de adhesión integrina al citoesqueleto de actina. Su participación activa en la respuesta inmune no se limita al simple transporte de las células inmunes, ellas no fagocitan y no producen anticuerpos. Sin embargo, las células endoteliales coordinan la respuesta inmune (16).

Las funciones principales del endotelio son la hemostasia, mantener el tono vascular, coordinar la respuesta inmune, y la angiogénesis:

1. Hemostasia. Para mantener su función de barrera y prevenir la entrada de patógenos y evitar su diseminación sistémica, sus uniones deben mantenerse apretadas y ser rápidamente reparadas después de la ruptura de un vaso. Esto se logra en conjunto con las plaquetas y activando la coagulación, sin embargo, este proceso debe estar regulado, ya que en su estado basal el endotelio es anticoagulante, solo se activa la coagulación cuando existe daño de la pared vascular. La agregación plaquetaria es a través de moléculas procoagulantes, principalmente el factor von Willebrand (vWF), las plaquetas poseen un receptor para el vWF (16).
2. Tono vascular. En condiciones de homeostasis, el tono vascular se regula a través del equilibrio de señales de vasoconstricción y vasodilatación para adaptar la presión sanguínea y el flujo de acuerdo a los requerimientos. Las CE controlan el tono vascular enviando señales parácrinas a las células musculares lisas de la pared vascular mencionadas en el apartado de vasos sanguíneos, de tal manera que cierran o constriñen la luz del vaso o la dilatan. La principal vasoconstrictor es la endotelina, peptido producido por las CE, la cual se libera en respuesta a señales proinflamatorias. El principal vasodilatador es el óxido nítrico (NO), producido por la óxido nítrico sintasa (NOS) a partir del aminoácido L-arginina. Existen tres isoformas de la NOS, nNOS (neuronal), eNOS (endotelial) e iNOS (inducible por citocinas) (16). En condiciones normales, la eNOS mantiene el tono vascular y el flujo sanguíneo. Cuando el endotelio es disfuncional no se produce NO, esto se asocia al desarrollo de aterosclerosis y enfermedades cardiovasculares (21). La misma eNOS genera especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) generando estrés

oxidativo, el cual a largo plazo genera un estado pro-inflamatorio crónico que contribuye a la formación de la placa aterosclerótica (16).

3. Respuesta inmune. Las CE expresan receptores de la respuesta inmune innata, incluyendo la familia de receptores toll-like (TLR), que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos, cuando son estimulados desencadenan una respuesta proinflamatoria. Las CE median cambios estructurales en sus moléculas de adhesión para incrementar la permeabilidad vascular, producir citokinas inflamatorias, presentación de moléculas de adhesión para reclutar leucocitos y promueven un estado procoagulante (22).

Una de las funciones principales de las CE en la respuesta inflamatoria es la leucoféresis o transición coordinada y organizada de leucocitos a través de la pared vascular hacia el tejido dañado o infectado. Para ello las CE expresan moléculas de adhesión, principalmente las selectinas (tipos L, P y E), las cuales facilitan la migración transendotelial de los leucocitos durante la inflamación (16).

Angiogénesis. La angiogénesis se define como la formación de vasos sanguíneos a partir de vasos preexistentes, se produce en diversas situaciones: en etapa embrionaria, durante el crecimiento y desarrollo, en reparación de tejidos y restauración de metabolitos y oxígeno en tejidos isquémicos o inflamados. La angiogénesis es un proceso secuencial de vasodilatación, degradación de membrana basal, migración de CE, quimiotaxis, incremento de la permeabilidad vascular, proliferación de CE y formación del vaso (17). La angiogénesis está estrechamente relacionada con la membrana basal y la matriz extracelular (MEC). Primero las CE adoptan un fenotipo proteolítico, secretan metaloproteasas de matriz que destruye la membrana basal, de esta forma las CE pierden contacto con la laminina de la membrana basal y quedan expuestas al colágeno intersticial, que induce reorganización del citoesqueleto para iniciar la morfogénesis de un brote (17).

Las CE deben ser activadas, iniciando la migración de una capa sencilla de CE hacia un gradiente de VEGF-A, el cual se produce bajo condiciones de hipoxia (23). Los

nuevos vasos son formados a partir de brotes que se forman en células punta o tip, la cual es migratoria e invasiva, desarrolla múltiples filopodias que expresan receptores VEGFR-2 para VEGF-A que sensan el gradiente de VEGF. Las CE activadas VEGF-A/VEGFR-2 expresan el ligando-Notch DLL4, el cual previene el exceso de angiogénesis (24). Las células punta son seguidas por las células tallo o stalk (Figura 4). Éstas son altamente proliferativas, su función es formar el vaso y su lumen. Cuando un brote encuentra a otro se anastomosan y la sangre puede comenzar a fluir en los nuevos vasos (25). Posteriormente las CE desarrollan un fenotipo no migratorio y quiescente (17). Los macrófagos también estimulan y mantienen la angiogénesis a través de la producción de IL-19 y de VEGF por los monocitos (25).

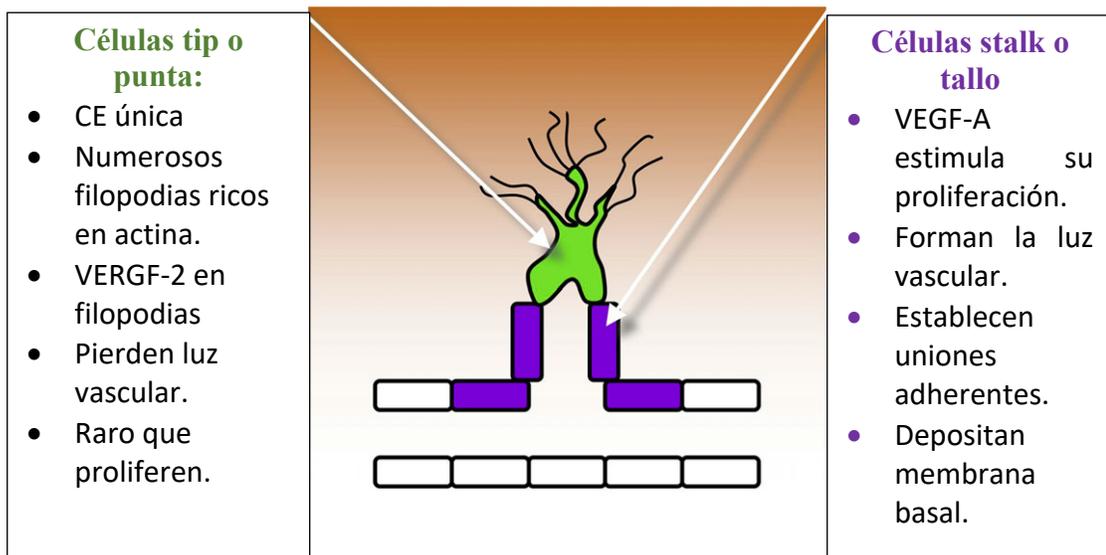


Figura 4 Diferencias fenotípicas entre células tip y stalk. La cabeza de las células punta o tip (verde) extienden filopodias hacia el gradiente VEGF-A (naranja) y células tallo o stalk (moradas) forman el vaso y el lumen (24).

Las interacciones célula-célula y célula-matriz determinan el estado de la actividad endotelial, lo cual apoya una de sus funciones: la de mantener la integridad de la monocapa. Bajo condiciones normales la inhibición por contacto de la monocapa íntegra previene la proliferación de las células endoteliales. Además, la membrana basal forma una barrera física que separa el endotelio del espacio extravascular. Cuando la interacción célula-célula normal es removida, por ejemplo, por descamación, inicia la replicación de las células endoteliales (26).

Los macrófagos son células que residen en casi todos los tejidos del cuerpo, y como resultado de su adaptación a los diferentes microambientes celulares, adoptan diferentes morfologías y llevan a cabo diferentes funciones. A pesar de su heterogenicidad, todas provienen de células madre hematopoiéticas pluripotenciales, que se diferencian a células fagocíticas mononucleares. El factor estimulante de colonias tipo 1 (CSF-1) es el factor de crecimiento primario que regula la supervivencia, proliferación y diferenciación de las células fagocíticas mononucleares (27). Los macrófagos son células móviles que juegan una gran variedad de papeles en la vigilancia inmunológica y en el desarrollo normal de los tejidos debido a que secretan una gran diversidad de citoquinas y factores de crecimiento, además fagocitan material extraño y células apoptóticas. La movilidad intersticial y transendotelial es indispensable para su función debido a que se tienen que movilizar a sitios específicos que los demanden (27).

Tradicionalmente a los macrófagos se les clasifica en macrófagos con fenotipo M1 o proinflamatorio y fenotipo M2 o antiinflamatorio (28). Los macrófagos M1 son típicamente polarizados por citoquinas Th1, tales como interferón ( $\text{INF-}\gamma$ ), factor de necrosis tumoral (TNF) y complejos moleculares asociados a patógenos incluyendo los lipopolisacáridos y lipoproteínas. Los macrófagos M1 producen altos niveles de citoquinas proinflamatorias, tales como, IL-1, IL-6, IL-12, IL-23 y TNF. La activación crónica de los M1 puede inducir el sistema NADPH oxidasa y promover la generación de ROS y NO, provocando daño crónico tisular e impidiendo la reparación. En este punto son necesarios los macrófagos M2 para contrarrestar la respuesta inflamatoria y modular la inflamación, acelerando la angiogénesis y fibrosis, promoviendo la reparación tisular (29). Los macrófagos M2 son inducidos en respuesta a citocinas Th2, incluyendo IL-4, IL-13 e IL-33 (29).

#### 2.4 Caracterización molecular de células endoteliales.

Las CE poseen en su superficie marcadores moleculares específicos como la cadherina endotelial vascular (CD144), el factor von Willebrand (vWF), molécula de adhesión plaquetaria de CE (CD31) y los receptores de factores de crecimiento endotelial vascular (VEFG-R). El CD144 es una molécula de adhesión específica de las CE, localizada en las

uniones intercelulares, es esencial para mantener la integridad de la capa celular y angiogénesis por ser parte constitucional de las uniones adherentes e interactuar intracelularmente con el citoesqueleto y con proteínas de señalización. El CD31 está ampliamente expresado en CE, es miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas, es una glucoproteína transmembranal de 130 kDa, también llamada PECAM-1 (molécula de adhesión celular plaquetaria-1), se encuentra también en la superficie de plaquetas, monocitos, macrófagos y neutrófilos. En CE es un constituyente de las uniones intercelulares, regula la permeabilidad paracelular y la angiogénesis (4).

El vWF es una proteína multimérica que juega un papel importante en la hemostasia y trombosis. Es una proteína mediadora de la adhesión plaquetaria al subendotelio en sitios de lesión vascular, también une y estabiliza al factor VIII en la circulación. Se almacena en los cuerpos intracitoplásmicos de Weiblen-Palade. El vWF es utilizado como un marcador inmunohistoquímico de CE encontrándolo expresado fuertemente en venas, y en orden decreciente en arterias, arteriolas, capilares y vénulas (30). Además del vWF producido por las CE, también las plaquetas lo producen, el 85% del vWF presente en plasma deriva de las CE y el 15% restante de las plaquetas (31). En los cultivos celulares las CE la expresión de vWF y CD31 se caracterizan por su habilidad de formar tubos (30).

Los VEGFs son glucoproteínas heterodiméricas secretadas de 40 kDa que promueven la angiogénesis (32). Las VEGFs son una familia de 5 miembros: VEGF-A hasta D y el factor de crecimiento placentario (PlGF). Existen tres distintos receptores transmembranales de VEGF con actividad tirosin quinasa en sus regiones citoplásmicas. La unión de VEGF al receptor promueve su dimerización y actividad quinasa desencadenando una cascada de señalización que influye en las funciones de las células endoteliales. VEGFR1 se encuentra expresado en monocitos y macrófagos y se relaciona con la quimiotaxis y la regulación de VEGFR2. VEGFR3 se localiza en células endoteliales linfáticas. El receptor VEGFR2 (también llamado KDR o Flk-1) se encuentra preferentemente en células endoteliales vasculares y se encarga de la señalización de angiogénesis en respuesta al VEGF-A, por medio de proteínas G que activan a las proteínas Rho y Rap que estimulan la proliferación y la migración. La activación de RhoA contribuye a la hiperpermeabilidad endotelial inducida

por VEGF. Por otro lado la proteína Rap1 amplifica los efectos del receptor VEGFR2 promoviendo su activación por medio de la molécula integrina  $\alpha v\beta 3$ , que es requerida para la angiogénesis inducida por VEGF (33).

Los macrófagos M2 comprenden varios subtipos: M2a, M2b y M2c. Los M2a y M2b poseen funciones reguladoras inmunes porque estimulan la actividad anti-inflamatoria de los linfocitos Th2 y son inducidos por las IL-4 e IL-13. Mientras que los M2c son inducidos por la IL-10, su función principal es la remodelación tisular y la supresión de la reacción inmune inflamatoria a través de la secreción del factor de crecimiento transformante beta ( $TGF-\beta$ ) y de IL-10 (34).

## 2.5 Fisiopatología de la aterosclerosis.

La patogénesis de la AS es compleja y sus principales componentes son la acumulación de lípidos y la inflamación crónica de la pared arterial. Los factores de riesgo asociados a la generación de la placa o aterogénesis son: niveles elevados de colesterol, principalmente la lipoproteína de baja densidad o LDL, diabetes mellitus, hipertensión arterial tabaquismo (35).

La disfunción del endotelio provocada por la turbulencia del flujo sanguíneo en zonas de flexión o bifurcación de las arterias, conduce al reclutamiento de células inmunes como los monocitos circulantes que se adhieren a la zona afectada de endotelio arterial, penetran dicha capa y se diferencian en macrófagos que participan activamente en la internalización de las LDL a través de la fagocitosis dando origen a células espumosas que son abundantes y características de la placa aterosclerótica, los macrófagos y el endotelio contribuyen en la producción local de mediadores de la inflamación. Las células del músculo liso de la pared vascular arterial involucradas en este proceso patológico sufren un cambio fenotípico adquiriendo propiedades proliferativas y secretorias, también existe un incremento en el depósito de matriz extracelular en la capa subendotelial de las placas ateroscleróticas por parte de los pericitos vasculares (Fig. 5) (8). En forma adicional, LDL oxidados inducen necrosis en las células espumosas lo cual conduce a la formación de un núcleo o core

necrótico, característica distintiva de inestabilidad de una placa avanzada, esto lleva a ruptura de la placa y consecuentes eventos vasculares que requerirán tratamientos de por vida (36). Las CE de la placa de aterosclerosis presentan el proceso de angiogénesis como resultado de hipoxia dentro de la placa, también la inflamación contribuye al proceso de neovascularización ya que los macrófagos/monocitos, neutrófilos y linfocitos T que secretan VEGF y TNF los cuales estimulan la activación, proliferación y migración de células endoteliales vasculares promoviendo la angiogénesis, indicando que la inflamación está ligada a dicho proceso (37). Existen evidencias de la expresión de VEGF-D en macrófagos, el cual promueve la neovascularización en la placa de ateroma (38). Con se puede concluir que las CE de las placas de ateroma conservan su capacidad angiogénica.

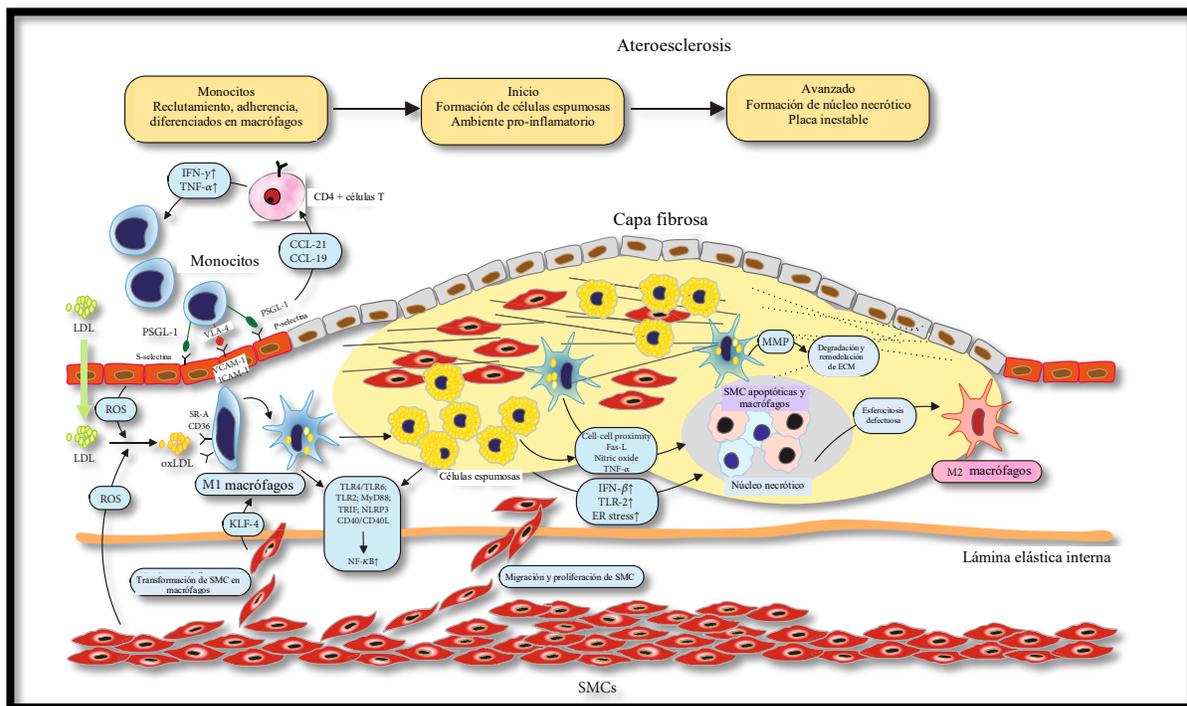


Figura 5 Actuación de los macrófagos en diferentes etapas de progresión de la aterosclerosis. La aterosclerosis es iniciada por el depósito subendotelial de lípidos. Los monocitos circulantes son reclutados en la lesión por adhesión a células endoteliales activadas e ingresan al espacio subendotelial. Dentro de la placa los macrófagos fagocitan los lípidos depositados y se transforman en células espumosas, formando lesiones ateroscleróticas tempranas. Los macrófagos en la lesión inducen una respuesta inflamatoria, promueven mayor depósito de lipoproteínas, alteración de la matriz extracelular, manteniendo un proceso inflamatorio crónico. LDL oxidados (oxLDL) inducen necrosis de las células espumosas, lo que constituye el centro necrótico, que conducen a inestabilidad y ruptura de las placas avanzadas. Abreviaturas: CCL: ligando de quimiocinas; ECM: matriz extracelular; ER: retículo endoplásmico; Fas-L: ligando Fas; ICAM: molécula de adhesión intercelular; IFN: interferón; IL: interleucina; KLF4: Kruppel-like factor 4; MMP: matriz metaloproteinas; NF-κB: factor nuclear de kappa B; NLRP3: leucina-rico repeat pyrin dominio rico en leucina repetido pirina- 3; oxLDL: lipoproteínas de baja densidad oxidadas; PSGL-1: ligando 1 de glucoproteína P-selectina; ROS: especies reactivas de oxígeno; SMC: células de músculo liso; SR-A: receptor tipoA scavenger; TNF: factor de necrosis tumoral; TLR: receptor tipo toll; VCAM: molécula de adhesión celular vascular; VLA-4:antígeno 4 muy tardío (36).

## 2.6 Marcadores de los fenotipos de macrófagos.

Los marcadores utilizados para macrófagos M1 son CD64, CD86. Los marcadores para M2 incluyen CD206 (un receptor de manosa), CD163, el cual está involucrado en la depuración de los complejos hemoglobina-haptoglobulina. Este receptor tipo “scavenger” o carroñero es necesario para eliminar la hemoglobina después de la hemorragia intraplaca. El marcador CD36 es considerado un marcador importante de las células espumosas, las cuales también tienen baja expresión de los marcadores CD206 y CD163 (39).

## 2.7 Endoprótesis vasculares.

Las placas ateroscleróticas pueden reducir la luz de los vasos sanguíneos conduciendo a isquemia y cambios metabólicos en los tejidos irrigados. El desarrollo de trombosis en la placa puede tener consecuencias fatales (40). Con la intención de alterar la historia natural de la AS, se desarrolló la técnica de angioplastia con globo, sin embargo, este procedimiento causa daño endotelial y promueve la reestenosis en semanas o meses después de la intervención, además puede provocar complicaciones agudas como disección arterial. Para combatir estos efectos y reducir la extensión del daño se ha incorporado el uso de endoprótesis vasculares o stents, que proporcionan soporte rígido a la luz arterial (41). La colocación de la endoprótesis modifica la lesión estenótica o estrechamiento y altera la arquitectura arterial, induciendo daño arterial distinto al provocado por la angioplastia (42).

Las endoprótesis vasculares se dividen en endoprótesis metálicos descubiertos (BMS) o de primera generación, y en endoprótesis fármaco-eluyentes (DES). Los BMS permanentes están hechos de acero inoxidable y aleaciones de Cobre-cobalto y se colocan con balón expandible y de aleaciones de Níquel-Titanio (Nitinol) las endoprótesis autoexpandibles (43). Las BMS promueven la proliferación de células vasculares de músculo liso, la acumulación de macrófagos y neovascularización, dando origen a un mayor desarrollo de la placa o reestenosis *in situ* del stent (ISR). La ISR vuelve a precipitar el mismo cuadro clínico en el paciente en un pico máximo de 6 meses posteriores a la colocación del BMS. Por este

motivo se desarrollaron las endoprótesis fármaco-eluyentes (DES) con materiales avanzados y con propiedades antiproliferativas que traten de prevenir las complicaciones vasculares a corto plazo, la hiperplasia neointima y la trombosis (42). Los fármacos utilizados en los DES son la rapamicina (sirolimus) y el paclitaxel, los cuales reprimen la proliferación excesiva de las células vasculares musculares, pero también ocasionan disfunción de las células endoteliales, esto contribuye a la re-endotelización tardía y a trombosis tardía en la endoprótesis (44). Además, el uso de los DES se asocia a una patología conocida como neoaterosclerosis, que es independiente de la aterosclerosis nativa (45). La neoaterosclerosis se caracteriza por una rápida progresión de la placa conduciendo a la formación de un fibroateroma que crece en la superficie luminal, caracterizado por la acumulación de macrófagos y de células espumosas (46). Esta neoaterosclerosis predispone a la ISR y oclusión trombótica crónica por fisura o ruptura de la placa (47).

En varios estudios realizados se ha demostrado el beneficio del uso de endoprótesis vasculares en la arteria femoral superficial (AFS) sobre la angioplastia, sin embargo, la endoprótesis presenta un índice de reestenosis en un año con un rango de 18 a 37%. La ISR es un problema que afecta el seguimiento a mediano y largo plazo de la endoprótesis de la AFS (48).

## 2.8 Modelos y biomateriales para estudio de células endoteliales y macrófagos.

Los implantes vasculares pueden ser con la intención de introducir fármacos o células, para brindar soporte mecánico o reemplazar vasos sanguíneos, entrando en contacto directo con el flujo sanguíneo y el endotelio. Por lo tanto, se hacen distintos modelos de estudio para evaluar la funcionalidad de las CE, se sintetizan en la Figura 6 (4).

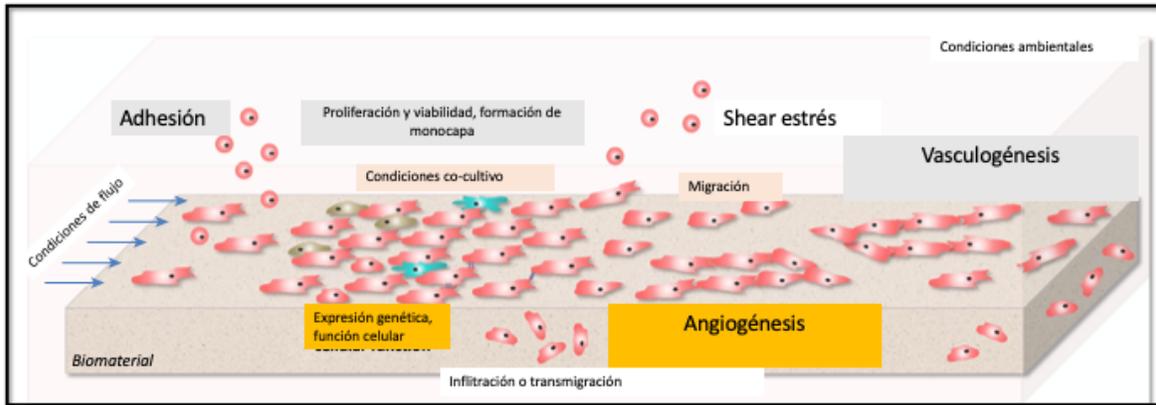


Figura 6 Modelos de estudio comúnmente utilizados para la caracterización de CE en regeneración vascular, de tejidos blandos y óseos (4). Los parámetros marcados en negro se utilizan para caracterización, en azul los que son importantes para regeneración vascular y en verde los que se utilizan para regeneración de tejidos blandos y hueso.

Los principales criterios en la elección del material de la superficie de la endoprótesis vascular es que debe evitar la agregación plaquetaria y debe ser tromborresistente. Para la elección del material de la superficie de la endoprótesis, este debe permitir su integración total y facilitar la endotelización, a través de la migración celular (49). Estudios previos con NTs de  $\text{TiO}_2$  demuestran que los NTs promueve la endotelización e inhibe la proliferación de células de músculo liso y la agregación plaquetaria (50). Estudios realizados por Sprague demuestran que las superficies rugosas aumentan la migración de células endoteliales al doble que las superficies lisas (51). Esto indica que la topografía de la endoprótesis puede regular la endotelización. En un estudio realizado por Brammer, se compararon dos superficies de Titanio, una plana y una superficie nanoestructurada de  $\text{TiO}_2$  con NTs preparados por anodizado, en el que concluyen que los NTs presentaron mayor endotelización y migración celular sobre la endoprótesis (49). En otros estudios de neovascularización sobre implantes dentales *in vitro* sobre NTs de  $\text{TiO}_2$  de 70 nm de diámetro obtenidos por el método de anodizado, se concluye que promueven la actividad endotelial *in vitro*, lo que sugiere que puede mejorar la angiogénesis *in vivo* para hacer más rápido el proceso de osteointegración (5).

El anodizado es un método electroquímico que permite la formación de nanotubos organizados, alineados y ordenados a lo largo de la superficie del metal. Éstos crecen en un medio acuoso con iones fluoruro y electrolitos orgánicos, usualmente se usan dos o tres

electrodos en una celda electroquímica, en donde el Ti o la aleación de Ti es el ánodo, la hoja de platino es el cátodo, y en el caso de tres electrodos, la celda con un electrodo de Ag/AgCl como electrodo de referencia. Se aplica un potencial constante con una fuente de poder, la transición de nanoporos a nanotubos en función del incremento en el periodo de anodización se muestra en la Figura 7 (52).

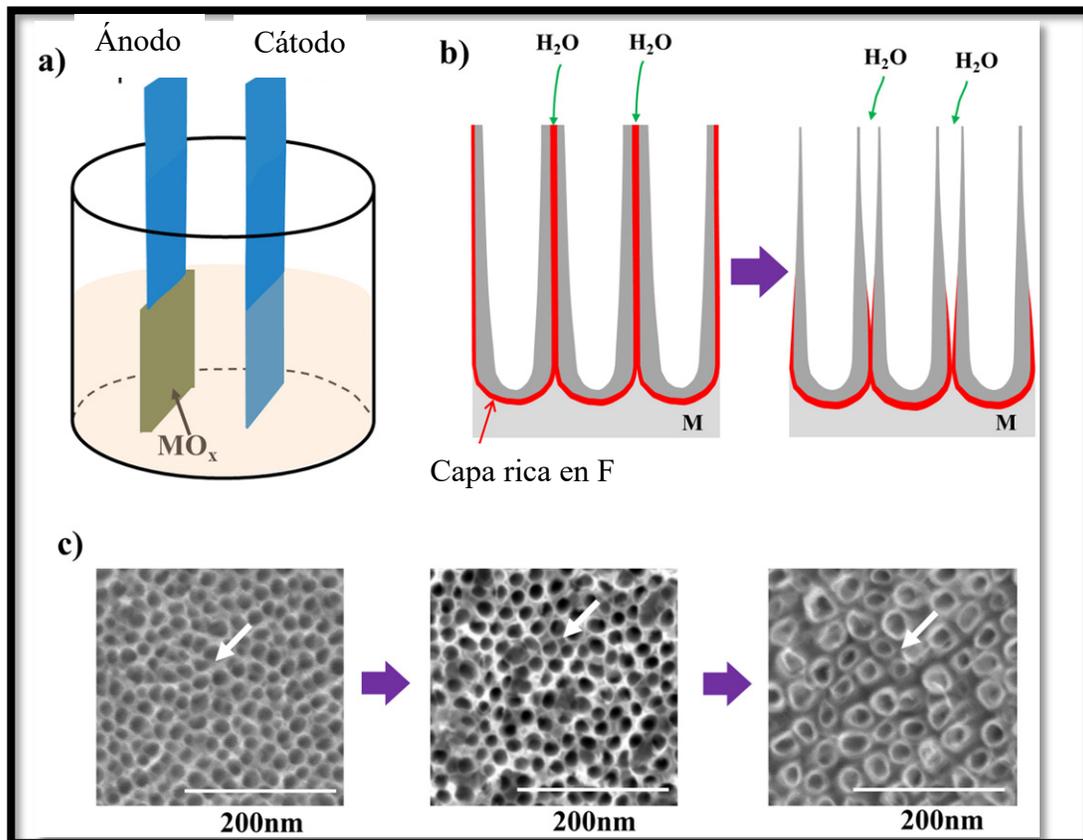


Figura 7 Configuración del anodizado (a), mecanismo de separación de paredes de los poros durante la anodización (b), transición de nanoporos a nanotubos en micrografías SEM (c) (52).

Los materiales nanoestructurados promueven estrategias para mejorar el proceso de angiogénesis. El anodizado incrementa el área de superficie, aumenta la resistencia a la corrosión al igual que la rugosidad, disminuye el ángulo de contacto (aumenta humectabilidad) y mejora la biocompatibilidad comparada a superficies no modificadas. Un estudio realizado con nanoestructuras de NTs de  $TiO_2$  de  $\sim 70$  nm de diámetro, por el método de anodizado en un modelo de endotelio *in vitro*, mostró un incremento en la activación de

factores angiogénicos (Fig. 8), y sus resultados sugieren que el Ti y el O están intrínsecamente involucrados en el proceso de angiogénesis de materiales hechos con  $\text{TiO}_2$  (5).

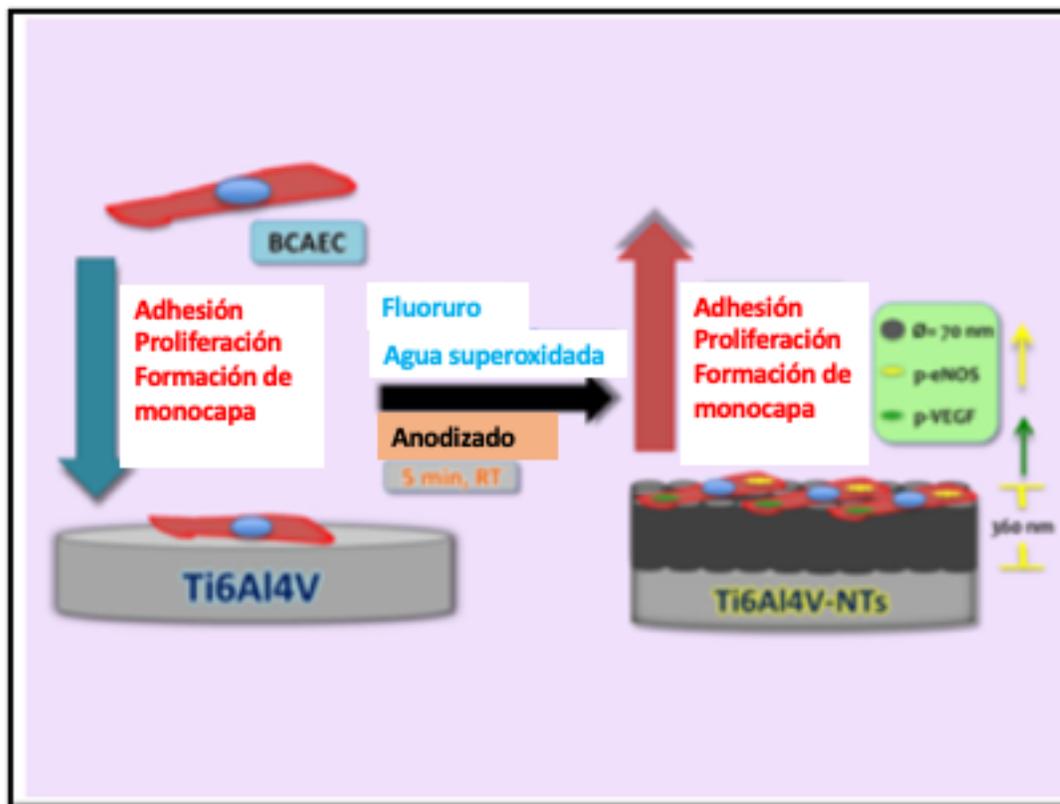


Figura 8 Representación esquemática que ilustra los efectos de los nanotubos (NT) anodizados de  $\text{TiO}_2$  mejorando el proceso angiogénico en términos de formación de una monocapa, viabilidad, proliferación y activación de factores endoteliales comparada con una superficie de óxido de Titanio (Ti6Al4V) no anodizada (5).

Se considera un paso crítico que el biomaterial de la endoprótesis promueva la regeneración del endotelio, ya que la capa de células endoteliales modula la hemostasia local, la trombólisis y la proliferación de células musculares vasculares en respuesta al daño vascular (53). Por lo tanto, una rápida cobertura con células endoteliales de la endoprótesis es requerida para evitar la trombosis y la reestenosis (44).

## 2.9 Interacción célula-nanoestructura.

Se requiere una apropiada respuesta celular hacia la superficie del material implantado para que ocurra una adecuada regeneración tisular e integración. Cuando se implanta una superficie, es inmediatamente recubierta por proteínas procedentes de sangre y de líquido intersticial, dando lugar a la formación de una capa de proteínas por medio de la cual las células perciben la superficie extraña. Las principales proteínas que recubren la superficie de diversos biomateriales, son la fibronectina y vitronectina, ambas proteínas de adhesión extracelular, las cuales ayudan en los procesos de adhesión, morfología y migración celular indispensables para la regeneración tisular (54). Las CE también utilizan estas moléculas de adhesión celular para promover la migración por medio de las moléculas VEGFs. Como se ha mencionado anteriormente VEGF estimula la proliferación selectiva de las CE, es quimiotáctico para monocitos/macrófagos, y es indispensable para el proceso de angiogénesis (55).

Las superficies con NTs presentan una alta densidad de cargas negativas lo que facilita las interacciones electrostáticas con los cationes divalentes de la fibronectina y vitronectina y también la absorción celular mediada por integrinas a dicha estructura de Ti. (figura 9) (52).

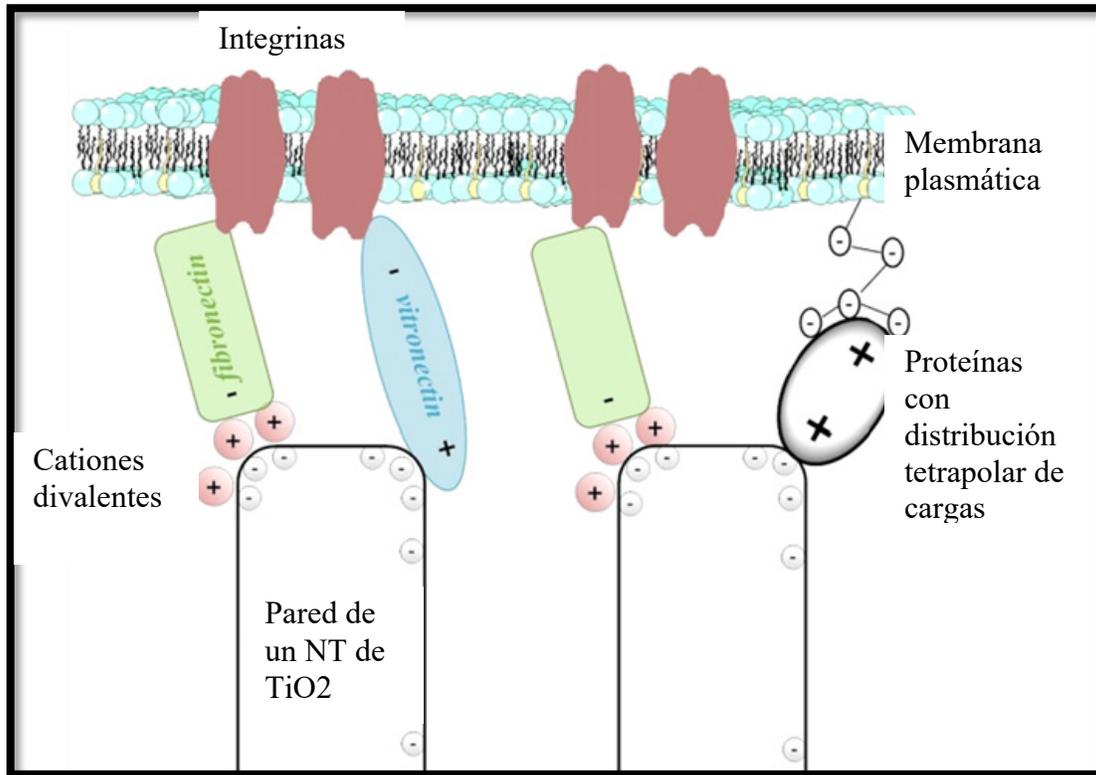


Figura 9 Representación esquemática de la adhesión de fibronectina, vitronectina y proteínas con las cargas de los NTs de  $\text{TiO}_2$  (52)

Sin embargo, las CE son conocidas por su escasa adhesión y lento crecimiento sobre biomateriales (56). Para mejorar la biocompatibilidad se han realizado estudios de los grupos funcionales de superficie y se ha encontrado que las superficies funcionalizadas con grupos carboxilo ( $\text{COOH}$ ) mejoran la adhesión celular y la proliferación de células endoteliales (56).

Por otro lado, los macrófagos forman parte de la respuesta inmune innata y son las principales células reclutadas cuando se coloca un biomaterial, principalmente los tipos M1 o proinflamatorios, cuando su presencia es prolongada conducen a una reacción a cuerpo extraño severa, formación de granuloma y encapsulación fibrosa resultando en inflamación crónica y falla en la integración del biomaterial implantado. Lo que afecta a los biomateriales regenerativos, cuyo objetivo es reemplazar el tejido perdido o dañado y evitar la formación de una cicatriz (57).

La presencia de macrófagos M2 o antiinflamatorios puede ayudar en la vascularización de biomateriales regenerativos inhibiendo la formación de tejido fibroso, con esto mejoran la integración del biomaterial y lo hace cumplir su objetivo (58). Se ha sugerido que un ratio M2:M1 elevado en la proximidad del biomaterial implantado conduce a una mejor remodelación (57), pero la presencia prolongada de los macrófagos M2 conduce a la formación de células gigantes de cuerpo extraño (59).

#### 2.10 Influencia de la topografía de superficie sobre la activación de los macrófagos.

La topografía de la superficie regula el comportamiento de los macrófagos y la respuesta inmune. Se ha reportado que los NTs tienen un efecto inhibitorio sobre la actividad proinflamatoria de los macrófagos cuando son comparados con superficies lisas (60). Las superficies hidrofílicas de biomateriales promueven el fenotipo antiinflamatorio o M2, y también disminuyen la adhesión de macrófagos. Las superficies de NTs super-hidrofílicas disminuyen la proliferación de los macrófagos y la respuesta inflamatoria, e incrementan la secreción de moduladores de reparación de heridas (61).

#### 2.11 Papel de los macrófagos en la endotelización de endoprótesis vascular.

La rápida endotelización o formación de tejido endotelial en la endoprótesis es crucial para garantizar su buen funcionamiento. El mecanismo primario de este fenómeno involucra el reclutamiento de macrófagos activados como parte de la respuesta inmune que provoca el daño vascular cuando se coloca la endoprótesis, la cual contribuye a que se desencadene el mecanismo de re-estenosis. Esto indica que hay una conexión entre la respuesta inmune y la funcionalidad de las CE (62). La dirección de la polarización de los macrófagos activados conduce a remodelación vascular, producción de superóxido o especies reactivas de oxígeno y disfunción endotelial. Estos cambios son asociados a retraso en la re-endotelización y contribuyen a inestabilidad neointima tardía e incremento del riesgo de trombosis tardía en la endoprótesis (63). Por lo tanto, la inmunomodulación de los macrófagos puede mejorar la funcionalidad de las CE (62).

Los macrófagos también se asocian al desarrollo de complicaciones por la colocación de la endoprótesis, ya se ha mencionado que la colocación de la endoprótesis daña la pared vascular, esto induce inflamación local lo que estimula la proliferación de células musculares lisas vasculares y depósito de matriz extracelular, resultando en un engrosamiento de la neoíntima y reestenosis (64).

## 2.12 Métodos de esterilización de las superficies de Titanio.

En la clínica los biomateriales que van a ser implantados deben pasar por un proceso de esterilización. Usualmente primero se hace una limpieza para eliminar residuos de sangre, polvo o proteínas de la superficie, y la esterilización se hace posteriormente con el objetivo de eliminar o detener la reproducción de microorganismos que incluyen bacterias, esporas y hongos. Existen diferentes métodos de esterilización disponibles, cada uno con diferentes mecanismos de acción. Dependiendo de las propiedades del material cada método de esterilización debe ser elegido cuidadosamente (65).

El método de autoclave es un método físico de esterilización, en donde los organismos vivos son expuestos a condiciones insostenibles de temperatura, presión y tiempo (121°C, 18 psi, 20 min). Sin embargo, su eficacia puede variar dependiendo de la densidad del material, volumen y tamaño de la autoclave (66).

La luz ultravioleta (UV) también es utilizada para esterilización de superficies. La región de longitudes de onda corta de alta energía, 280-100 nm, son usadas para eliminar bacterias debido a que inducen la formación de dímeros de timina, inhibiendo la replicación del DNA (67).

El etanol a 60-80% (v/v) es eficaz contra la mayoría de las contaminaciones por bacterias y virus, con el uso de inmersión con etanol solo se elimina la contaminación superficial, y se puede afectar la química de superficie (68).

En la autoclave la temperatura del material presenta un gran incremento debido a la aplicación de vapor caliente. La cámara debe permanecer cerrada hasta que el calor se enfríe

y alcance la temperatura ambiente. Por lo tanto, la autoclave no es recomendado para biomateriales sensibles al calor (69).

La limpieza y esterilización pueden ocasionar cambios en las propiedades de superficie de los biomateriales. La autoclave provoca el depósito de una capa de carbono sobre la superficie esterilizada provocando un aumento de la hidrofobicidad lo que afecta la compatibilidad celular (65).

Se ha demostrado que la esterilización de superficies nanoestructuradas de  $\text{TiO}_2$  con rayos UV incrementa la capacidad hidrofílica, la capacidad de adhesión proteica, la adhesión y proliferación en etapas tempranas de fibroblastos cultivados en estas superficies (70).

## OBJETIVOS DEL ESTUDIO

### Objetivo General:

Evaluar la reendotelización en superficies de TiO<sub>2</sub> nanoestructuradas de modelos de endotelio aterosclerótico y no aterosclerótico in vitro y la polarización de la línea celular RAW 264.7 hacia fenotipos M1 y M2 sobre superficies nanoestructuradas de TiO<sub>2</sub> esterilizadas con diferentes métodos.

### Objetivos Específicos:

1. Elaborar y aprobar el protocolo clínico ante el CNIC del IMSS a nivel nacional para la obtención de muestras de arteria aterosclerótica humana.
2. Aislar células endoteliales provenientes de arteria y vena femoral superficial de pacientes con enfermedad arterial periférica con isquemia crítica.
3. Mantener y expandir cultivo celular primario de las células aisladas.
4. Caracterizar las CE aisladas por inmunofluorescencia con anticuerpos contra factor de von Willebrand.
5. Evaluar el proceso de reendotelización sobre superficies de NTs de TiO<sub>2</sub> de CE aisladas con microscopía electrónica de barrido (SEM).
6. Evaluar el citoesqueleto y las uniones intercelulares por inmunofluorescencia con faloidina y vinculina de CE aisladas sobre superficies de NTs.
7. Analizar la viabilidad de CE aisladas de paciente con AS sobre superficies de NTs de TiO<sub>2</sub> por ensayo MTT y Mito Tracker.
8. Esterilizar con autoclave, rayos ultravioleta y etanol al 70% las superficies de NTs de TiO<sub>2</sub>.
9. Evaluar la viabilidad de los macrófagos RAW 264.7 sobre superficies de NTs de TiO<sub>2</sub> esterilizadas con los tres métodos (autoclave, UV y etanol) por ensayos MTT.
10. Evaluar la morfología de los macrófagos RAW 264.7 sobre superficies de NTs de TiO<sub>2</sub> esterilizadas por SEM.
11. Analizar el citoesqueleto de macrófagos RAW 264.7 sobre superficies de NTs de TiO<sub>2</sub> esterilizadas con los tres métodos por inmunofluorescencia.
12. Evaluar la polarización de macrófagos RAW 264.7 hacia los fenotipos M1 o M2 en las superficies de NTs de TiO<sub>2</sub> esterilizadas con los tres métodos.

13. Evaluar por métodos estadísticos las diferencias entre cada uno de los modelos de estudio para determinar si son significativos.

## CAPÍTULO 3

### Evaluación de células endoteliales aisladas de paciente con aterosclerosis sobre superficies de nanotubos de TiO<sub>2</sub>

#### 3.1 ESTADO DEL ARTE

Las endoprótesis vasculares son comúnmente utilizadas para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, que son la principal causa de muerte en el mundo. Sin embargo, este tratamiento es frecuentemente asociado con complicaciones tales como, reestenosis secundaria a trombosis y a la proliferación de células musculares lisas. Estas complicaciones retrasan el proceso de endotelización y constituyen un grave problema clínico (71). El daño y la disfunción de las CE ocurre por dos razones, una provocada por la misma aterosclerosis que llevó al paciente a requerir la endoprótesis y la otra por el daño agudo de la pared vascular durante su colocación. Por lo tanto, son altamente deseados los dispositivos vasculares que supriman la inflamación y la proliferación de células musculares lisas o que promuevan la endotelización (2).

Con el objetivo de estudiar la endotelización sobre superficies nanoestructuradas, se han llevado a cabo numerosos estudios. Debido a la gran heterogenicidad tanto en morfología como en función, que presentan las células endoteliales, un solo modelo celular no es suficiente para realizar inferencias generalizadas ni para la medicina translacional.

La mayor parte de los modelos *in vitro* que se reportan como modelo de estudio en la literatura son en células endoteliales que son aisladas de vena umbilical (HUVEC) y de líneas celulares inmortalizadas de uso comercial y solo un escaso número de investigaciones son con células endoteliales aisladas de pacientes. Es importante contar con modelos de células endoteliales de pacientes con aterosclerosis, para evaluar su capacidad de reendotelización en superficies de biomateriales, de esta forma se puede verificar si conservan su capacidad proliferativa, ya que estos pacientes son los que finalmente recibirán la endoprótesis vascular.

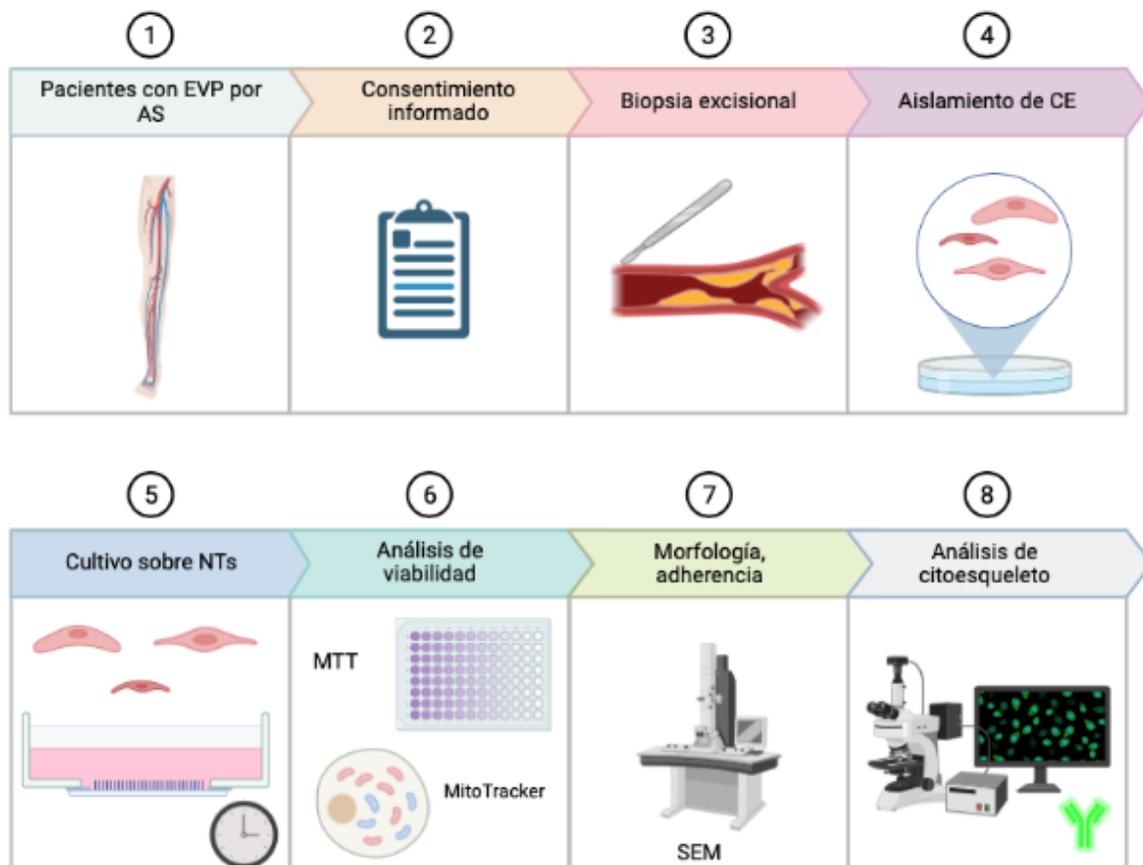
Por lo anterior es relevante estudiar el proceso angiogénico de CE aisladas de arterias con aterosclerosis frente a biomateriales nanoestructurados con el objetivo de mejorar el proceso

de neovascularización de tejidos isquémicos y así ofrecer mejores prototipos de endoprótesis vasculares para pacientes con aterosclerosis y evitar complicaciones como la isquemia crítica que conduce a amputación de extremidades.

El propósito del presente estudio fue evaluar CE de pacientes EVP sobre superficies nanoestructuradas de  $\text{TiO}_2$  con la finalidad de determinar si las CE conservan funcionalidad y son capaces de llevar a cabo una adecuada endotelización en la endoprótesis.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1 Diseño de estudio.



### 3.2.2 Síntesis de nanotubos de dióxido de Titanio (NTs).

La síntesis de NTs se realizó como se ha descrito en estudios previos (72). Discos de Ti6Al4V de 1 cm de diámetro y 1 mm de grosor fueron pulidos con papel lija SiC (100-2000 arena). A continuación, las muestras se colocaron en una celda especial de 125 ml y se anodizaron utilizando agua superoxidada (Microdacyn 60® Oculus technologies, Guadalajara, JAL, MEX) a pH de 6.8, enriquecido con 10 mg/L NH<sub>4</sub>F (Sigma3 Aldrich, USA) y 100 mg/L NaCl (Sigma-Aldrich, USA). Se aplicó un potencial de 20 V con una fuente de poder DC durante 5 min y una malla de platino como contra electrodo. El proceso se llevó a cabo a temperatura ambiente. Al final del proceso las muestras anodizadas fueron lavadas con un baño ultrasónico de agua destilada durante 5 min para eliminar residuos de sales de fluorato, se enjuagaron con alcohol isopropilico y se secaron en desecador por 12 h. Discos de Ti6Al4V

sin anodizar fueron utilizadas como control. Todos los materiales de experimentación fueron esterilizados con rayos ultravioleta (UV-B, 30W) a una longitud de onda de 285 nm durante 30 min por cada lado.

### 3.2.3 Aprobación por el Comité de Ética y toma de muestras de tejido vascular

Se obtuvieron muestras de arteria y vena femoral superficial con diferentes grados de placa de aterosclerosis mediante biopsia por escisión de especímenes anatomopatológicos obtenidos por amputación de pacientes con enfermedad arterial periférica diagnosticados con isquemia crítica. Los pacientes derechohabientes del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), los cuales autorizaron la toma de muestra de tejidos mediante consentimiento informado aprobado por el Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS, el 14 de mayo de 2019 (número de registro R-2019-785-035), con vigencia de un año. Sin embargo, debido a la pandemia COVID-19, se interrumpió la toma de muestra en el periodo comprendido de marzo a septiembre de 2020, por lo que se solicitó una reaprobación a dicho comité, que emitió su dictamen el 25 de mayo de 2020. Ambos dictámenes y el consentimiento informado están incluidos en la sección de Anexos.

Todas las muestras tomadas fueron anónimas y se etiquetaron con un número de folio para su identificación. Los segmentos de arteria y vena se colectaron en tubo Falcón estéril con solución buffer fosfato salino (PBS 1X) y antibióticos al 1%, se trasladaron en hielo al laboratorio de Biología Molecular y Cáncer del Instituto de Ingeniería de la UABC. Después de la escisión, se mantuvieron a 4°C y se procesaron dentro de un periodo máximo de 24 horas.

### 3.2.4 Técnica de tinción con hematoxilina y eosina

Un segmento transversal de arteria y uno de vena, de aproximadamente 0.5 cm de longitud, fueron sumergidos en tubos eppendorf con una solución acuosa de formaldehído al 37% para fijar y conservar la estructura de los tejidos. Ambas muestras fueron infiltradas en parafina para formar bloques, los cuales fueron cortados en finas secciones de 10  $\mu$ m con microtomo. A continuación los cortes se montaron en portaobjetos. Las muestras fueron teñidas con

hematoxilina y eosina, la hematoxilina se oxida a hemateína, la cual da un color morado en estructuras ricas en ácidos nucleicos como núcleo, ribosomas y retículo endoplásmico rugoso (73). La eosina tiene afinidad por las proteínas, da un color rosa y sirve para identificar citoplasma y membranas celulares (74).

Los pasos de la tinción con hematoxilina y eosina fueron los siguientes (74):

1. Desparafinado. Las muestras deben ser desparafinadas con xileno, se realizaron dos inmersiones de 5 min de incubación cada una.
2. Hidratación. Los portaobjetos con las muestras fueron sumergidos en soluciones de etanol y agua, con un porcentaje decreciente de etanol (100%, 90% y 70%). Posteriormente fueron lavadas con agua desionizada.
3. Tinción de hematoxilina. Los portaobjetos fueron incubadas con una solución de hemalumbré durante 10 min, y después se lavaron con agua desionizada. Luego fueron sumergidas en una solución de alcohol ácido (1% de HCl en etanol). Posteriormente se lavaron con agua desionizada y cambiaron de color rojo claro a azul grisáceo.
4. Tinción de eosina. Las muestras fueron introducidas durante 2 min en una solución de eosina y fueron enjuagadas con agua desionizada.
5. Deshidratación. Los portaobjetos fueron sumergidos en soluciones de agua y etanol, con porcentaje creciente de etanol (70%, 90% y 100%).
6. Aclarado. Las muestras fueron sumergidas en xileno, en dos inmersiones de 3 min cada una.

Finalmente, las muestras fueron cubiertas con cubreobjetos y selladas para evitar contaminación y descomposición. Posteriormente fueron examinadas con microscopio óptico a diferentes magnitudes.

### 3.2.5 Técnica de aislamiento de células endoteliales por digestión mecánica y enzimática.

Bajo condiciones estériles y en campana de flujo laminar, se realizó disección de los segmentos de arterias y venas femorales superficiales, retirando excedentes de grasa. Se realizó corte longitudinal obteniendo un segmento abierto, el cual se colocó en una caja de Petri, se lavó con PBS, se cortaron en fragmentos pequeños de escasos milímetros y se lavaron 8 a 10 veces con PBS. Los fragmentos fueron tomados con pinzas estériles y

depositados en un tubo Falcón estéril con 2 ml de tripsina al 1% asegurando que quedaran cubiertos totalmente. Posteriormente se incubaron a 37°C en agitación continua durante 90 minutos. Las células liberadas en la tripsina se recuperaron en otro tubo Falcón estéril, se les realizó un lavado con medio de cultivo M199, se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió con 3 ml de M199 con suero bovino fetal (SBF) al 10% y penicilina-estreptomicina al 1% (PS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Posteriormente las células en suspensión fueron colocadas en platos de cultivo de 5 cm de diámetro y se incubaron a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%, con cambio de medio cada 2 a 3 días.

### 3.2.6 Cultivo celular primario

Las células cultivadas se mantuvieron con cambio de medio DMEM AL 10% de SBF cada tercer día hasta lograr una confluencia del 80%. Se procedió a realizar disgregación celular, se retiró el medio y se lavó con PBS, se añadió tripsina al 1%, se incubó a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% durante 5 minutos, posteriormente se añadió medio DMEM al 10% de SBF y se recuperó en un tubo Falcón estéril, se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el precipitado con medio DMEM al 10% de SBF, las células resuspendidas se colocaron en dos frascos T25, y se incubaron a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%. Una vez alcanzada la confluencia del 80%, uno de los frascos T25 se destinó para análisis de viabilidad sobre superficies de NTs a 24h, 72h y 5 días. El otro frasco T25 se utilizó para análisis por SEM, las células restantes se sembraron hasta el pasaje 4 para realizar análisis de citoesqueleto, viabilidad mitocondrial y caracterización de endotelio por factor von Willebrand mediante inmunofluorescencia.

### 3.2.7 Evaluación de la morfología celular por microscopía electrónica de barrido (SEM).

Con el objetivo de evaluar los cambios fenotípicos de las células endoteliales aisladas y cultivadas sobre las superficies pulidas y de NTs, se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM) a las 4 h, 24 h y 72 h de incubación. Se sembraron 10,000 células por superficie, una vez cumplido el periodo de cultivo, las muestras se lavaron 3 veces con buffer cocadilato en frío durante 5 minutos cada una, posteriormente se colocaron en glutaraldehído al 3%/paraformaldehído 2% en cocadilato durante 24 h a 4°C. Se lavó 3 veces con buffer

cocadilato en frío durante 5 min cada lavado. Se realizó una postfijación con glutaraldehído 4% en cocadilato 0.2 M- 3%  $K_3Fe(CN)_6$  en agua destilada, volumen 1:1, durante 1 h en hielo. Después de este periodo se lavó 3 veces con agua destilada, 5 min cada lavado en hielo. Se incubó con Tiocarbhidrazida 0.5% por 20 min a temperatura ambiente, nuevamente se lavó tres veces con agua destilada durante 5 min. Posteriormente, se incubó durante 30 min con acetato de uranil acuoso al 1% a 4°C, 3 lavados de 5 minutos con agua destilada en hielo y se iniciaron las deshidrataciones con etanol al 25, 50, 70 y 100% por 30 minutos cada uno, a 4°C (75). Finalmente se dejaron las superficies cultivadas en disecador durante 24 h para su posterior análisis por SEM.

### 3.2.8 Inmunofluorescencia para caracterización de células endoteliales con anticuerpo conjugado anti-factor von Willebrand.

Con el objetivo de caracterizar a las células endoteliales se realizó la identificación del factor von Willebrand intracitoplásmico por medio de inmunofluorescencia. Se sembraron  $1 \times 10^5$  células endoteliales sobre laminilla (portaobjetos) y se dejaron cultivando durante 72 h a 37°C y  $CO_2$  al 5%. Se lavó la laminilla 3 veces con PBS durante 5 min cada lavado. Posteriormente, se fijó con paraformaldehído al 4% durante 45 min a 37°C. Se lavó 3 veces con PBS 5 min cada uno. Se incubó la laminilla con Tritón x-100 al 1% por 30 min a 37°C. Se lavó 3 veces por 5 min con PBS y se bloqueó con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en campana estéril durante 2 h a 37°C. Se lavó 3 veces con PBS 5 min cada uno, finalmente se colocó el anticuerpo conjugado anti-Factor Von Willebrand (Novus Biologicals Dyligh 488) a una dilución 1:100 en la laminilla y se dejó 1 h a 37°C, posteriormente 30 min a temperatura ambiente (TA) y finalmente a 4°C toda la noche, protegido de la luz. Al día siguiente se realizaron 3 lavados con PBS durante 5 min cada uno, se añadió 600  $\mu l$  del anticuerpo conjugado y se dejó incubando 20 min a TA protegido de la luz. Finalmente, se realizaron 3 lavados con PBS 5 min cada uno y un lavado final con agua destilada durante 15 min. Posteriormente, se colocó una gota de medio para montar fluorescencia, se examinaron y fotografiaron con microscopio de fluorescencia (Citoviva).

### 3.2.9 Técnica de inmunofluorescencia para análisis de citoesqueleto y uniones intercelulares de células endoteliales sobre superficies de NTs.

Con el objetivo de evaluar las fibras de estrés de actina y las uniones intercelulares en las CE aisladas después de 24 h de cultivo sobre superficies de TiO<sub>2</sub> pulidas y con NTs, se estudiaron las fibras de actina por medio de la faloidina y la vinculina, proteína citoplásmica de unión a la actina, abundante en las uniones célula-célula. Las células de endotelio fueron sembradas sobre superficies pulidas de Ti6Al4V y sobre NTs a una concentración celular de  $1.5 \times 10^4$  células en cada una, cultivadas durante 24 h a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Una vez cumplidas las 24 h las superficies cultivadas fueron lavadas tres veces con PBS, 5 min cada lavado, y fijadas con paraformaldehído al 4% en PBS durante 45 min a 37°C. Una vez fijadas las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS, 5 min cada lavado. Se permeabilizaron con tritón x-100 al 0.1% en PBS durante 30 min a 37°C, y se lavaron 3 veces con PBS. Se añadió solución de bloqueo, BSA al 1% en PBS, en campana estéril y se dejó incubando 2 h a 37°C. Se realizaron 3 lavados con PBS. Finalmente, las células fueron incubadas con faloidina Alexa Fluor 488 a una dilución 1:100 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en solución de bloqueo durante 45 min a temperatura ambiente y protegido de la luz para evaluar las fibras de estrés de actina. Para vinculina se utilizó anticuerpo primario a una dilución 1:100 (Abcam, Cambridge, MA, USA) y se dejó incubando durante 2 h a temperatura ambiente, posteriormente se añadió el anticuerpo secundario Alexa Fluor 594 a una dilución 1:1000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) durante 1 h a temperatura ambiente (5). Una vez terminado el periodo de incubación las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS, se añadió 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) en PBS a cada superficie y se dejó incubando 5 min a temperatura ambiente protegido de la luz. Finalmente, las superficies fueron lavadas 3 veces con PBS, 5 min cada lavado y una vez con agua destilada durante 25 min. Las muestras fueron invertidas en cubreobjetos con solución de montaje de fluorescencia, examinadas y fotografiadas con filtro verde (faloidina: actina), con filtro rojo (vinculina) y filtro azul (DAPI: núcleo) por medio de microscopio de fluorescencia bajo magnificaciones similares.

### 3.2.10 Evaluación de la viabilidad y proliferación celular.

Células aisladas de arteria y vena pertenecientes al pasaje 2, fueron cultivadas en cajas de 96 pozos a 10,000 células por pozo durante 24 h. También, se cultivaron a 72 h en superficies

lisas y de NTs, 15 000 células por superficie. Las células de vena del pasaje 4 se sembraron sobre superficies lisas y con NTs a una concentración de 15,000 células por superficie, y se dejaron 24 h, 72 h y 5 días en incubación. Posteriormente se realizó el ensayo MTT en cada uno de los cultivos, siguiendo el protocolo de Stockert con algunas modificaciones (76), que mide la habilidad de las células viables de reducir la sal de tetrasolium soluble, 3-(4,5-dimetiltiazol-2,5 difenil bromuro de tetrazolium (MTT), en un precipitado de formazan insoluble por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa. Los cristales de formazan color púrpura se disolvieron en dimetil-sulfóxido (DMSO) y se midió la densidad óptica (DO) con un lector de ELISA para estimar la actividad metabólica de las células endoteliales en ambas superficies a una longitud de onda de 590 nm y a 650 nm como línea basal. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### *3.2.11 Evaluación de la viabilidad mitocondrial de células endoteliales sobre superficies de NTs por inmunofluorescencia.*

Para evaluar las mitocondrias en células vivas aisladas de endotelio y cultivadas a 24 h sobre superficies de Ti6Al4V pulidas y con NTs, se realizó inmunofluorescencia con un derivado de X-rosamina Mitotracker Red CMXRos (Invitrogen M7512, Carlsbad, CA, USA), el cual penetra en las mitocondrias de células vivas y su acumulación depende del potencial de membrana. Las células de endotelio fueron sembradas sobre las superficies a  $1.5 \times 10^4$  células en cada una durante 24 h a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5%. Una vez cumplidas las 24 h, se retiró el medio y se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min, posteriormente se añadió una solución a 100 nM de Mitotracker en DMEM solo a cada muestra y se dejaron incubando durante 45 min a 37°C. Se realizaron 3 lavados con PBS y se fijaron con paraformaldehído al 4% en PBS durante 45 min a 37°C. Se efectuaron 3 lavados con PBS, las muestras fueron incubadas con Triton X-100 al 0.1% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente. Se lavaron 3 veces con PBS, se añadió DAPI y se dejaron 20 min a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS y un último lavado con agua destilada durante 15 min. Las muestras fueron invertidas en cubreobjetos y se montaron con solución de inmunofluorescencia para observarse y fotografiarse con filtro azul (DAPI) y filtro rojo (mitocondrias) por medio de microscopio de fluorescencia con magnificaciones similares. Se analizaron de 5 a 8 campos en las microfotografías con el software ImageJ, se calculó la fluorescencia celular total

corregida (CTCF) y se realizaron gráficas de los resultados con Graph Prism versión 9 (San Diego, CA).

### 3.2.12 Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el software Graph Prism versión 9 (San Diego, CA). La prueba t-de student fue utilizada para comparar la viabilidad celular de arteria y vena sobre poliestireno, para comparar la viabilidad sobre superficie lisa y con NTs a 3 días de vena y arteria, también fue utilizada para comparar la viabilidad mitocondrial de las CE sobre superficies lisas y con NTs.

Para los experimentos de comparación de viabilidad sobre superficies lisas y con NTs a diferentes tiempos de cultivo, se utilizó análisis de varianzas de una vía (ANOVA), seguido del método de Tukey para evaluación de múltiples comparaciones.

Las micrografías obtenidas por SEM e inmunofluorescencia fueron editadas con el software Image J.

Se consideraron valores estadísticamente significativos cuando el valor p fue menor a 0.05.

### 3.3 RESULTADOS

#### 3.3.1 Características de los pacientes con aterosclerosis

El estudio incluyó un total de 16 pacientes con enfermedad vascular periférica por aterosclerosis e isquemia crítica sometidos a amputación supracondílea. Un total de 20 biopsias escicionales fueron obtenidas en un periodo comprendido del 12 de septiembre de 2019 al 20 de mayo del 2021, se interrumpió la toma de muestra de marzo a agosto de 2020 por la pandemia COVID-19. Las biopsias fueron trasladadas y procesadas inmediatamente después de la escisión, de las 20 biopsias, 15 procedieron de arteria femoral superficial y 5 de vena femoral superficial como control. Los datos de los pacientes se muestran en la tabla 1. El consentimiento informado fue obtenido de todos los participantes de acuerdo a la Declaración de Helsinki.

<b>Edad</b>	44 a 67 años, media 58.6
<b>Sexo</b>	13 M 3 F
<b>Antecedentes patológicos</b>	Diabetes mellitus tipo 2/ HAS
<b>Tabaquismo</b>	14

*Tabla 1 Características de los pacientes con aterosclerosis (M: Masculino, F: Femenino, HAS: Hipertensión arterial sistémica).*

Todos los pacientes presentaban EVP por aterosclerosis, con isquemia crítica, Fontaine grado III y IV. Se puede observar que todos los pacientes padecían diabetes, la mayoría del sexo masculino (13 de 16), con una media de edad de 58.6 años y con antecedentes de tabaquismo (14 de 16). De acuerdo a los resultados que se observan en la tabla 1 la mayoría de los pacientes que participaron en el estudio presentaron los factores de riesgo asociados a enfermedades cardiovasculares: diabetes, sexo masculino y tabaquismo. Todos presentaron manifestaciones de aterosclerosis: enfermedad vascular periférica que los llevó a isquemia crítica y amputación. Solo de uno de los pacientes se logró el aislamiento de células, sus características se muestran en la tabla 2. Este paciente presentó antecedentes de enfermedad

vascular cerebral y amputación previa de la otra extremidad inferior, esto demuestra que el paciente presentaba aterosclerosis en varios lechos vasculares y además de diabetes mellitus tipo 2 de larga evolución. El paciente negó antecedentes de tabaquismo.

<b>EDAD</b>	62 años
<b>SEXO</b>	Masculino
<b>ANTECEDENTES PATOLÓGICOS</b>	Diabetes mellitus tipo 2, de 10 años de evolución. EVC. Amputación supracondílea de miembro inferior derecho.
<b>TABAQUISMO</b>	Negativo
<b>GLUCEMIA</b>	90.7 mg/dL
<b>UREA</b>	45.9 mg/dL
<b>CREATININA</b>	1.7 mg/dL

*Tabla 2 Características del paciente con aterosclerosis del que se aislaron células endoteliales de arteria y vena femoral superficial. (EVC: Enfermedad vascular cerebral).*

### 3.3.2 Estudio histopatológico

De un segmento de arteria (Fig. 10 y 11) y otro de vena (Fig. 12 y 13) se realizaron cortes y se tiñeron con hematoxilina y eosina. Los estudios histopatológicos de la arteria demuestran la presencia de la placa de ateroma, se observa calcificación de la media, lo cual demuestra esclerosis calcificada de Mönckeberg (Fig. 11) (77).

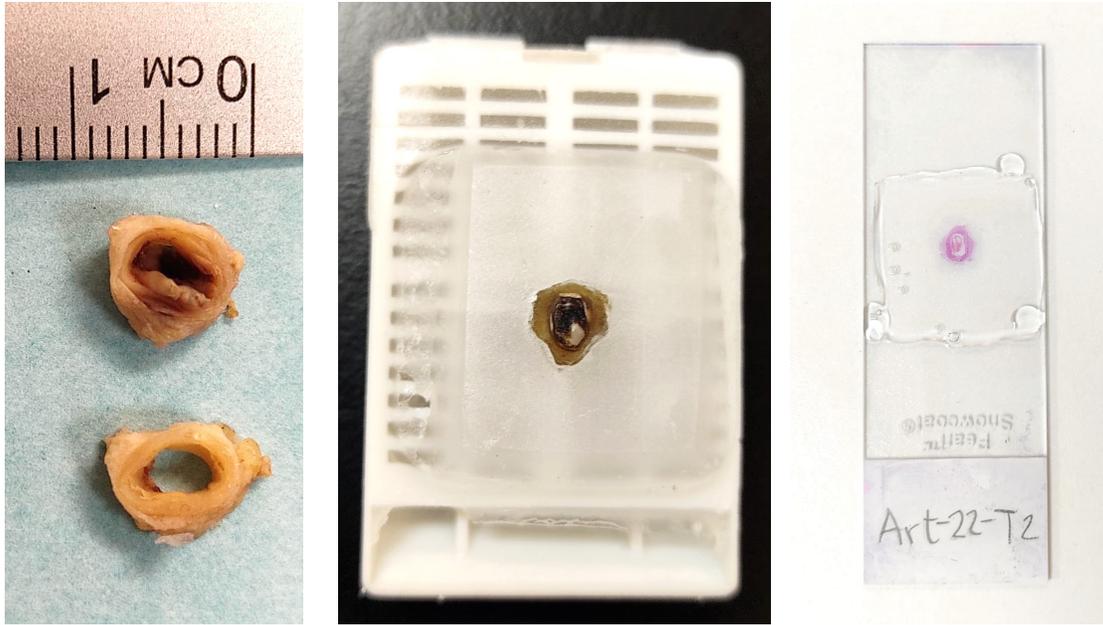


Figura 10 Cortes histológicos transversales de arteria femoral superficial (izquierda), en parafina (centro) y en portaobjetos con tinción de hematoxilina y eosina (H&E) (derecha).

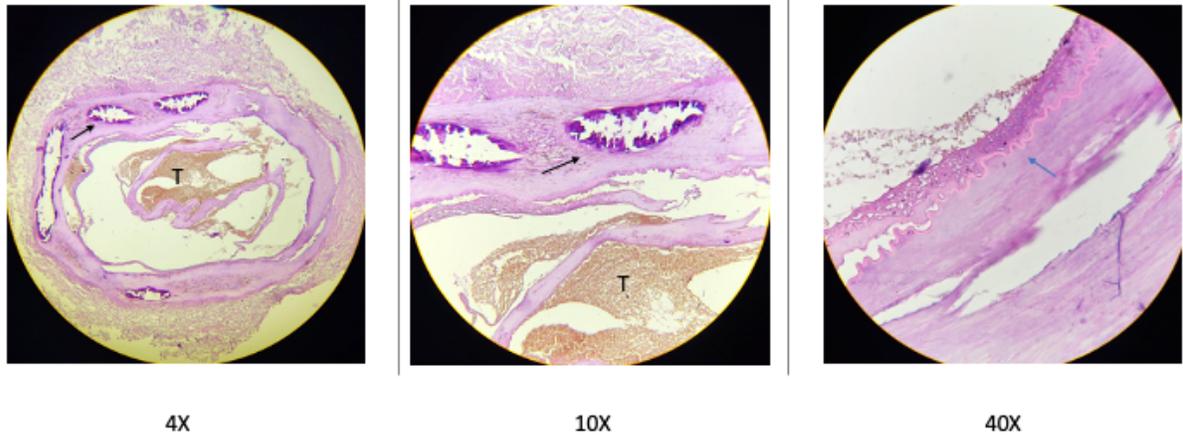


Figura 11 Imágenes tomadas de arteria femoral superficial con ruptura de la placa de ateroma (tinción de H&E) a diferentes magnificaciones. Se observa esclerosis calcificada medial de Mönckeberg (flechas negras), trombo (T), capa elástica interna (flecha azul).



Figura 12 Cortes histológicos transversales de vena femoral superficial (izquierda), en parafina (centro) y en portaobjetos con tinción de hematoxilina y eosina (H&E) (derecha).

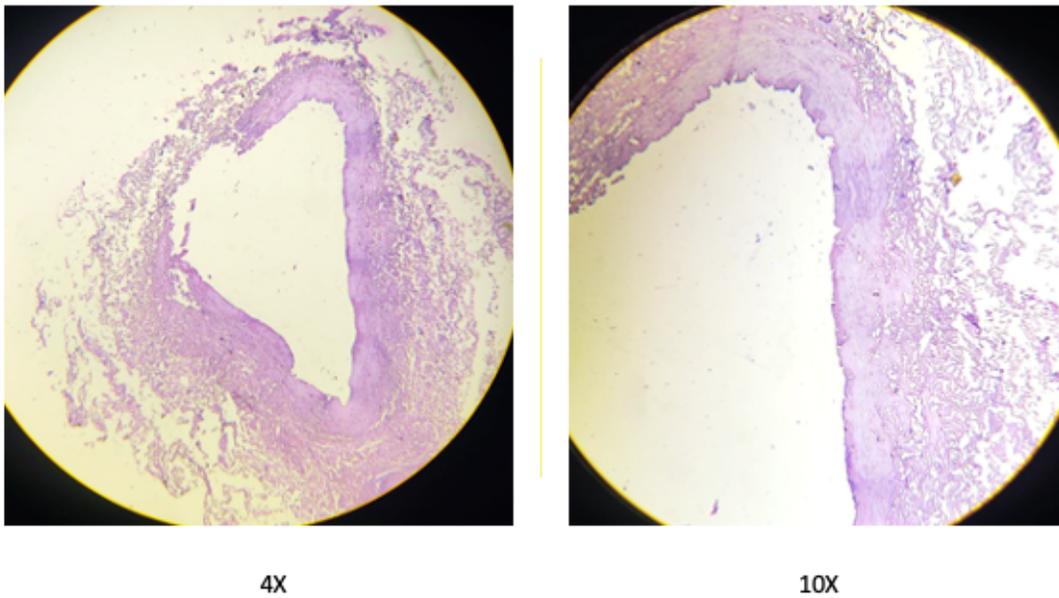


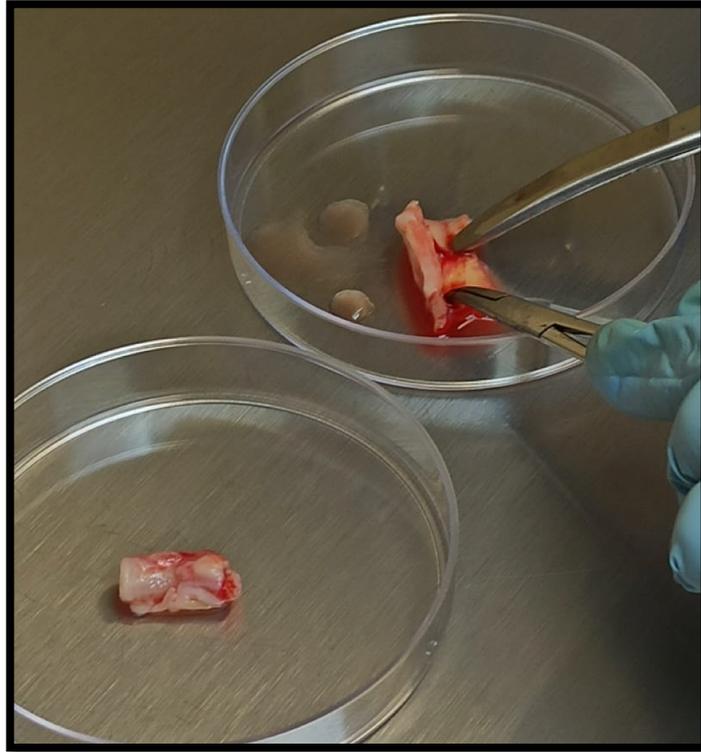
Figura 13. Imágenes tomadas de vena femoral superficial de paciente con aterosclerosis que demuestran una túnica media menos desarrollada que en la arteria.

### 3.3.3 Aislamiento y cultivo celular

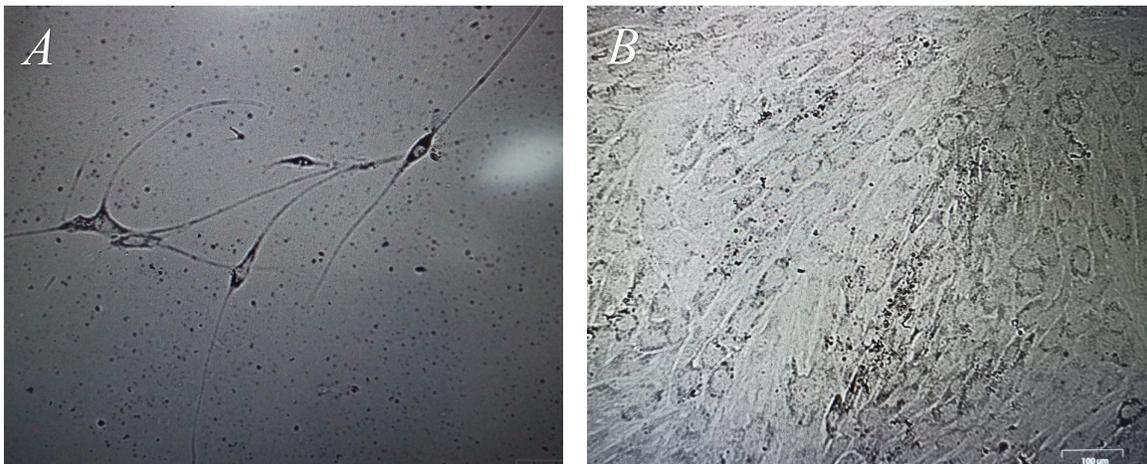
Se obtuvieron segmentos de 2 a 4 cm de longitud. De las 20 biopsias sometidas a digestión mecánica y enzimática, las 15 arterias presentaron placa de ateroma macroscópico amarillo y endurecido a la palpación (Fig. 14), las 5 venas se observaron aparentemente sanas.

Al principio de la investigación, con el objetivo de obtener un mayor número de células las digestiones enzimáticas se dejaron a diferentes tiempos de incubación, se evaluó durante periodos de 12 h y también repitiendo varias ocasiones las digestiones en la misma muestra. Sin embargo, con ninguno de estos protocolos utilizados previamente (78-81) se obtuvieron células. Solo en 7 muestras, que fueron incubadas a 90 min, se logró el aislamiento de células, las cuales fueron observadas por microscopía de contraste de fases. De los siete segmentos vasculares, cinco fueron de arteria y dos de vena femorales superficiales.

De los 7 cultivos primarios, dos presentaron confluencia del 60 a 80%, a los 19 días del aislamiento las de arteria y a los 28 días las de vena (Fig. 15). Ambos cultivos presentaron diferentes morfologías celulares, algunas compatibles con CE y otras con células de músculo liso. Los 5 cultivos primarios restantes fueron descartados por ausencia de crecimiento celular. Los dos cultivos primarios que se lograron expandir procedieron de arteria y vena del mismo paciente. Se realizó el cultivo primario de la arteria hasta el pasaje 2 y de vena hasta el pasaje 4.



*Figura 14 Fotografía de los segmentos de arteria (superior derecha), mostrando la placa y vena (inferior izquierda) femoral superficial de paciente con AS.*



*Figura 15 Micrografía de contraste de fases de cultivo primario de células endoteliales aisladas de arteria de paciente con AS. A. 4 días de cultivo, B. 19 días de cultivo. Barra de escala: 100μm.*

### 3.3.4 Adherencia y morfología celular de endotelio sobre superficies de TiO<sub>2</sub>

Las imágenes obtenidas por SEM del endotelio de vena cultivado sobre superficies de NTs a 4 h, muestran la interacción de las células de endotelio con la superficie anodizada. Como se puede observar en la figura 16, a diferentes magnificaciones, las CE se adherieron a la superficie. Se observaron varias células adheridas a las superficies anodizadas a las 4 h de cultivo (figura 16A). También, se aprecia una gran depósito de matriz extracelular por parte de estas células (Fig. 16B y 16C). A mayor magnificación se observan en los bordes de la célula el desarrollo de filopodias delgadas (Fig. 17A y 17B). Las filopodias delgadas (0.1 a 0.3  $\mu\text{m}$ ) son estructuras celulares que protruyen como dedos, están constituidas por filamentos paralelos de F-actina empaquetados y su función es promover la migración y extensión celular (82). Las filopodias actúan como tentáculos para sensar el microambiente (82).

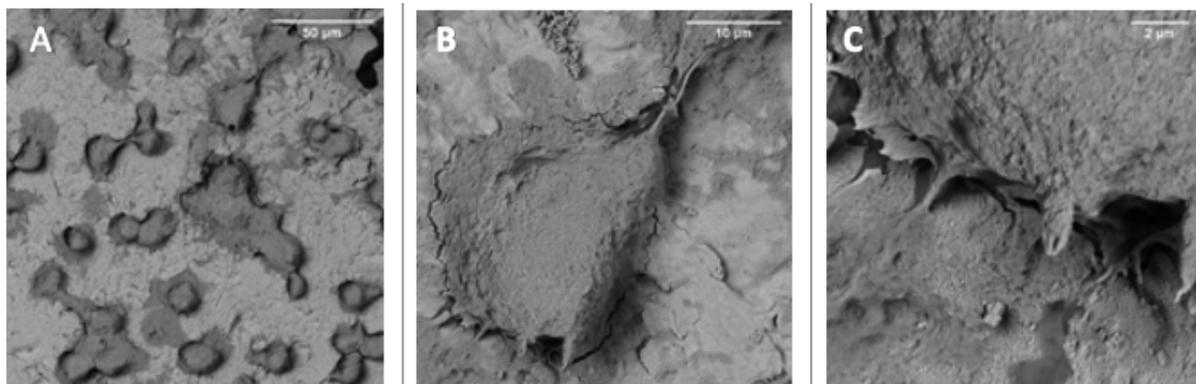


Figura 16 Micrografías SEM de endotelio de vena sobre superficies de NTs a 4 h de cultivo. Adherencia (A), morfología elongada y depósito de matriz extracelular (A, B, C).

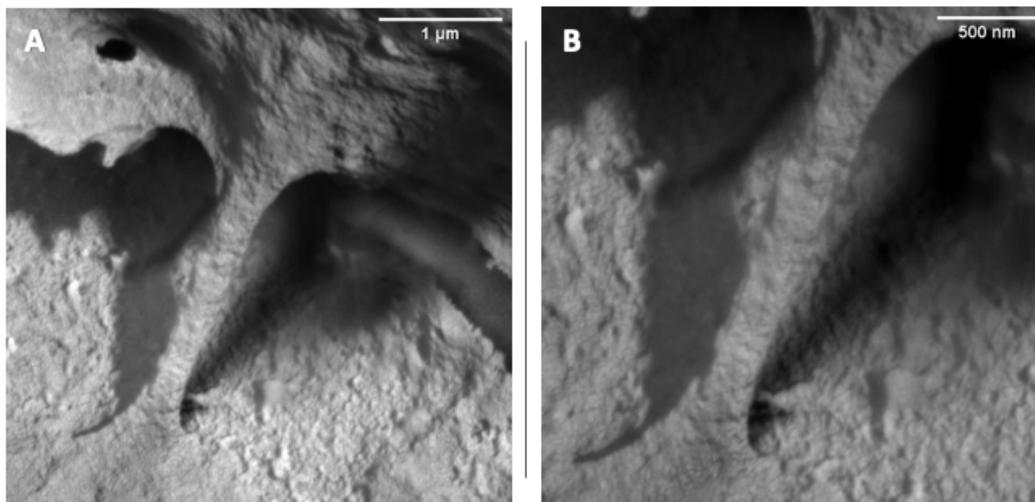


Figura 17 Micrografías SEM de endotelio de vena sobre superficies de NTs a 4 h de cultivo que muestran filopodias a diferentes magnificaciones (A y B)

Las micrografías SEM a 24 h de cultivo de células endoteliales (Figuras 18 y 19) sobre superficies de Ti6Al4V y NTs con electrones secundarios, muestran una imagen más detallada de ambas superficies y la presencia de células de aspecto aplanado tanto en el control como anodizadas (Fig. 18A y 18D). Se observa un gran depósito de matriz extracelular en ambas superficies (Figuras 18B, 18C, 18E y 18F). En los bordes celulares se aprecia la presencia de microvellosidades y filopodias delgadas de mayor longitud en las células sobre superficies anodizadas (Fig. 19C y 19D) en comparación con el control sin anodizar que muestra filopodios de mayor grosor y menor longitud (Fig.19A y 19B).

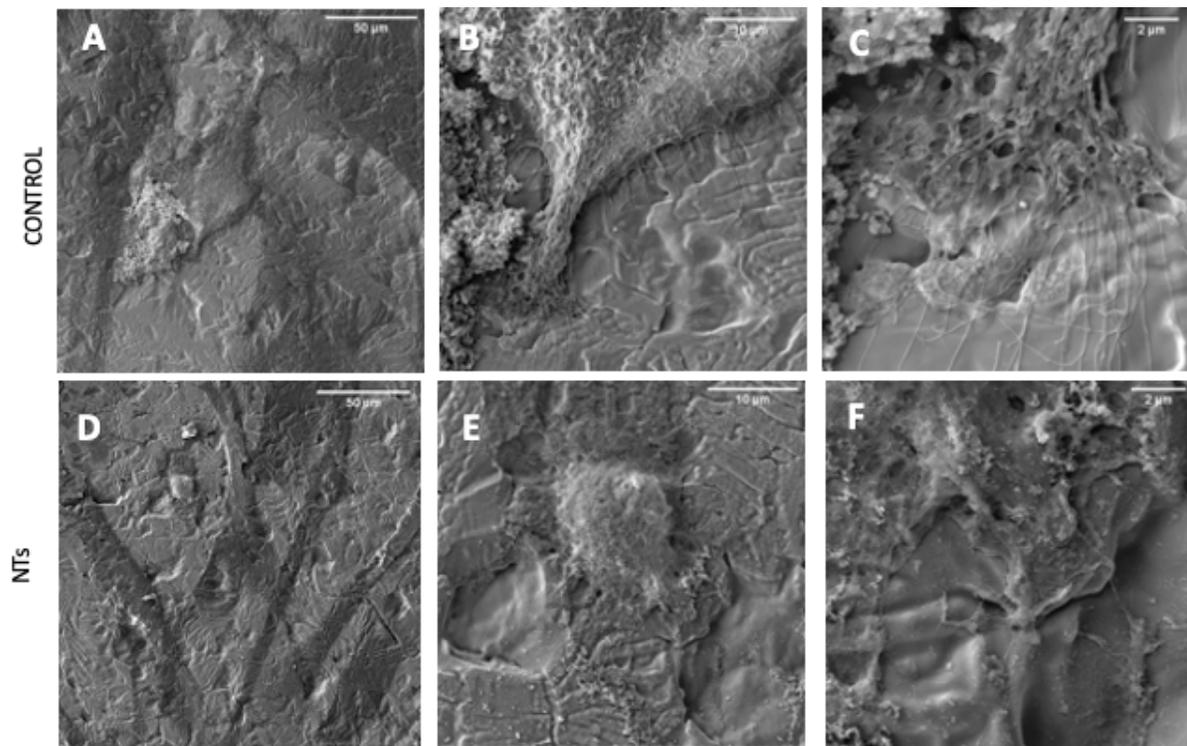


Figura 18 Micrografías SEM (imagen con electrones secundarios) de endotelio de vena sobre superficies de Ti6Al4V sin anodizar (A y B) y con NTs (C y D) a 24 h de cultivo.

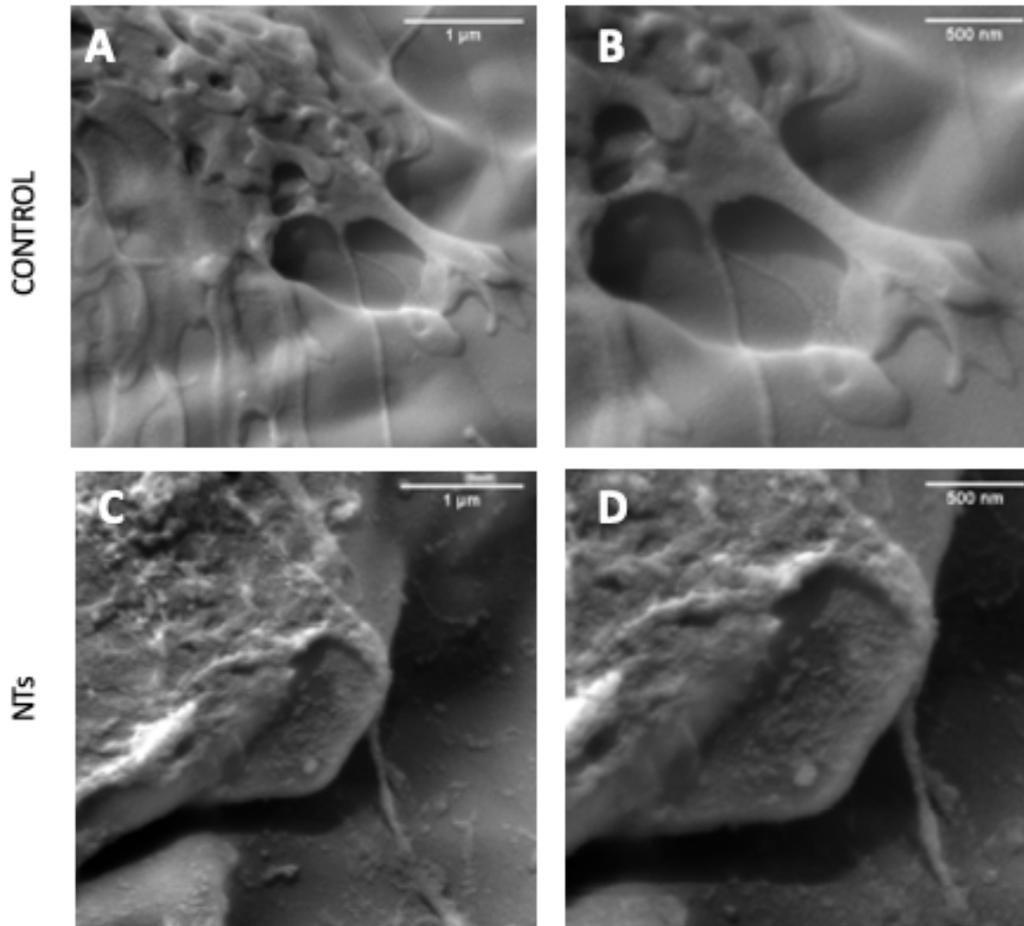


Figura 19 Micrografías SEM de CE de vena cultivadas sobre superficies control de Ti6Al4V (A y B) y con NTs (C y D) que muestran la presencia de filopodias.

A 3 días de cultivo de células endoteliales de vena de paciente con aterosclerosis sobre superficies de Ti6Al4V y NTs, se pueden notar diferencias significativas entre ambas superficies en las micrografías SEM (Figuras 20 y 21) con electrones secundarios. En la superficie control de Ti6Al4V se detectó la protrusión de un filopodia de gran longitud y delgado (Fig. 20A, 20B y 20C) en comparación con los bordes de la célula sobre superficie de NTs que muestra una gran cantidad de filopodios delgados de diferentes longitudes en todo el borde celular (Fig. 20D, 20E y 20F). La célula muestra una morfología ovalada, bien definida en la misma superficie (Fig. 20E). A mayor magnificación se observan las interacciones célula-célula (Fig. 21) en ambas superficies estudiadas. En mayor cantidad en las superficies anodizadas y una mejor integración de la estructura celular a la superficie nanoestructurada (Fig. 21 C y D). También, se observa un gran depósito de matriz extracelular en ambas superficies. Estos resultados sugieren una mejor extensión de las

células a lo largo de la superficie con NTs con mayor formación de interconexiones y filopodias para formar una monocapa celular requerida en el proceso de reendotelización. En las superficies lisas de Ti6Al4V, existe una menor extensión, interconexiones y filopodias (figura 21 A y B). Por lo tanto, los NTs permiten mayor anclaje celular.

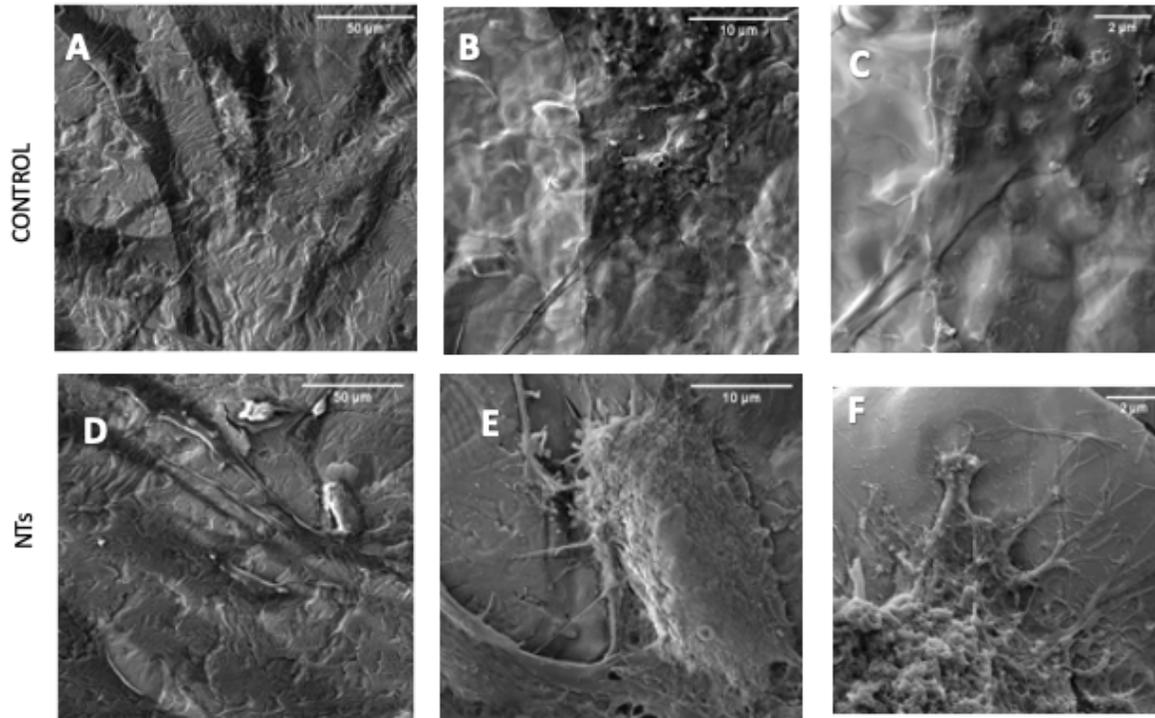


Figura 20 Microfotografías SEM de endotelio de vena a 3 días de cultivo sobre superficies lisas de Ti6Al4V (A, B y C) y anodizadas de TiO<sub>2</sub> (D, E y F).

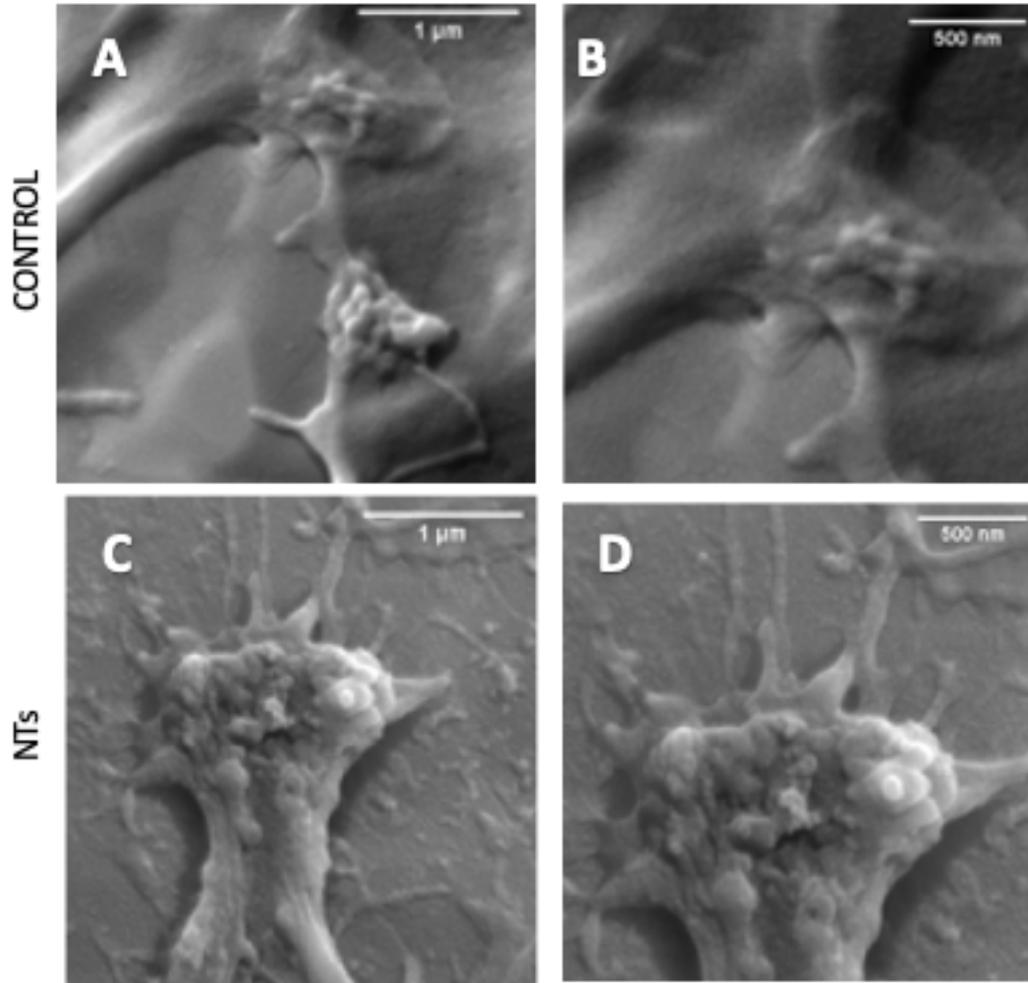


Figura 21 Micrografías SEM de CE de vena a 3 días de cultivo sobre superficies control de Ti6Al4V (A y B) y sobre superficies con NTs (C y D) que muestran la presencia de filopodias.

### 3.3.5 Caracterización de células endoteliales

Las CE aisladas de vena femoral superficial mostraron la presencia del factor von Willebrand por inmunofluorescencia (Fig. 20), el cual se encuentra de manera característica dentro de los cuerpos de Weiben-Palade, estructuras tubulares localizadas en el citoplasma de CE (83). Estos resultados confirman que las células aisladas eran CE.

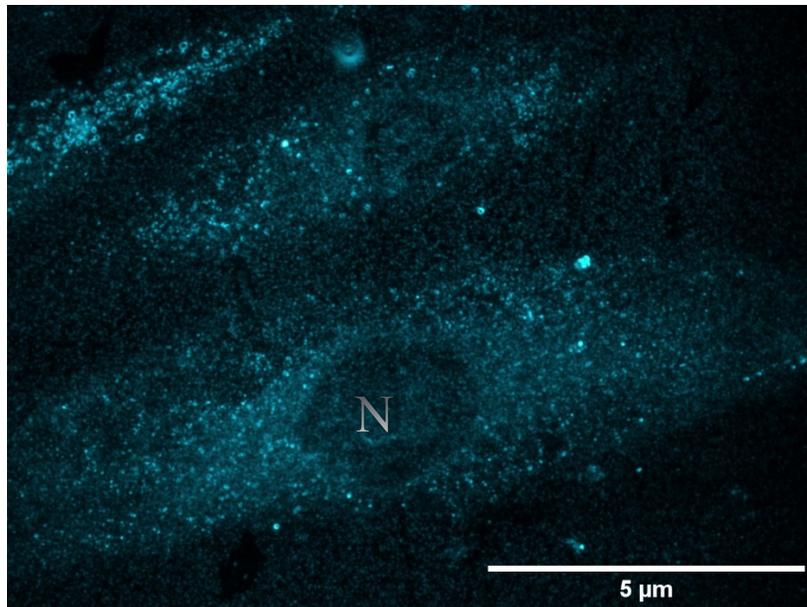


Figura 22 Expresión de factor von Willebrand (verde) dentro de los cuerpos de Weibel-Palade en citoplasma de CE venosas aisladas de paciente con aterosclerosis, por inmunofluorescencia. Núcleo (N).

### 3.3.6 Análisis de citoesqueleto de endotelio venoso sobre superficies de NTs por inmunofluorescencia.

Con el objetivo de evaluar el fenotipo, morfología y las condiciones generales de las CE aisladas de vena femoral superficial de paciente con aterosclerosis, se realizó tinción con faloidina fluorescente para F-actina, con vinculina fluorescente y con DAPI para DNA de doble cadena en células cultivadas sobre superficies sin anodizar como control y anodizadas a 24 h.. La vinculina es una proteína de adhesión focal presente en las uniones célula-célula y célula- matriz (84). A las 24 h de cultivo se observaron en ambas superficies de Ti6Al4V (lisa y con NTs), la presencia de CE adheridas, de morfología alargada con la formación de uniones intercelulares y la presencia de fibras de estrés bien definidas (Fig. 23 y 24). Las CE sobre superficies de nanotubos (Fig. 24) presentan una mayor cantidad de uniones intercelulares en comparación a las superficies lisas (Fig. 23). Las fibras de estrés de actina están mejor definidas en las superficies con NTs (Fig. 24) al compararse con las superficies lisas (Fig. 23). La morfología celular sobre los nanotubos es poligonal (Fig. 24) y sobre la superficie lisa es más alargada (Fig. 23). En la figura 24 se puede observar que los NTs

estimulan la expresión y convergencia de vinculina con la actina entre las CE, mientras que en las superficies lisas la expresión esta reducida como se puede apreciar en la magnificación (Fig. 23). La extensión celular y las uniones intercelulares son necesarias para formar la monocapa celular que se requiere en la reendotelización. Las fibras de estrés se desarrollan en células no musculares, son estructuras de actinmiosina y están asociadas a migración celular y morfogénesis (82).

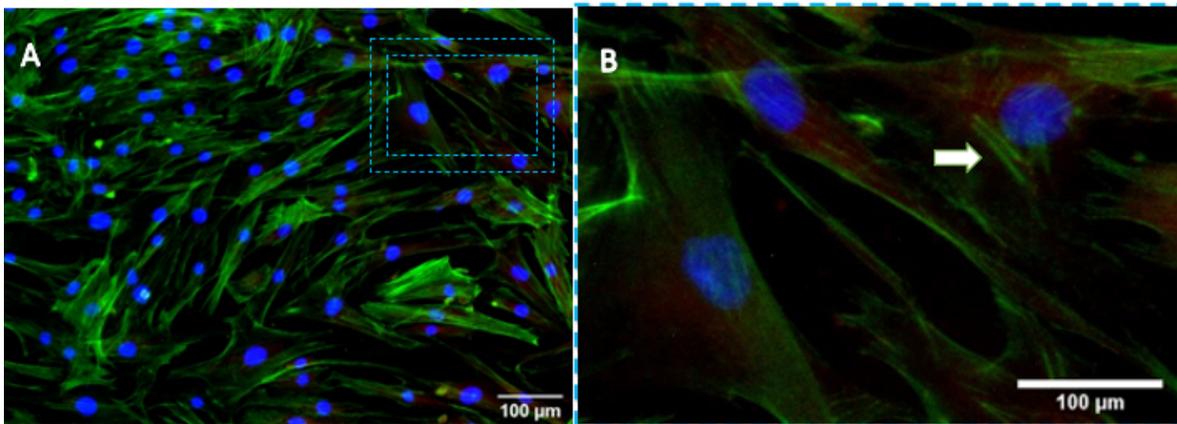


Figura 23 Distribución y expresión de vinculina y faloidina en CE de vena de paciente con aterosclerosis sobre superficies Ti6Al4V sin anodizar, A. El recuadro señala la magnificación en la imagen B, la flecha señala fibras de estrés. (azul:DAPI, rojo: Vinculina, verde: Faloidina).

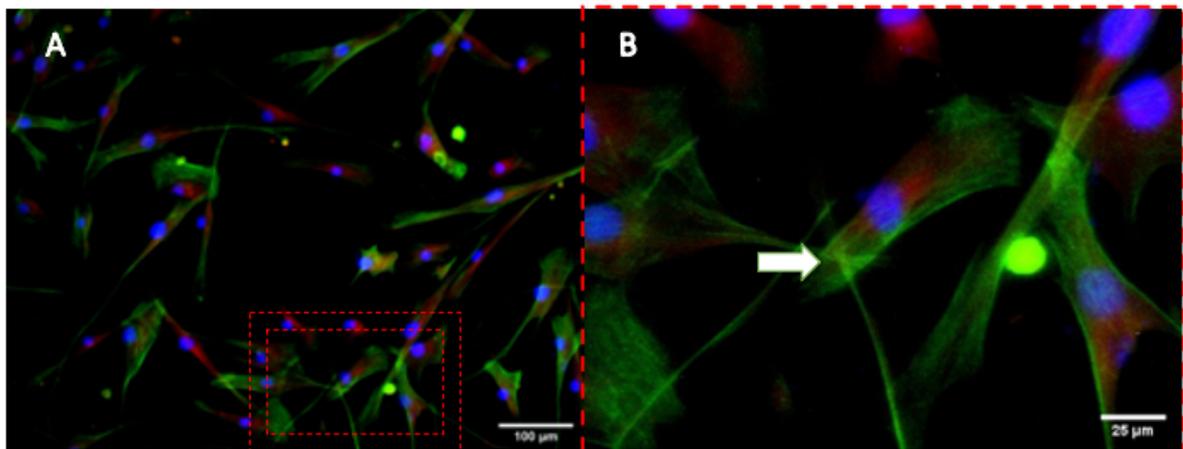


Figura 24 Distribución y expresión de vinculina y faloidina en CE de vena de paciente con aterosclerosis sobre superficies con NTs, A. El recuadro señala la magnificación en la imagen B, la flecha señala fibras de estrés. (azul:DAPI, rojo: Vinculina, verde: Faloidina).

### 3.3.7 Evaluación de viabilidad de células endoteliales

Para investigar la proliferación celular se llevó a cabo un ensayo MTT de CE de arteria y vena en cajas de 96 pozos. En donde se observó que las CE de arteria y vena cultivadas a 24 h en poliestireno presentaron una menor viabilidad y proliferación celular en comparación con las CE de vena, la diferencia fue estadísticamente significativa de acuerdo con la prueba t-student (valor p 0.0006) (Fig.25).

Se llevó a cabo otro ensayo MTT a 72 h de cultivo de células de arteria correspondientes al primer pasaje celular (Fig. 26). Los valores de absorbancia obtenidos de las CE de arteria del primer pasaje cultivados sobre superficies lisas y anodizadas a 72 h, fueron analizados con la prueba t-student, no pareada y de dos vías. Se obtuvo un valor p de 0.1308, indicando que la diferencia fue no significativa, por lo que se puede concluir que la viabilidad es igual en ambas superficies a 72 h (Fig. 26).

Cuando las células venosas llegaron al pasaje 3, se evaluó la viabilidad celular a 24 h, 72 h y 5 días de cultivo sobre superficies experimentales (Fig. 27). El componente tetrazolio del MTT es bio-reducido por las células a formazan, cuya absorbancia fue medida a una longitud de onda de 590 nm. Esta conversión es realizada por las coenzimas NADPH y NADH producidas por enzimas deshidrogenasas de células metabólicamente activas (85).

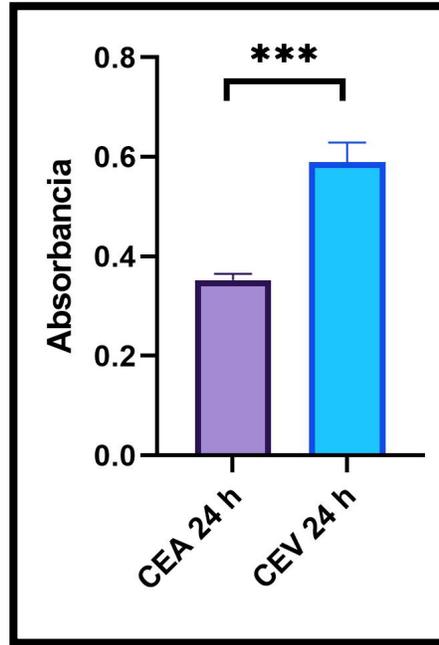


Figura 25 Viabilidad celular de células endoteliales de arteria (CEA) y vena (CEV) cultivadas en poliestireno a 24 h. (\*\*\*) valor  $p = 0.0006$ , estadísticamente significativo).

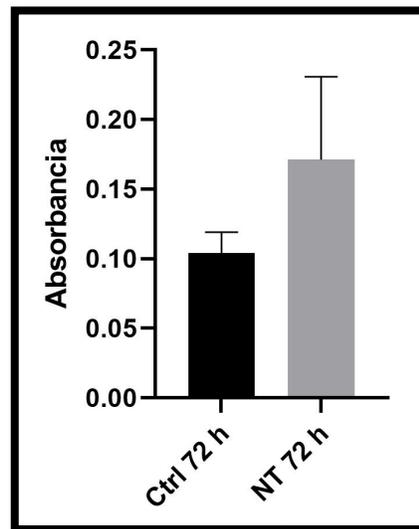


Figura 26. Viabilidad de células endoteliales de arteria cultivadas sobre Ti6Al4V y NTs a 72 h (valor  $p$  no significativo).

Los datos obtenidos de las CE de vena en el pasaje 3 fueron cultivadas a 24 h, 3 y 5 días sobre superficies lisas y anodizadas (NTs), mostraron diferencias no significativas entre el cada una de las condiciones superficiales, con valor  $p$  a 24 h de 0.1010, a 3 días de 0.1350 y

a 5 días de 0.9999 (Fig. 27). Sin embargo, se puede observar que a 24 h la proliferación celular es mayor sobre superficies de NTs.

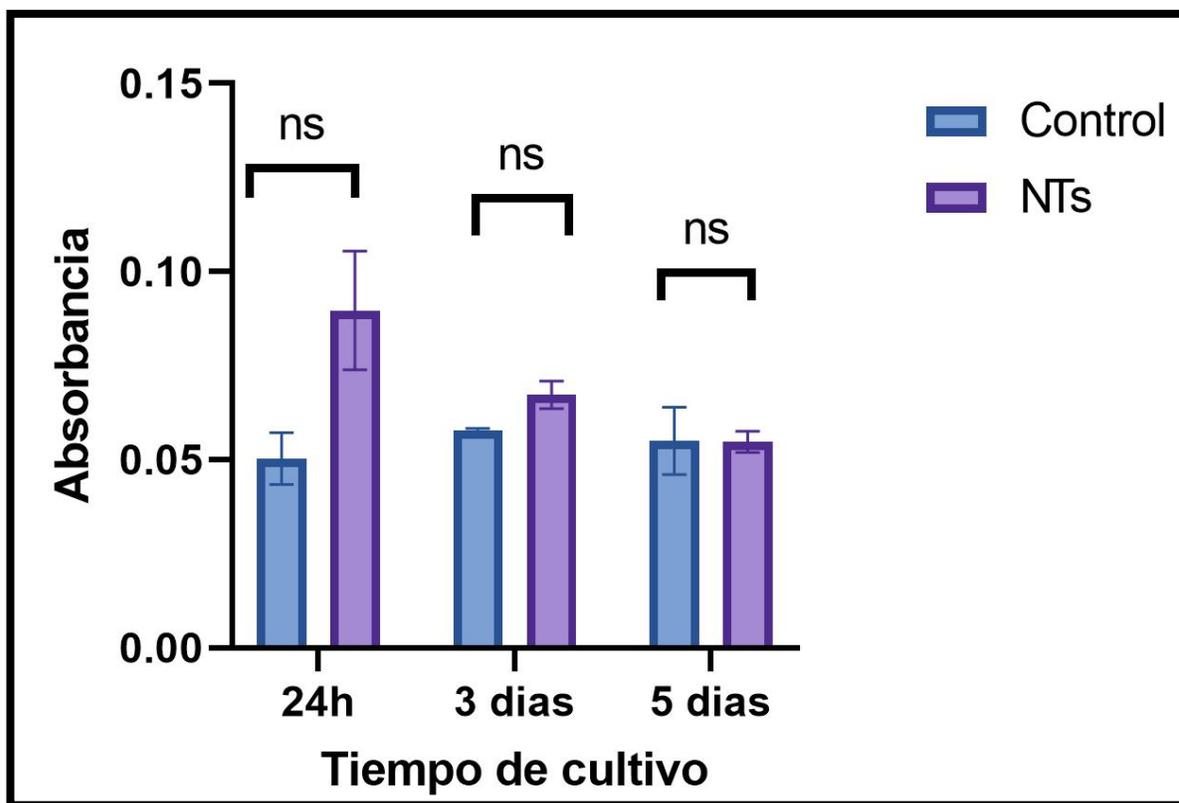


Figura 27 La proliferación celular fue evaluada por ensayo MTT. Los resultados fueron analizados con análisis de varianza de dos vías y comparaciones múltiples con Bonferroni (ns=valor p no significativo).

### 3.3.8 Viabilidad mitocondrial de células endoteliales de vena.

Con el objetivo de complementar el análisis de viabilidad por ensayo MTT se realizó el estudio de viabilidad mitocondrial con Mito Tracker, por medio de análisis de fluorescencia. Se cultivaron CE de vena sobre las superficies a 24 h. El MitoTracker tiñe las mitocondrias de células vivas y su acumulación depende del potencial de membrana. Se observó menor intensidad de fluorescencia en las superficies control (Fig. 28A y 28B) cuando se comparan con las superficies anodizadas (28C y 28D). Se encontraron diferencias significativas entre ambas superficies con un valor p de 0.0016 (Fig. 29). Estos resultados indican una mayor funcionalidad mitocondrial en CE venosas cultivadas sobre las superficies con NTs a 24 h de cultivo.

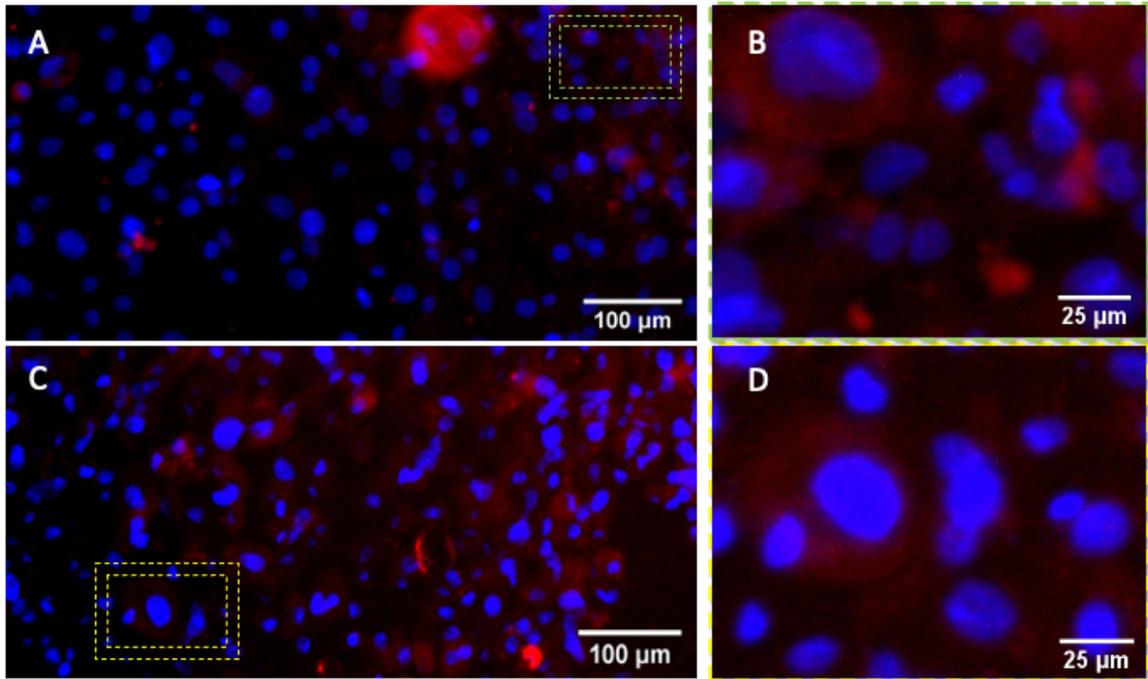


Figura 28 Micrografías de inmunofluorescencia con MitoTracker que tiñe las mitocondrias en CE de vena vivas (rojo), se muestran los núcleos en azul (DAPI). Corresponden a imágenes panorámicas de superficies control en A y la magnificación del recuadro en B, de las superficies de NTs en C y D la magnificación del recuadro.

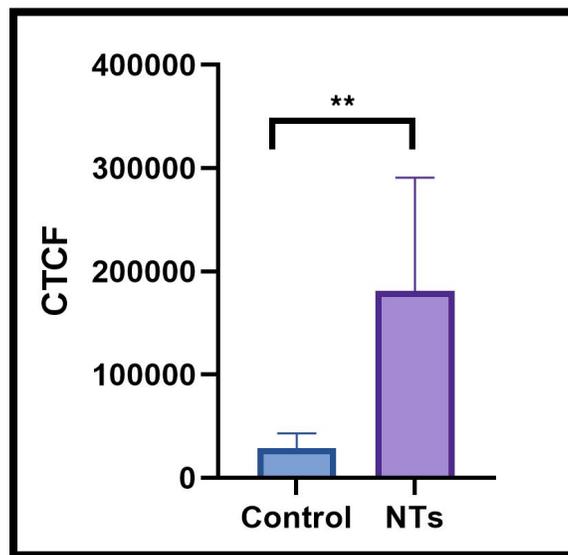


Figura 29 Intensidad de fluorescencia de Mito Tracker de CEV cultivadas sobre superficies sin anodizar y con NTs a 24h, Fluorescencia celular total corregida (CTCF) de CE individuales cuantificadas con el software ImageJ. Las CE crecen sobre ambas superficies, pero en mayor cantidad sobre los NTs. Resultados representados con medias  $\pm$  SD (n=20,  $p < 0.05$  control vs NTs).

### 3.5 DISCUSIÓN

La disfunción de CE que comprende todos los cambios mal adaptativos del fenotipo funcional de la CE (multifactoriales, localizados y sistémicos, agudos y crónicos), es asociada a la enfermedad cardiovascular aterosclerótica. Los estímulos fisiopatológicos de la disfunción de CE pueden ser hipercolesterolemia, diabetes, síndrome metabólico, hipertensión, desequilibrio de las hormonas sexuales (menopausia), envejecimiento, estrés oxidativo, citoquinas inflamatorias (ej. IL-1, TNF), agentes infecciosos, toxinas ambientales (contaminación, tabaquismo) y fuerzas hemodinámicas (86). Todos los pacientes participantes en esta investigación presentaban diabetes mellitus, hipertensión y la mayoría tabaquismo positivo. Otro dato que se debe considerar es que la ciudad de Mexicali cuenta con el medio ambiente más contaminada del país debido a la gran actividad industrial en la zona urbana y actividad agrícola en el Valle de Mexicali. Además, todos los pacientes eran mayores de 47 años, por lo tanto, ya presentaban signos de envejecimiento. Por todo lo anterior es esperado el desarrollo de la enfermedad vascular aterosclerótica en todos los pacientes. Con esto podemos sugerir que los pacientes presentaban disfunción de CE.

El estudio histopatológico de uno de los pacientes del estudio demostró la presencia de placa de ateroma con calcificación en la túnica media, mostrando específicamente esclerosis Mönckeberg. Este trastorno se reporta en el 70% de los casos de enfermedad vascular periférica (EVP) (87), los pacientes participantes en este estudio estaban diagnosticados con EVP. Además, la esclerosis de Mönckeberg se asocia con aumento de la morbimortalidad y es frecuente en pacientes diabéticos (77), todos los pacientes eran diabéticos.

Las CE son un tipo celular ampliamente utilizado en la investigación de biomateriales, son muy diversas, en principio pueden ser arteriales o venosas y son órgano-específicas a nivel microvascular (4). A pesar de la heterogenicidad molecular y funcional de las CE, más del 60% de las publicaciones acerca de las interacciones endotelio-biomaterial han sido con CE de vena umbilical humana (HUVECs) (4). Sin embargo, las HUVECs no son el modelo ideal para usar en términos de transferencia del conocimiento hacia el área clínica, ya que no

representan a las CE de los pacientes, debido a que el endotelio umbilical está expuesto a altas concentraciones de oxígeno comparado con venas en otros órganos, lo que afecta sus funciones celulares, tales como, proliferación, quimiotaxis y tubulogénesis (88). En la presente investigación se utilizó un modelo de estudio con CE aisladas de paciente con aterosclerosis y diabetes mellitus tipo 2, por lo que se representa un modelo que brinda mayor información y certidumbre acerca de las condiciones reales del comportamiento biológico de dichas células hacia el biomaterial.

Las HUVEC forman una monocapa confluyente funcional en un periodo de 11 días, mientras que las CE arteriales necesitan 28 días (89). En este estudio se alcanzó la confluencia de las CE aisladas de arteria y vena femoral superficial a los 19 y 28 días, respectivamente. Además, en un estudio realizado con CE aisladas de vena safena de pacientes con DM no insulino dependiente o tipo 2 y de pacientes sanos, demuestran que las CE de pacientes con DM presentan crecimiento celular retardado y se encuentran en estado basal activado o proinflamatorio, con alta expresión de moléculas de adhesión, como e-selectina, VCAM-1 e ICAM-1, mayor producción de IL-6 y de proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1 (MCP-1) al compararse con CE de individuos sanos (90). Los pacientes participantes en este estudio fueron diabéticos no insulino dependientes, por lo tanto, sus CE presentaban el fenotipo disfuncional proinflamatorio, como se observó en las micrografías de contraste de fases (ver Fig. 16).

La heterogenicidad de las CE es genética y epigenéticamente determinado, en forma adicional está influenciado por el microambiente extracelular. Como resultado el fenotipo que las CE adopten está influenciado por el órgano en el que estén localizadas, por el segmento al que pertenezcan en el árbol vascular y por las células adyacentes (4). Variando en morfología y orientación, así como en continuidad o fenestración de la capa vascular, permeabilidad, expresión genética, síntesis y secreción de proteínas hemostáticas, susceptibilidad a “shear” estrés (tensión que ejerce la columna de sangre sobre la pared endotelial en forma tangencial) y potencial angiogénico (91). Las células aisladas de vasos femorales superficiales del mismo paciente con aterosclerosis fueron de arteria y vena, y de la macrovasculatura, por lo que su función y características eran distintas.

Existe evidencia de que el fenotipo de las CE cambia cuando son cultivadas *in vitro* (92). Las CE pierden su capacidad proliferativa y alteran su morfología y expresión de proteínas, tales como IL-1 $\alpha$ , ICAM-1 y eNOS, durante el subcultivo *in vitro*. Conforme se prolonga la duplicación de la población van incrementando el número de células senescentes o en fase 0 del ciclo celular. Este fenómeno es inducido principalmente por decaimiento de la actividad telomerasa, que conduce a un acortamiento de los telómeros, estrés oxidativo y daño al DNA. La velocidad de acortamiento de los telómeros difiere en los tipos de CE, ocurren en forma más rápida en CE de arteria ilíaca comparadas con CE de arteria mamaria interna y prácticamente ausente en CE progenitoras (92). En el estudio conforme se realizaban los pasajes se observó aumento de tiempo necesario para alcanzar la confluencia, las CE de arteria con aterosclerosis solo alcanzaron el pasaje 2 y las de vena, del mismo paciente, el pasaje 4, posteriormente ya no proliferaron. Con esta información se puede proponer que la aterosclerosis afecta la proliferación de las CE, y que la mayor parte de ellas están en senescencia.

Las CE de vena aisladas del paciente con aterosclerosis presentaron gran cantidad de vWF en citoplasma, lo cual es característico de las CE. En estudios realizados en ratones se asocia el vWF derivado de CE, y no el derivado de plaquetas, con exacerbación de la aterosclerosis, ya que promueve la inflamación vascular (31). Varios estudios sugieren que además de la inflamación vascular, la hipercoagulabilidad también contribuye a la fisiopatología de la aterosclerosis (93). Sin embargo, es necesario realizar más estudios en humanos para clarificar la influencia del vWF en el desarrollo de la aterosclerosis, ya que los pacientes con deficiencia de vWF no presentan un efecto ateroprotectivo, pero es importante resaltar que estos estudios se han realizado en pacientes con una edad promedio de 35 años (94).

Las aplicaciones vasculares de los biomateriales incluyen sustitución completa de un vaso, puentes vasculares (bypass) y colocación de endoprótesis. En todos éstos casos el biomaterial entrará en contacto directo con las CE. Como ya se ha mencionado, la mayoría de los estudios se hacen con HUVECs y algunos con CE aisladas de pacientes, esto puede influir en forma importante en función de si el donador está sano o enfermo y la influencia en la edad del

donador (95). Por lo que es necesario un modelo de estudio con CE apropiadas y bajo condiciones más reales. En el presente estudio la utilización de CE aisladas de pacientes con aterosclerosis sobre superficies nanoestructuradas, permite predecir con mayor exactitud su resultado *in vivo*, con el objetivo de disminuir la divergencia entre los hallazgos *in vitro* y la realidad clínica.

Las ventajas que ofrece un cultivo primario de CE es que los resultados reflejarán más la realidad acerca de su comportamiento proliferativo y angiogénico frente a biomateriales, son de bajo costo en relación a una línea celular, pero son poco eficientes, es decir, se logran obtener pocas células. Cuando son células obtenidas de tejidos frescos, como en esta investigación, existe mayor variabilidad genómica y bioquímica. Además, existe variabilidad de donador a donador (edad, sexo, antecedentes patológicos). Una ventaja que ofrece este tipo de estudio es que al ser CE de un sitio específico aporta información específica acerca de su comportamiento, pero reduce la comparabilidad (4). Por lo tanto, no es posible comparar el comportamiento de las células aisladas de arteria femoral con las aisladas de vena femoral del mismo paciente. En principio, su origen es distinto (vena y arteria), son anatómicamente distintas, al igual que su función, la arteria resiste mayor presión sanguínea, lleva oxígeno y nutrientes y la vena menor presión y lleva productos de desecho. La arteria presentaba placas de ateroma y la vena no. Por lo que el comportamiento de las CE aisladas y cultivadas sobre superficies nanoestructuradas fue muy distinto, los ensayos MTT o pruebas de viabilidad demostraron mayor sobrevivencia de las CE venosas que las CE arteriales cuando fueron sembradas en poliestireno a 24 h. Esto puede ser indicativo de la importante disfunción endotelial que presentaban las CE arteriales y que es causa y consecuencia del aterosclerosis.

El uso de Ti es común en el área biomédica para la fabricación de prótesis, modificaciones en su superficie que generan capas de  $TiO_2$  con diferentes configuraciones y nanotexturas. Estas modificaciones han sido sugeridas para recubrir las endoprótesis vasculares y mejorar la biocompatibilidad para que promueva una respuesta celular deseable (96). Esto se debe a que la nanotopografía puede llegar a mimetizar el microambiente de la matriz extracelular de la vasculatura, dando un mejor soporte al proceso de endotelización que las superficies lisas

tradicionales (60). En especial los nanotubos de  $\text{TiO}_2$  son los que han sido más explorados para aplicaciones biomédicas. En un estudio realizado por Bencina, se menciona que las superficies nanoestructuradas de  $\text{TiO}_2$  proporcionan una adecuada endotelización que evita la agregación plaquetaria o trombosis; además, sugieren estas superficies inhiben la adhesión y proliferación de células musculares lisas. Fenómeno asociado a la reestenosis después de la colocación de la endoprótesis (97). Sin embargo, dicho estudio fue realizado con líneas celulares comerciales y no de pacientes con aterosclerosis, que finalmente serán a quienes se les implantarán las endoprótesis, un factor fuertemente importante en el que este estudio proporciona novedoso conocimiento en la caracterización y función de NTs para aplicaciones vasculares.

Debido a que la endotelización de las endoprótesis depende fuertemente de los fenómenos de adherencia, migración y proliferación de las CE, estas propiedades celulares son las más estudiadas *in vitro* (98). Las CE reaccionan a señales nanotopográficas, la extensión de su reacción depende del origen que tenga la CE (arterial o venosa, macro o microvasculatura). En las imágenes comparativas obtenidas por SEM y la inmunofluorescencia del citoesqueleto de células endoteliales aisladas de vena femoral superficial de paciente con aterosclerosis cultivadas sobre las superficies, revelan que las células endoteliales desarrollan con el tiempo filopodias delgadas y largas a lo largo de la topografía nanorugosa indicando que las superficies anodizadas proveen un sustrato que favorece el anclaje de las células para que éstas se unan y tengan mayor motilidad durante el estado proliferativo (49). Las filopodias están involucradas en numerosos procesos celulares tales como adhesión a la matriz extracelular, guía celular hacia quimioatrayentes y migración celular (24). Estudios previos demuestran que las superficies con micropatrones favorecen la migración de células endoteliales en mayor grado que las superficies control lisas y pulidas (99). Los resultados de este estudio indican que las superficies de NTs anodizadas facilitan la unión y movilidad de las células endoteliales de paciente con aterosclerosis, ya que estas emiten filopodias largos y delgados, en contraste con las superficies lisas que generaron filopodias cortas y numerosas lo que nos indica mayor rigidez en la periferia celular, es decir, menor viscoelasticidad (100).

Posterior a la endotelización, la migración celular sobre la superficie de la endoprótesis es necesaria para la reparación tisular y remodelación vascular después de su colocación (101). En un estudio realizado por Ter Meer, con células aisladas de venas y cultivadas sobre superficies de endoprótesis con patrón y lisas, demuestran que los surcos o patrones de la superficie de la endoprótesis favorecen tres veces más la unión celular que las superficies lisas. También, demostraron que las superficies rugosas mantienen una mayor cantidad de células adheridas después de aplicar un flujo pulsátil de 180 ml/min durante 24 h (102). Esto demuestra que las superficies nanoestructuradas mejoran las propiedades mecánicas de las CE, tal como lo sugieren parte de los resultados de este estudio. Las imágenes SEM a 72 h sobre superficies anodizadas obtenidas, se observa una mayor cantidad de filopodias delgadas en las CE venosas, en cambio en las superficies lisas solo se observan escasos filopodias, indicando una mayor migración celular sobre la superficie nanoestructurada. Estos resultados se ven soportados con las micrografías obtenidas por inmunofluorescencia a través de la tinción de la F-actina, observándose la organización del citoesqueleto con formación de fibras de estrés, las cuales se asocian a la migración celular (82). En las CE, el reclutamiento de vinculina en las uniones célula-célula y célula-matriz extracelular, es característica de la remodelación fuerza-dependiente, dando origen a las uniones focales adherentes (FA), la función de la vinculina en estas uniones es unirse a la F-actina y fortalecer la formación de una barrera (103). En este estudio se observó por inmunofluorescencia la presencia de mayor cantidad de FA y la formación de fibras de estrés en las CE venosas cultivadas sobre los NTs, indicando que esta superficie promueve la formación de una monocapa endotelial. En ambas superficies se detectó un gran depósito de matriz extracelular, por imágenes SEM, desde las cuatro horas de cultivo de CE aisladas de vena, lo que se asocia al incremento de la fuerza de la adhesión focal por las CE (104). La síntesis elevada de matriz extracelular obedece a la actividad del citoesqueleto nuclear (105). Existe evidencia de que los NTs promueven la síntesis de matriz extracelular, mejoran la endotelización y la hemocompatibilidad de las CE (106). Sobre superficies rígidas, las células incrementan la formación de FA y una mayor organización del citoesqueleto con la formación de fibras de estrés de actina, resultando en una mayor extensión celular y una elevada fuerza de adhesión (107). Por lo tanto, las superficies de NTs promueven la adhesión y proliferación de las células aisladas del paciente con aterosclerosis.

La función celular es ampliamente determinada por su estructura. Por lo tanto, la deformabilidad celular, propiedad mecánica de organización de la estructura celular, varía en diferentes procesos fisiológicos (diferenciación celular, crecimiento y adhesión) y en estados patológicos (estrés oxidativo, infección viral) (108). La actina es un componente necesario para mantener la integridad celular, la función (polaridad de membrana, uniones estrechas, adhesión celular y transducción de señales) y también lleva a cabo cambios dinámicos en respuesta a estrés patológico y fisiológico (109). La F-actina es un componente principal del citoesqueleto, y en este estudio se observó que las CE aisladas sobre superficies anodizadas mostraron una mayor organización de la F-actina compatible con una mejor migración celular al compararlas con superficies lisas. Estos resultados sugieren que las superficies anodizadas pueden ser utilizadas en endoprótesis vasculares para pacientes con enfermedad vascular periférica, por su biocompatibilidad y habilidad para soportar el crecimiento celular endotelial, pero que por tratarse de pacientes con aterosclerosis y diabéticos, existe disfunción endotelial, lo que aumenta el riesgo de presentar complicaciones como reestenosis, trombosis y neoaterosclerosis. Es necesario realizar más estudios con CE aisladas de pacientes, aunque es complicado por la implicación bioética requerida en estudios de esta naturaleza, sobre superficies nanoestructuradas y funcionalizadas con factores de crecimiento como VEGF o previamente endotelizados.

Los resultados obtenidos en el ensayo MTT y con MitoTracker indican una mayor viabilidad de las CE venosas sobre superficies de NTs cuando se comparan con lisas a 24 h, y una mayor funcionalidad mitocondrial reflejada por un apropiado potencial de membrana. El daño endotelial mitocondrial se asocia a aumento de ROS, en los pacientes con aterosclerosis existe un aumento de ROS en respuesta al aumento de oxidación de lípidos o lipoproteínas oxidadas (oxLDL), lo que conduce a disfunción endotelial (110).

Un campo de innovación que ofrece este estudio es que se pueden evaluar las superficies nanoestructuradas con agentes bioactivos asociados al crecimiento endotelial. En un estudio realizado por Bai en 2019, utilizan NTs funcionalizados con Silicón, sus resultados muestran que estimula la proliferación temprana de CE sin afectar sus funciones nativas en

comparación con los NTs sin funcionalizar. También, inducen la secreción de VEGF y NO, y disminuyen la respuesta inflamatoria al promover la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M2, promoviendo la autofagia y la secreción de factores de crecimiento como VEGF por parte de los macrófagos (62). Estos hallazgos demuestran que la combinación de NTs con elementos biológicos es una buena estrategia para promover la recuperación de la funcionalidad de las CE sobre las superficies de las endoprótesis y disminuir el desarrollo de complicaciones a largo plazo como la reestenosis y la trombosis.

Con base a los resultados discutidos, se recomienda que es necesario llevar a cabo más estudios con CE procedentes de pacientes con diabetes, con y sin aterosclerosis y exponerlas a flujo dinámico para simular condiciones *in vivo*. También es necesario realizar estudios a largo plazo *in vitro* con diversas superficies nanoestructuradas y con materiales bioactivos asociados al crecimiento de endotelio.

## CAPÍTULO 4

### Modulación de la respuesta inflamatoria de macrófagos murinos RAW 264.7 en superficies de NTs con tres tratamientos de esterilización.

#### 4.1 ESTADO DEL ARTE

Los macrófagos son células que se encuentran en todos los tejidos y compartimentos del cuerpo humano en condiciones fisiológicas. Se les considera integrantes del sistema fagocítico mononuclear, y varían según el tejido en donde se localicen y según las funciones que realicen (111). La función común de todos los macrófagos es la fagocitosis y son un componente esencial de la inmunidad innata. Los macrófagos se pueden originar a partir de los monocitos circulantes, o de los macrófagos tisulares específicos (ej. microglia en sistema nervioso, células de Kupffer en hígado) (112). Los macrófagos son células con mucha plasticidad que forman parte del sistema de defensa del huésped, reparación de heridas y regulación inmune. Para realizar estas funciones, los macrófagos se polarizan hacia diferentes fenotipos en respuesta a señales del microambiente. Los macrófagos pro-inflamatorios o M1 típicamente expresan el marcador de superficie receptor de quimioquinas CC-7 (CCR7), secretan citoquinas pro-inflamatorias como IL-1 y expresan el óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). En contraste, en un ambiente que propicia la reparación tisular, producen mediadores anti-inflamatorios, y adquieren un fenotipo conocido como M2 (113), que se caracteriza por la expresión del marcador CD206 (receptor de manosa de los macrófagos), producen citoquinas como IL-4, IL-10 y arginasa-1 que resuelven la inflamación (114).

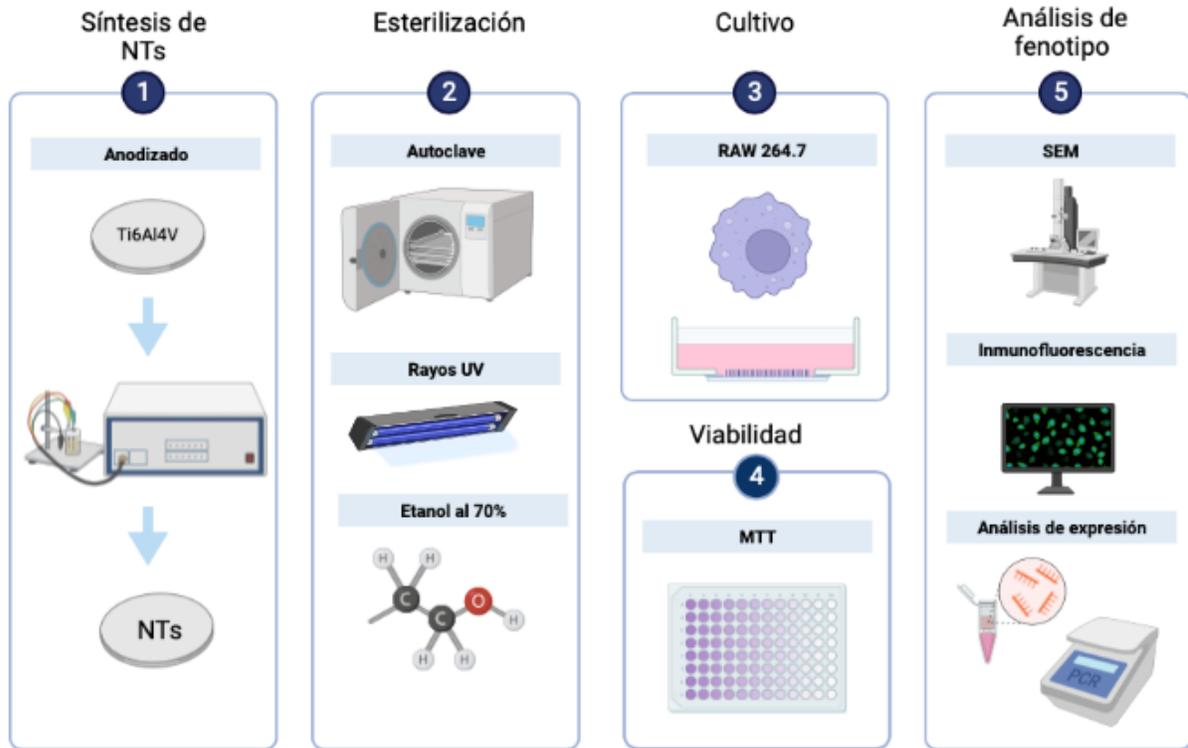
La inflamación es un paso inevitable cuando se coloca un implante quirúrgicamente, como una endoprótesis vascular. El implante será tratado como un cuerpo extraño, provocando una respuesta inflamatoria. Esta inflamación es mediada por la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M1 o proinflamatorio. Sin embargo, cuando esta respuesta inflamatoria es prolongada puede conducir a fibrosis alrededor del implante. Por lo tanto, la presencia de monocitos/macrófagos en el sitio del implante determina si el implante será integrado o rechazado (115). Existe evidencia creciente de que las características de la superficie y su humectabilidad, pueden influenciar la polarización de los macrófagos (116). La superficies

de Ti nanoestructuradas inducen la elongación y la expresión de marcadores fenotípicos asociados a macrófagos anti-inflamatorios M2 o promotores de la reparación tisular (117). Además, se ha demostrado que los NTs de 70 a 80 nm estimulan la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M2, mientras que los de diámetro de 30 a 40 nm promueven la liberación de citoquinas proinflamatorias compatibles con el fenotipo M1 (118). Hay evidencia de que los NTs de 80-100 nm de diámetro inducen el fenotipo pro-inflamatorio y los NTs de diámetro menor a 30 nm inducen el fenotipo anti-inflamatorio. De manera adicional se ha sugerido que los NTs de diámetro más pequeños pueden beneficiar la adhesión y proliferación de los macrófagos, mientras que los de mayor diámetro pueden reducir la respuesta inflamatoria (119). Sin embargo, existe evidencia de que el tipo de esterilización puede afectar la morfología y las propiedades químicas de las nanoestructuras y con ello la respuesta diferentes tipos de células (120). Al ser la esterilización el tratamiento final de todo implante de uso médico y los macrófagos las principales células que participan en la respuesta a cuerpo extraño, es necesario estudiar dichas células en superficies nanoestructuradas esterilizadas para determinar si el tipo de esterilización promueve alguno de los fenotipos M1 proinflamatorio asociado a fibrosis o M2 antiinflamatorio llamado también regenerativo, que está asociado a reparación tisular.

El propósito de este estudio fue determinar si el método de esterilización de la superficie anodizada tiene algún efecto inmunomodulador sobre el desarrollo de los fenotipos M1 y/o M2 de los macrófagos murinos RAW 264.7. Los tres métodos de esterilización evaluados fueron autoclave húmeda, rayos ultravioleta y etanol al 70%. Con la evaluación del comportamiento de esta línea celular en respuesta a los métodos de esterilización, se puede identificar cuál de los tres tipos de esterilización podría resultar más benéfico para uso clínico.

## 4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.2.1 Diseño de estudio



### 4.2.2 Síntesis de NTs.

La misma metodología mencionada en el capítulo 1 referente a las superficies de endotelio fue utilizada.

### 4.2.3 Métodos de esterilización de superficies de NTs

Se evaluaron tres tratamientos de esterilización de superficies de Ti6Al4V pulidas y con NTs:

- 1) Esterilización con autoclave de vapor: Las muestras fueron colocados en sobres para esterilizar, se introdujeron en el esterilizador eléctrico a vapor tipo olla (All American, 50x-120V) durante 15 min a 131°C, posteriormente las superficies se secaron a 60°C durante 24 h con el objetivo de evitar contaminación en el paquete y/o en las superficies por efecto de la humedad. Para la transferencia y manejo de las superficies se utilizaron pinzas de curación estériles.

- 2) Esterilización con rayos UV: Dentro de una campana de flujo laminar estéril y con la ayuda de unas pinzas de curación estériles las superficies fueron transferidas a caja de Petri estériles para ser expuestas a radiaciones UV durante 30 min por cada lado.
- 3) Esterilización con etanol al 70%: Con la ayuda de pinzas de curación estériles y en dentro de una campana de flujo laminar estéril, se transfirieron las superficies de a una caja de Petri con 10 ml de etanol al 70%. Después de 30 min de incubación, el etanol fue retirado, la caja de Petri fue cubierta y se dejó en la campana estéril durante 24 h hasta que el etanol se evaporara completamente de las muestras.

#### 4.2.4 Cultivo celular de macrófagos

La línea celular murina de macrófagos RAW 264.7 (ATCC) fue mantenida en medio de cultivo RPMI 1640 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA,) con SBF al 10% y antibióticos estreptomycin-penicilina (PS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) al 1%, a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%. El medio de cultivo fue cambiado cada tercer día y se realizaba pasaje con tripsina al 0.25% y espátulas tipo scrapper para cultivo celular cada vez que el cultivo alcanzaba el 80% de confluencia. Los macrófagos fueron sembrados a  $1.5 \times 10^4$  células por cm<sup>2</sup> sobre las superficies experimentales sometidas previamente a los tres distintos métodos de esterilización (autoclave, rayos UV y etanol al 70%) y colocadas con pinzas de curación estériles en cajas de cultivo de 24 pozos. Se mantuvieron en incubación a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%, después de cumplir los diferentes periodos de cultivo se procedió a preparar las muestras para análisis de viabilidad celular (MTT) y fijación para analizar adherencia y morfología por SEM.

#### 4.2.5 Análisis de morfología celular por SEM

Después de 4 h, 24 h y 4 días de cultivo de macrófagos RAW 264.7 sobre las superficies con las tres diferentes técnicas de esterilización, las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS al 1X a temperatura ambiente durante 5 min cada lavado y fijadas con glutaraldehído al 4% (p/v) (Sigma, St. Louis, MI, USA) en PBS durante 24 h a 4°C. Posterior a la fijación, las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS 1X, 15 min cada lavado. Se añadió glutaraldehído al 3% en PBS 1x nuevamente durante 2 h. Al finalizar este tiempo se lavaron 3 veces con

PBS al 1X, 10 min cada lavado. Posteriormente, se deshidrataron con etanol al 50, 75 y 100%, 30 min cada concentración (121). Se dejaron en desecador durante 24 h. Finalmente, las muestras fueron recubiertas por sputtering con oro (capa de 10 nm de oro) durante 8 s. La morfología de los macrófagos adheridos fue observada y fotografiada a un voltaje de aceleración de 5 kV.

#### 4.2.6 Evaluación de la viabilidad celular: Ensayo MTT

La viabilidad de los macrófagos cultivados sobre superficies con las tres técnicas de esterilización fue evaluada mediante ensayo MTT. Al término de los distintos periodos de incubación, 1, 3 y 5 días, las muestras fueron lavadas 3 veces con PBS 1X, 5 min cada lavado. Se añadió 0.3 ml de medio RPMI al 10% de MTT en cada pozo. Después de 3 h de incubación a 37 °C y CO<sub>2</sub> al 5%, el medio con MTT fue removido y los cristales de formazan fueron disueltos con 250 µl dimetilsulfóxido (DMSO) estéril (Sigma-Aldrich). Se dejaron en agitación continua durante 20 min y protegidos de la luz. Para cuantificar la DO fueron transferidos 100 µl de cada pozo a una placa de 96 pozos y analizados a una longitud de onda de 570 nm y a 690 nm como línea base en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan GO). Los valores de absorbancia de la línea base A (690nm) fueron sustraídos de los valores de absorbancia de A (570nm).

#### 4.2.7 Inmunofluorescencia de citoesqueleto de macrófagos RAW 264.7

Se sembraron 15,000 células/mL sobre las superficies de estudio durante 24 h en una caja de 24 pozos. Al cumplir el periodo de cultivo, la caja fue retirado, se lavaron las muestras en tres ocasiones con PBS, 5 min cada lavado. Se fijaron las células con paraformaldehído al 4% y se dejaron incubando a 37°C durante 45 min. Nuevamente se lavaron tres veces con PBS, se añadió tritón X-100 al 0.1% durante 30 min y a 37°C. Se realizaron 3 lavados con PBS y se añadió faloidina con Alexa Fluor 488 a una dilución 1:100 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en solución de bloqueo durante 45 min a temperatura ambiente y protegido de la luz para evaluar las fibras de estrés de actina. Se lavaron 3 veces con PBS, se añadió DAPI y se dejó 5 min a temperatura ambiente. Se realizaron 3 lavados con PBS y un último lavado con agua destilada durante 15 min. Las muestras fueron invertidas en cubreobjetos y se

montaron con solución de inmunofluorescencia para observarse y fotografiarse con filtro azul (DAPI) y filtro verde (fibras de actina) por medio de microscopio de fluorescencia.

#### 4.2.8 Análisis de expresión de macrófagos RAW 264.7 sembrados sobre las superficies

Se realizó el análisis de expresión génica de macrófagos RAW 264.7 cultivados sobre las superficies experimentales con los tres tratamientos de esterilización (Autoclave, UV, EOH) a 3 y 6 días de cultivo. Para ello primero se llevó a cabo la purificación de RNA y posteriormente RT-PCR con oligos relacionados a M1 (iNOS y CCR7), el análisis de expresión génica fue normalizado con el gen constitutivo de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Las secuencias de oligonucleotidos utilizados se muestran en la tabla 3. Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Como control positivo para fenotipo M1 se purifico RNA de macrófagos RAW 264.7 con una confluencia del 60 a 80%, estimulados con lipopolisacáridos (LPS) a una concentración de 100 ng/mL durante 24 h.

<b>Gen</b>	<b>Forward 5' to 3'</b>	<b>Reverse 5' to 3'</b>
CCR7	TGTACGAGTCGGTGTGCTT	GGTAGGTATCCGTCATGGTCTT
iNOS	GAGCCACAGTCCTCTTTGCTA	TGTCACCACCAGCAGTAGTTG
GAPDH	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTAGGAACA
CD206	CTCTGTTTCAGCTATTGIGACGC	CGGAATTTCTGGGATTCAGCTTC

CCR7: receptor de quimioquinas tipo 7; iNOS: óxido nítrico sintasa inducible; GAPDH: gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa.

*Tabla 3 Pares de oligonucleotidos utilizados para análisis de expresión génica*

1. *Purificación de RNA:* Los macrófagos RAW 264.7 fueron cultivados a  $1 \times 10^5$  células por superficie en caja de cultivo de 24 pozos, una vez adheridas las células se añadió RPMI completo y se dejaron incubando a 37°C y CO<sub>2</sub> al 5% a 3 y 6 días. Posteriormente, se realizó la extracción de RNA total con reactivo TRIzol (Invitrogen, USA), se añadieron 400 µl a cada pozo con 400 µl de medio RPMI completo (1:1) y se dejó incubando a temperatura ambiente durante 5 min. Se recuperó el medio más TRIzol en un tubo eppendorf estéril y se agregaron 80 µl de cloroformo, se agitó en vortex 10 segundos y se centrifugó a 13,000 rpm durante 10 min. Se obtuvieron dos fases una acuosa y una

orgánica (rosa), se tomó con cuidado la fase acuosa la cual fue añadida a otro tubo eppendorf estéril con 550  $\mu\text{l}$  de isopropanol (ACS) frío, se dejó precipitar a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 24 h. Cumplido el periodo se centrifugó cada muestra durante 40 min a 13000 rpm a  $4^{\circ}\text{C}$ , se decantó el isopropanol y se añadió a cada tubo 400  $\mu\text{l}$  de etanol al 75% (v/v), se invirtió cada tubo 15 veces y se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min. Finalmente se decantó y se dejó secar a temperatura ambiente durante 15 min, una vez evaporado el etanol se añadieron 20  $\mu\text{l}$  de agua libre de nucleasas (ALN) y se resuspendió cada muestra 100 veces. Para verificar la integridad del RNA total se realizó electroforesis en gel de agarosa al 1% (grado biotecnología VWR Life Science), se cuantificó cada muestra en espectrofotómetro (UV/Vis BioDrop DUO PC) y se observó la relación 260/280 nm para verificar la pureza (se consideró aceptable a partir de 1.8). Con el objetivo de evitar falsos positivos se eliminó todo el DNA genómico por medio de la enzima DNAsa Turbo (INVITROGEN)  $2\text{U}/\mu\text{L}$ , cada muestra de RNA purificado se llevó a un volumen total de 20  $\mu\text{L}$  por reacción (15  $\mu\text{L}$  de muestra, 2  $\mu\text{L}$  de ALN, 1  $\mu\text{L}$  de DNAsa y 2  $\mu\text{L}$  de buffer para DNAsa 10X). Se dejó incubando 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ , y se realizó una segunda purificación para inactivar a la DNAsa.

2. *RT-PCR cuantitativa*: Un total de 200 ng de RNA de cada muestra purificada fueron tomados para un volumen final de reacción de 10  $\mu\text{L}$  por tubo de reacción, con la enzima iTaq Universal SYBR Green One Step kit (BIO-RAD, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, 5  $\mu\text{L}$  de iTaq universal SYRGreen (1x), 0.125  $\mu\text{L}$  (1x) de RT scripT, oligos F y R 0.3  $\mu\text{L}$  de cada uno (300 nM) y ALN. Se llevó a cabo la amplificación con las siguientes condiciones de reacción de transcripción reversa (RT) a 10 min, a  $50^{\circ}\text{C}$ , desnaturalización del DNA y activación de la polimerasa 1 min a  $95^{\circ}\text{C}$ , 40 ciclos de amplificación (desnaturalización 10 s a  $95^{\circ}\text{C}$ , alineación y extensión 60 s a  $60^{\circ}\text{C}$ ). Para evitar falsos positivos cada reacción se repitió suprimiendo el paso de la RT en el termociclador (BIORAD, CFX-96) para cada uno de los pares de oligos.

#### 4.2.9 Análisis estadístico

La significancia estadística fue determinada utilizando el análisis de varianza de una vía (ANOVA), con comparaciones múltiples de Tukey. Una probabilidad  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo.

## 4.3 RESULTADOS

### 4.3.1 Pruebas de viabilidad (ensayos MTT)

Los resultados de actividad metabólica no indicaron cambios significativos, lo que sugiere que no hay cambios en la actividad proliferativa en los tratamientos de esterilización (Fig. 30). Sin embargo, los macrófagos cultivados a 5 días sobre superficies esterilizadas con autoclave presentan una menor viabilidad celular al compararse con los otros dos métodos.

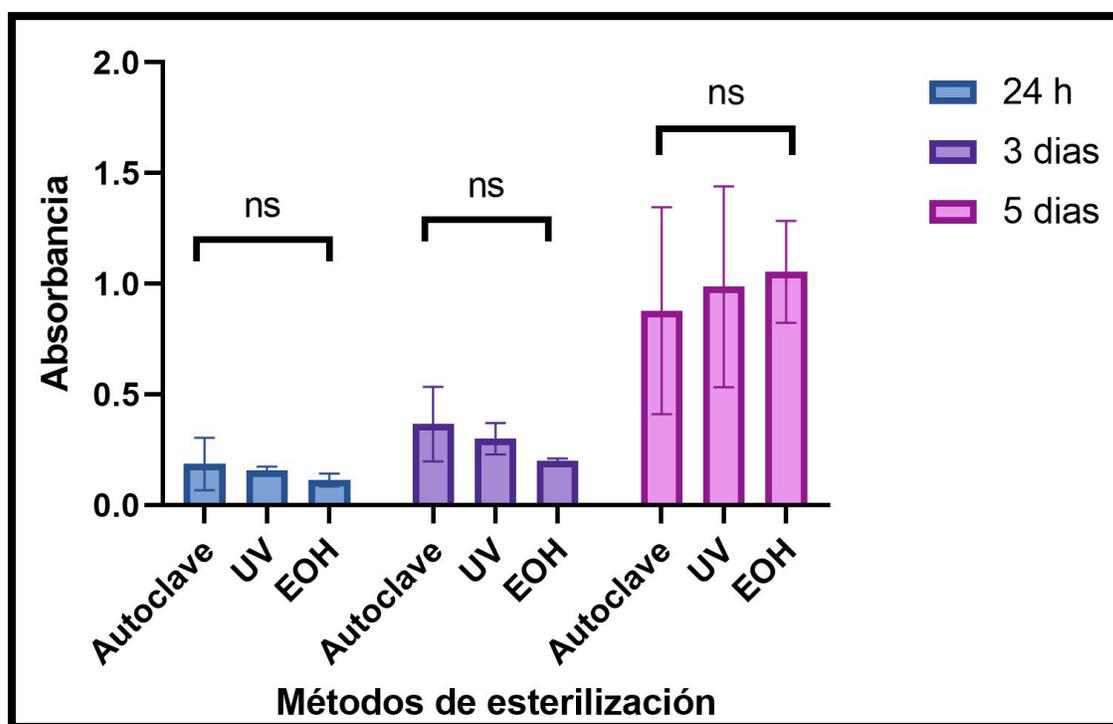


Figura 30 Resultados ensayo MTT de macrófagos RAW 264.7 cultivados sobre superficies de TiO<sub>2</sub> esterilizadas con los tres métodos. Los resultados fueron no significativos (ns) para un valor  $p < 0.05$ .

### 4.3.2 Adherencia y morfología de los macrófagos RAW 264.7 sobre las superficies

La polarización de los macrófagos RAW 264.7 en respuesta a las superficies de NTs de TiO<sub>2</sub> con los tres métodos de esterilización fue investigada. Se conoce que la polarización de los

macrófagos tiene un claro impacto sobre la morfología celular, por lo que los macrófagos M1 son redondeados mientras que los M2 poseen forma de huso (122).

A las 4 h de cultivo se puede observar por SEM, que existe una menor proliferación de los macrófagos RAW 264.7 sobre las superficies de NTs esterilizadas con autoclave (Fig. 31, inciso a), a diferencia de las superficies esterilizadas con rayos UV (Fig. 31 inciso b) y con etanol (Fig. 31 inciso c) las cuales muestran una mayor proliferación. A mayor magnificación se pueden observar signos de adherencia a través de prolongaciones citoplásmicas y de filopodias de los macrófagos sobre las tres superficies tratadas con los distintos métodos de esterilización (Fig. 32). Sin embargo, en las superficies tratadas con autoclave, los macrófagos RAW 264.7 muestran filopodias cortas indicando una menor fuerza de interacción de las células con la superficie (Fig. 32). En las superficies esterilizadas con rayos UV y etanol al 70%, las células parecen interactuar más estrechamente unas con otras así como con la superficie, observando filopodias más largas y delgadas (Fig. 32). Esto indica que cuando las superficies son esterilizadas con autoclave disminuye la adherencia y proliferación de los macrófagos. La morfología es circular en todas las superficies demostrando una morfología celular acorde con el fenotipo M1.

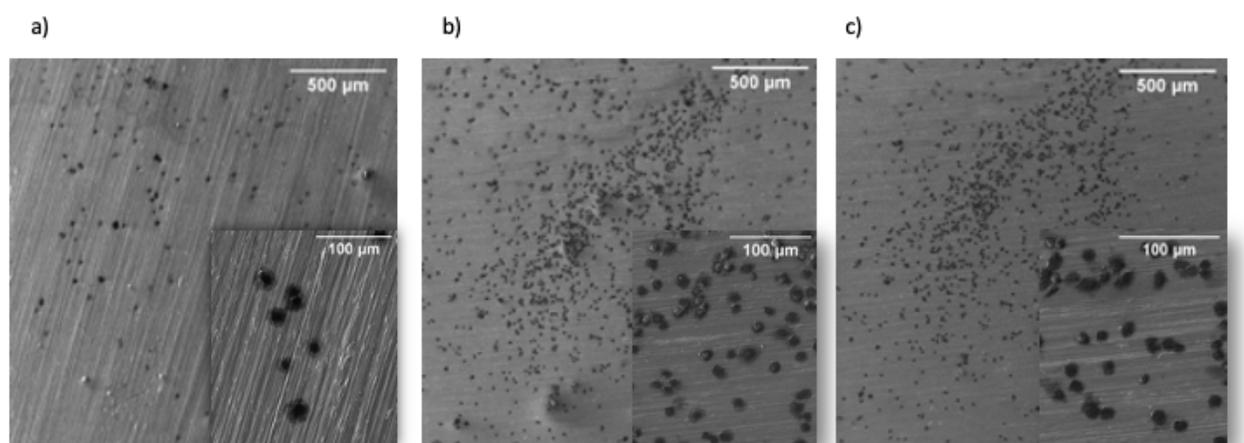


Figura 31. Micrografías SEM de macrófagos RAW 264.7 cultivados a 4 h sobre superficies anodizadas de TiO<sub>2</sub> esterilizadas con tres métodos distintos: a) Autoclave, b) Rayos UV, c) Etanol al 70%.

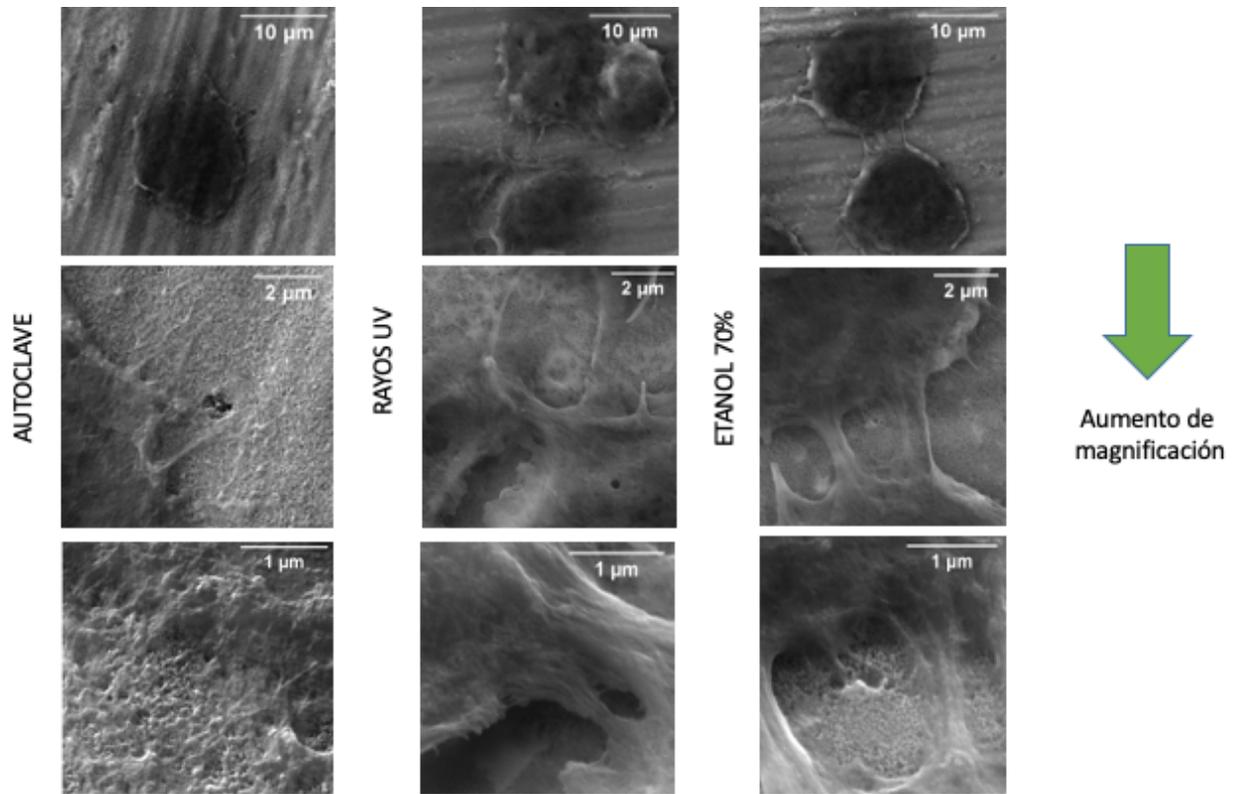


Figura 32 Micrografías SEM de macrófagos RAW 264.7 cultivadas a 4 h sobre superficies de NTs esterilizadas con tres métodos de esterilización distintos, que muestran filopodias de magnificación ascendente de arriba hacia abajo.

Los macrófagos cultivados a 24 h sobre NTs tratados con autoclave presentan menor proliferación (Fig. 33 inciso a) cuando se comparan con rayos UV (Fig. 33 inciso b) y etanol (Fig. 33 inciso c), como se observa por SEM. Las filopodias son escasas y de mayor grosor en las superficies con autoclave (Fig. 34). Los macrófagos en superficies con rayos UV presentan mayor número de filopodias y son más elongadas (Fig. 34, imágenes del centro). En las superficies con etanol se observa una mayor interacción celular (Fig. 34). La morfología circular de los macrófagos se observa claramente en la superficie con etanol (2I), a diferencia de autoclave y rayos U.V. mostrando una morfología con espículas en los bordes (Fig. 34, imágenes inferiores).

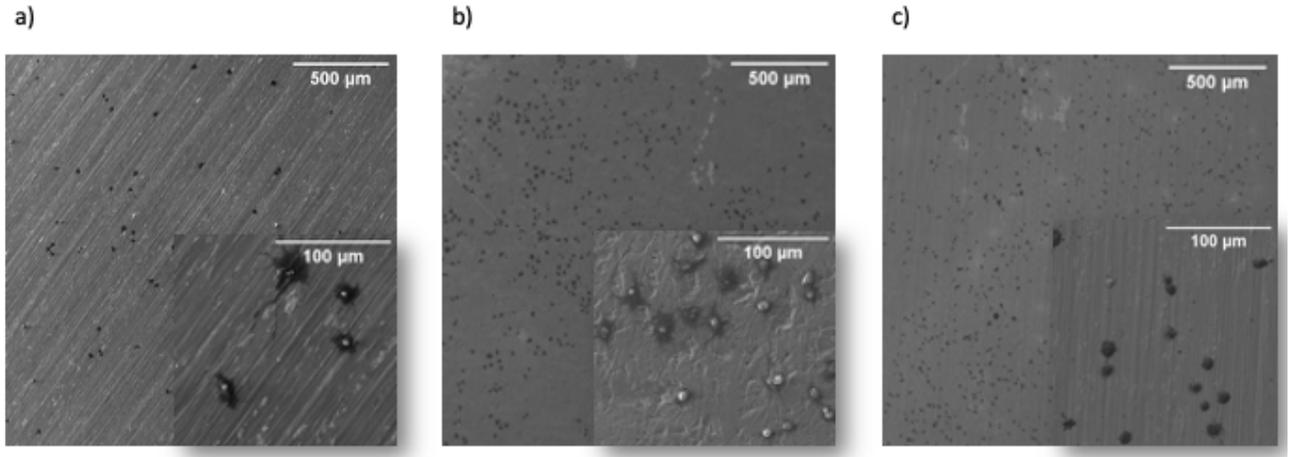


Figura 33 Micrografías SEM de macrófagos RAW 264.7 cultivados a 24 h sobre superficies de NTs esterilizadas con tres métodos distintos: a) Autoclave, b) Rayos UV, c) Etanol al 70%.

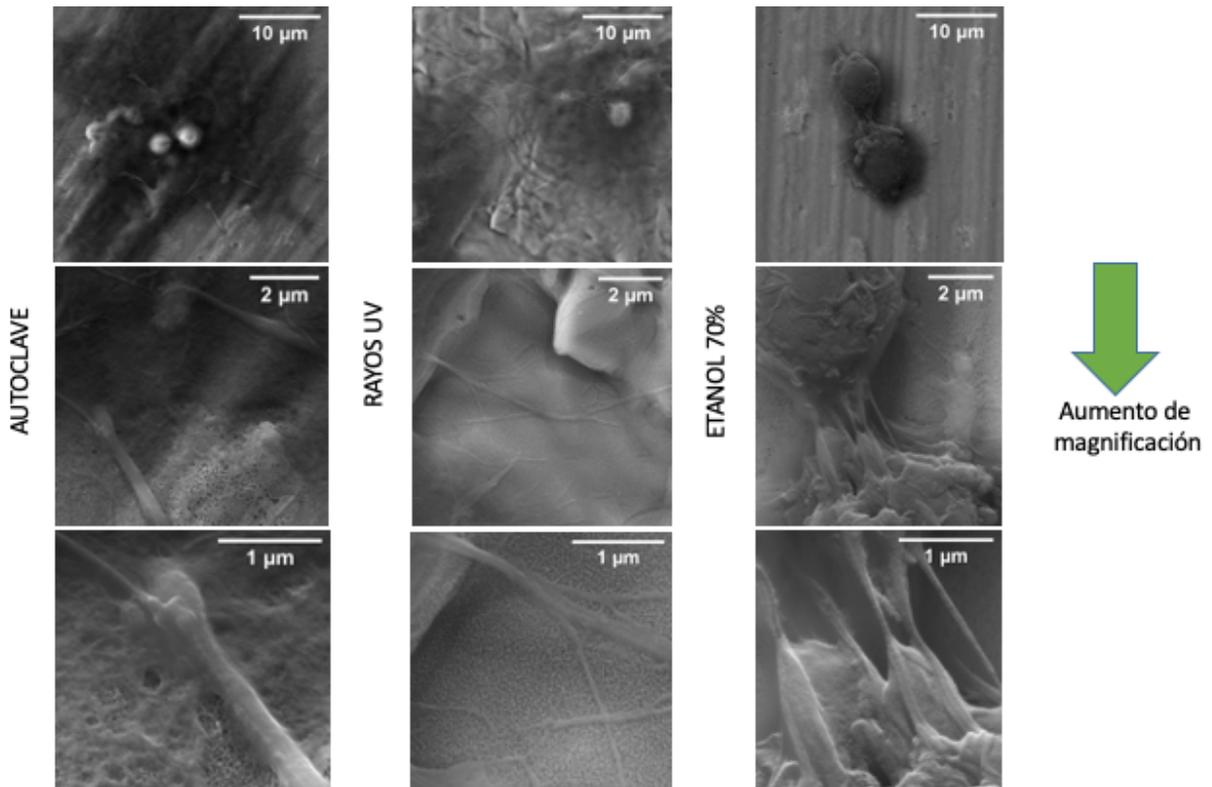
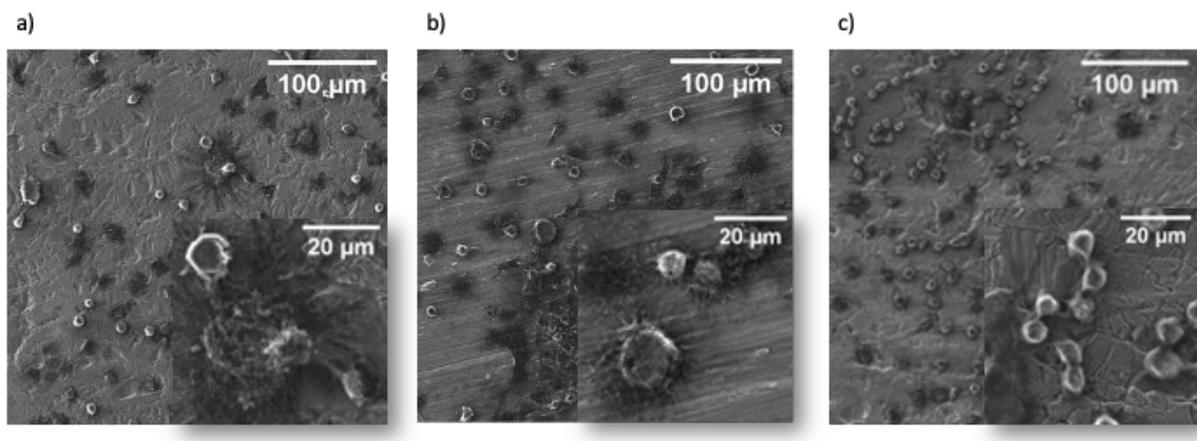


Figura 34 Micrografías SEM de macrófagos RAW 264.7 cultivadas a 24 h sobre superficies de NTs esterilizadas con tres métodos de esterilización distintos, que muestran filipodias de magnificación ascendente de arriba hacia abajo.

En las imágenes obtenidas por SEM de macrófagos cultivados a 4 días sobre superficies de NTs con los tres métodos de esterilización (Fig. 35 y 36), se puede observar que los macrófagos están extendidos, presentan un mayor tamaño, y mayor adherencia sobre las superficies sometidas a autoclave (Fig. 35 inciso a) y en las tratadas con rayos UV (Fig. 35 inciso b), el aumento de tamaño, extensión y granularidad, son indicadores directos de la diferenciación de monocitos hacia macrófagos (60). En las superficies tratadas con etanol al 70%, los macrófagos son de menor tamaño y de morfología redonda, con bordes lisos (Fig. 35 inciso c), esto indica una menor diferenciación y activación. Los filopodias de los macrófagos RAW 264.7 son de mayor grosor en las superficies de NTs tratadas con autoclave (Fig. 36), indicando una mayor adherencia y extensión celular, lo que se asocia a una excesiva respuesta inflamatoria, mientras que los macrófagos sobre superficies tratadas con rayos UV y etanol, las filopodias son más delgadas (Fig. 36 imágenes inferiores).



*Figura 35 Microfotografías SEM de macrófagos RAW 264.7 cultivados a 4 días sobre superficies anodizadas de TiO<sub>2</sub> esterilizadas con tres métodos distintos: a) Autoclave, b) Rayos UV, c) Etanol al 70%.*

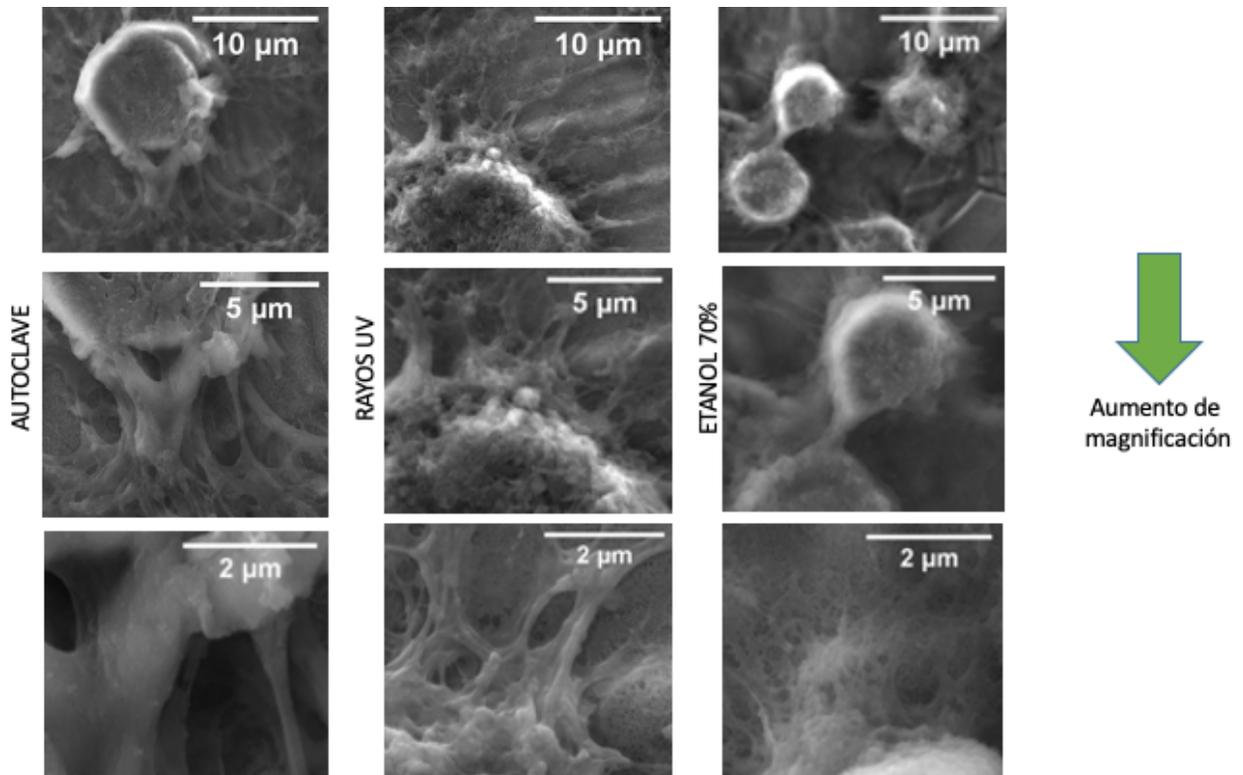


Figura 36 Microfotografías SEM de macrófagos RAW 264.7 cultivadas a 4 días, sobre superficies de NTs esterilizadas con tres métodos de esterilización distintos, que muestran filopodias de magnificación ascendente de arriba hacia abajo.

#### 4.3.3 Citoesqueleto de actina en macrófagos RAW 264.7 sobre superficies de NTs con diferentes técnicas de esterilización.

Con el objetivo de explorar la influencia de las superficies de NTs esterilizadas con los tres diferentes métodos, sobre los cambios fenotípicos, se examinó el citoesqueleto de actina, que está relacionado con el fenotipo de los macrófagos M1 y M2 (123). Los macrófagos se cultivaron en superficies a 24 h, un tiempo suficiente para revelar una respuesta inflamatoria aguda sobre las diferentes superficies, y fueron evaluados por inmunofluorescencia con anticuerpo anti-phalloidina conjugados con Alexa-Fluor 488 (verde), que se une a la F-actina del citoesqueleto. En las superficies control o superficies de Ti6Al4V pulido a espejo (Fig.37A y B), se observan macrófagos adheridos que muestran morfologías redondas, algunos macrófagos presentan abundantes filopodias que dan una apariencia espiculada (Fig. 37B), se observan lamelipodias en el límite de la membrana plasmática (Fig 37B, flecha roja) asociadas a migración y extensión celular (82) y pocos macrófagos presentan cuerpos

celulares elongados. Los macrófagos extendidos y con abundantes filopodias son característicos de los macrófagos activados (124). La mayoría de las células presentan estructuras agrupadas de F-actina que tienden a concentrarse alrededor del núcleo (Fig. 37B) compatibles con el fenotipo M1 (125). Por lo tanto, los macrófagos sobre superficies pulidas de Ti6Al4V presentan macrófagos redondeados y extendidos compatibles con el fenotipo M1 o proinflamatorio (122). No se observan fibras de estrés, posiblemente por dificultad celular para conducir el proceso de proliferación (125).

En superficies tratadas con autoclave los macrófagos cultivados a 24 h presentan morfología redondeada (Fig. 37C y D), con escasos macrófagos elongados, esta pérdida de elongación se puede asociar con baja motilidad celular (126) de los macrófagos sobre las superficies tratadas con autoclave. A mayor magnificación de una de las áreas exploradas se observa un macrófago elongado (Fig. 37D) con escasas filopodias.

En las superficies tratadas con rayos UV, los macrófagos cultivados a 24 h presentan una mayor proliferación y extensión sobre la superficie (Fig. 37E y F), su morfología es variada, algunos presentan forma elongada y otros redondeada, con apariencia espiculada por la presencia de múltiples filopodias, escasas células presentan el citoesqueleto de F-actina agrupado y orientado hacia el núcleo celular asociados al fenotipo M1 (125, 127). A mayor magnificación del área marcada en el recuadro (Fig. 37F) se observan macrófagos con el citoesqueleto de F-actina orientado hacia la periferia compatible con el fenotipo M2 (125, 127) y macrófagos con forma en huso compatibles con M2.

En superficies esterilizadas con etanol al 70%, los macrófagos cultivados a 24 h (Fig. 37G y H) se observa una menor proliferación celular, los macrófagos muestran una morfología redondeada y algunos presentan filopodias espiculadas con morfología tipo “huevo estrellado” (Fig. 37H), compatibles con la activación y morfología de los macrófagos M1 o pro-inflamatorios (128). El citoesqueleto de F-actina se encuentra agrupado y localizado principalmente hacia el núcleo, lo cual sugiere que se encuentran principalmente macrófagos M1 o pro-inflamatorios (127).

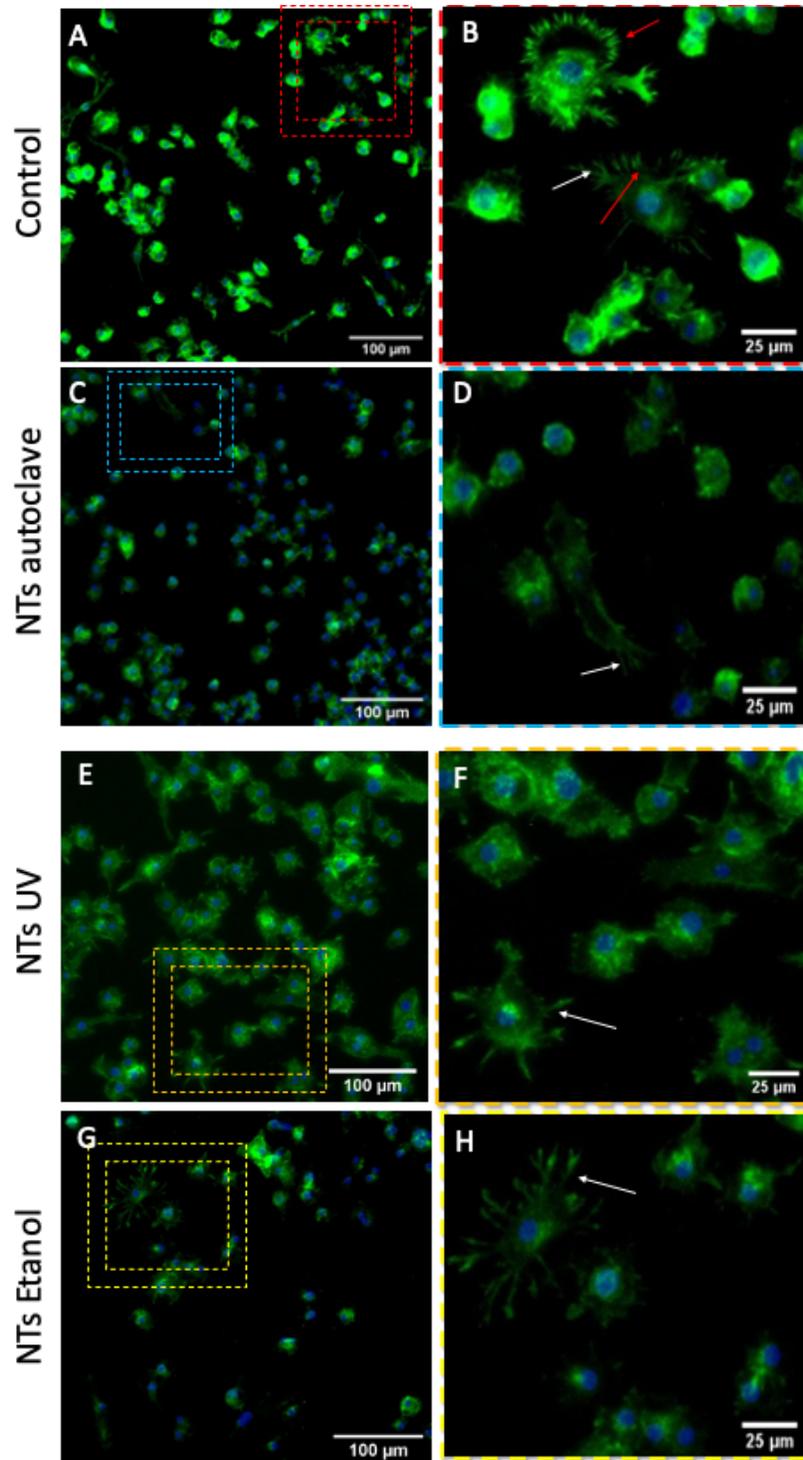


Figura 37 Imágenes de inmunofluorescencia de citoesqueleto de actina (verde) de macrófagos sobre superficies control de Ti6Al4V a 24 h de cultivo (A) la magnificación del recuadro (B), sobre superficies de NTs esterilizadas con autoclave (C) y la magnificación del recuadro (D). Sobre NTs esterilizados con rayos UV (E) y la magnificación del recuadro (F). Sobre NTs esterilizados con etanol (G) y la magnificación del recuadro (H). Núcleos (azul). Lamelipodias (flechas rojas) y filopodias (flechas blancas).

#### 4.3.4 Análisis de expresión de macrófagos RAW 264.7 sobre superficies de NTs esterilizadas.

El RNA de macrófagos cultivados a 3 y 6 días, sobre superficies de NTs esterilizadas con autoclave, rayos UV y etanol al 70%, fue purificado con TRIzol. Se añadió DNAsa a cada muestra de RNA aislado para eliminar DNA genómico y evitar falsos positivos, y para inactivar a la DNAsa se volvieron a repurificar con TRIzol. Para verificar la integridad del RNA se realizó electroforesis en agarosa al 1%, se cuantificó con nanodrop y se verificó la pureza. En todas las muestras se logró obtener RNA ribosomal (subunidades 28S y 18 S) (Fig. 39, 40 y 41).

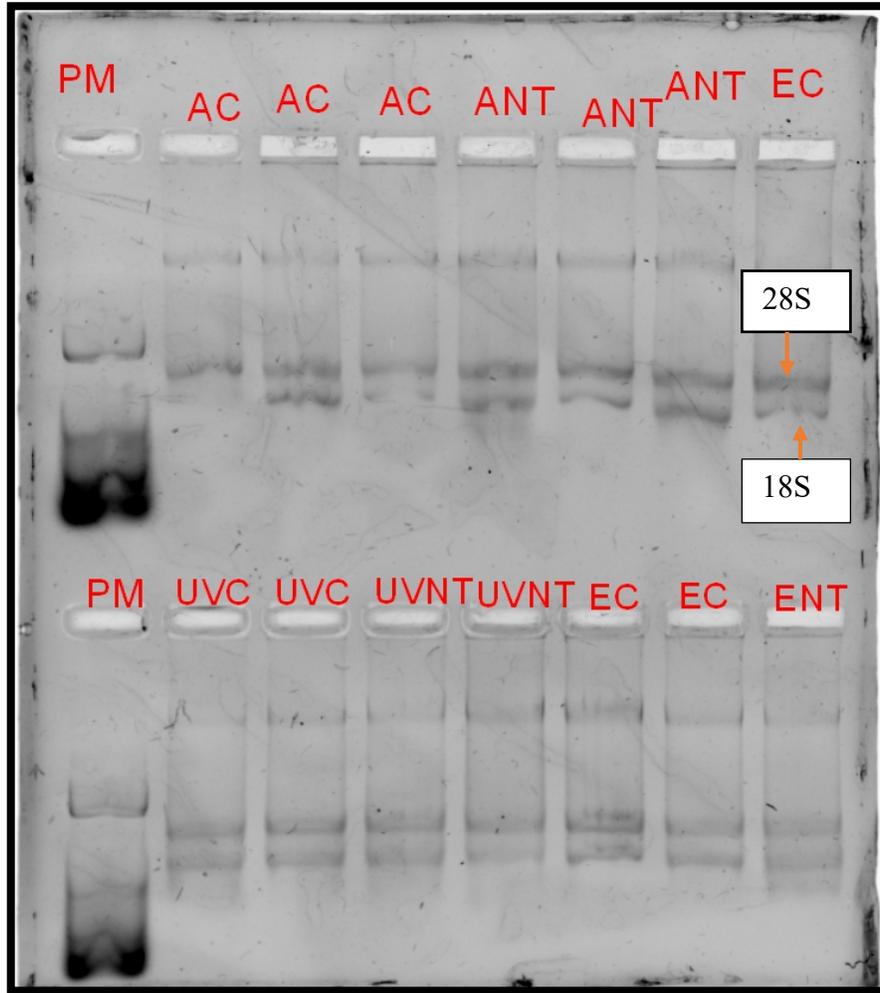


Figura 38 Electroforesis en gel de agarosa de RNA de macrófagos RAW 264.7 sobre superficies esterilizadas cultivados a 3 días. PM=marcador de peso molecular, AC= autoclave control, ANT= Autoclave NTs, EC= Etanol control, ENT= Etanol NTs, UVC= UV control, UVNT= UV NTs. Las flechas señalan las bandas que corresponde a las subunidades 28S y 18S de RNA ribosomal.

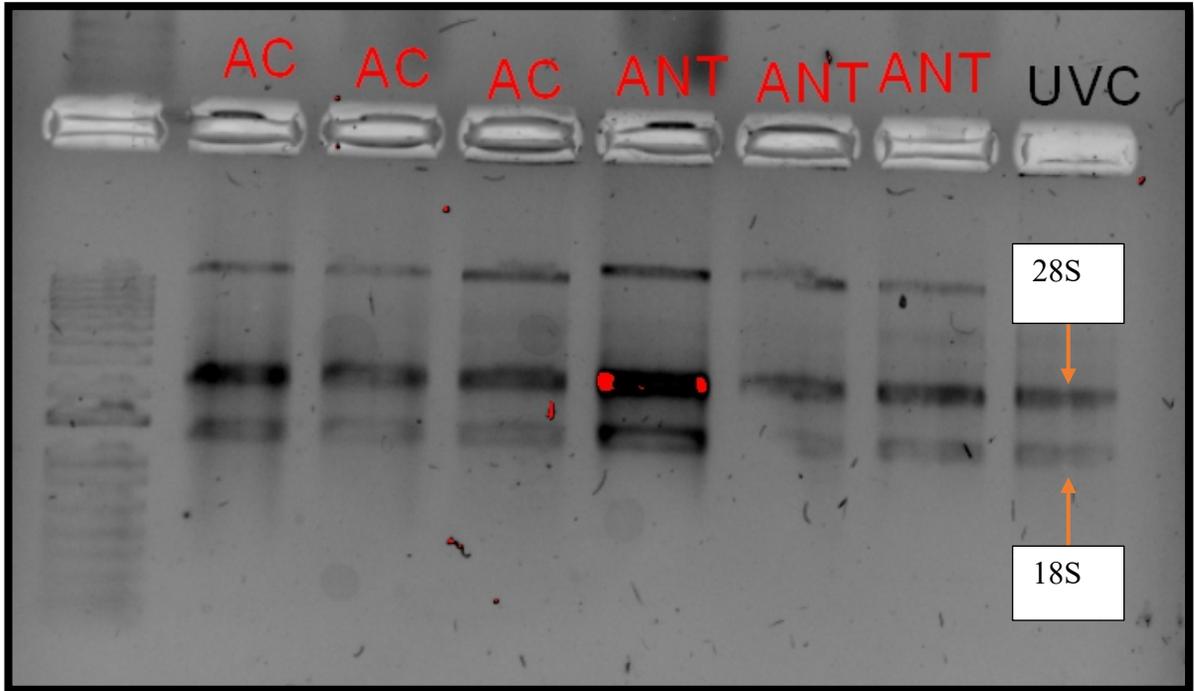


Figura 39 . Electroforesis en gel de agarosa de RNA de macrófagos RAW 264.7 sobre superficies esterilizadas cultivados a 6 días. PM=marcador de peso molecular, AC= autoclave control, ANT= Autoclave NTs, EC= Etanol control, ENT= Etanol NTs, UVC= UV control, UVNT= UV NTs. Las flechas señalan las bandas que corresponde a las subunidades 28S y 18S de RNA ribosomal.

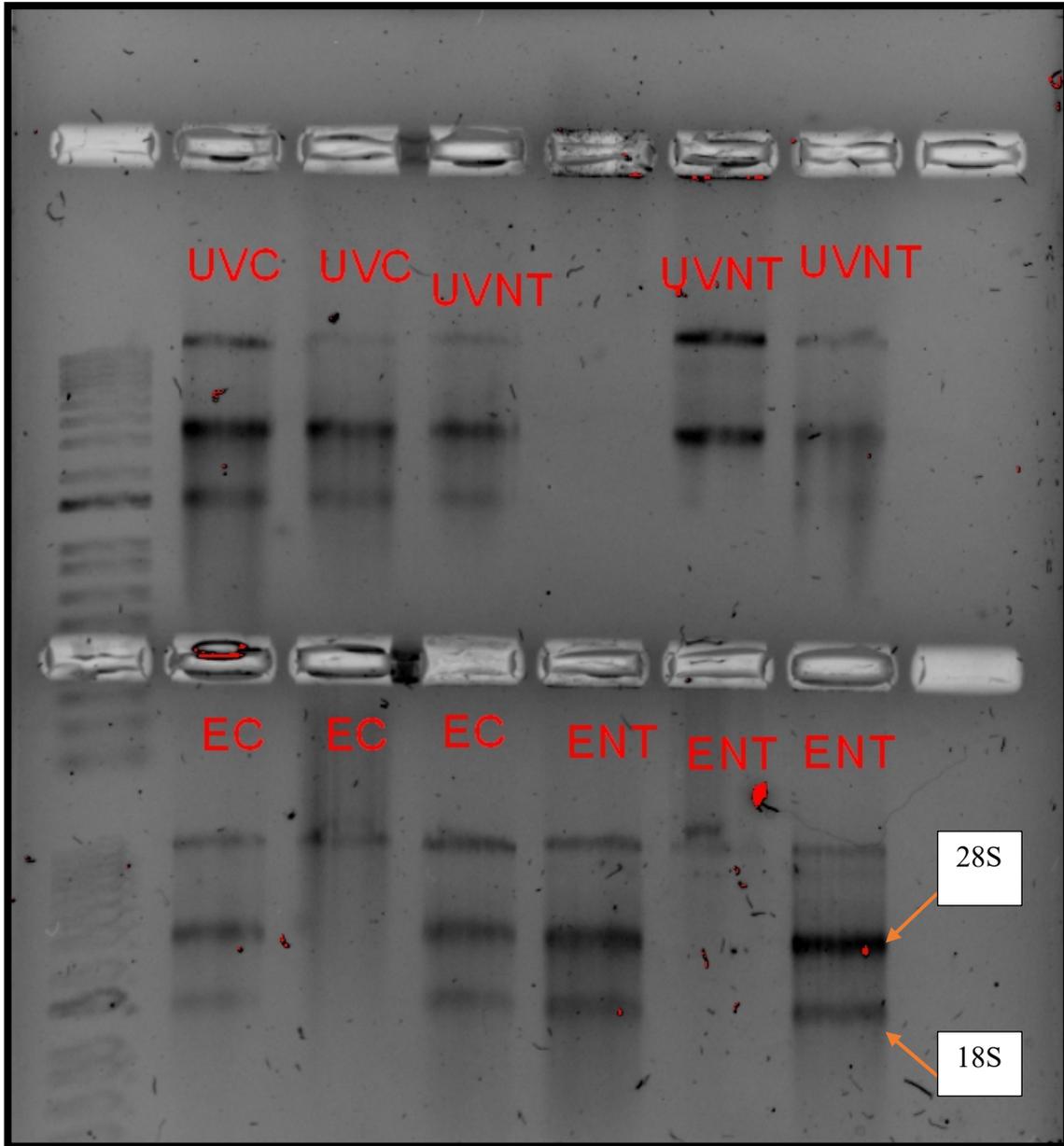


Figura 40 Electroforesis en gel de agarosa de RNA de macrófagos RAW 264.7 sobre superficies esterilizadas cultivados a 6 días. PM=marcador de peso molecular, AC= autoclave control, ANT= Autoclave NTs, EC= Etanol control, ENT= Etanol NTs, UVC= UV control, UVNT= UV NTs. Las flechas señalan las bandas que corresponde a las subunidades 28S y 18S de RNA ribosomal.

El RNA purificado de macrófagos RAW 264.7 fue retrotranscrito a DNA para análisis de expresión por medio de RT-PCR cuantitativa. El fenotipo M1 se evaluó con iNOS y CCR7, y el M2 con CD206. También, se analizó el gen de la enzima constitutiva Gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Se analizó el RNA de macrófagos estimulados con LPS para obtener el control positivo del fenotipo M1 (Figura 42), que muestra una mayor

expresión relativa de iNOS y CCR7 en comparación con el gen constitutivo GAPDH y una menor expresión de CD206, este último debe estar elevado en los macrófagos con fenotipo M2.

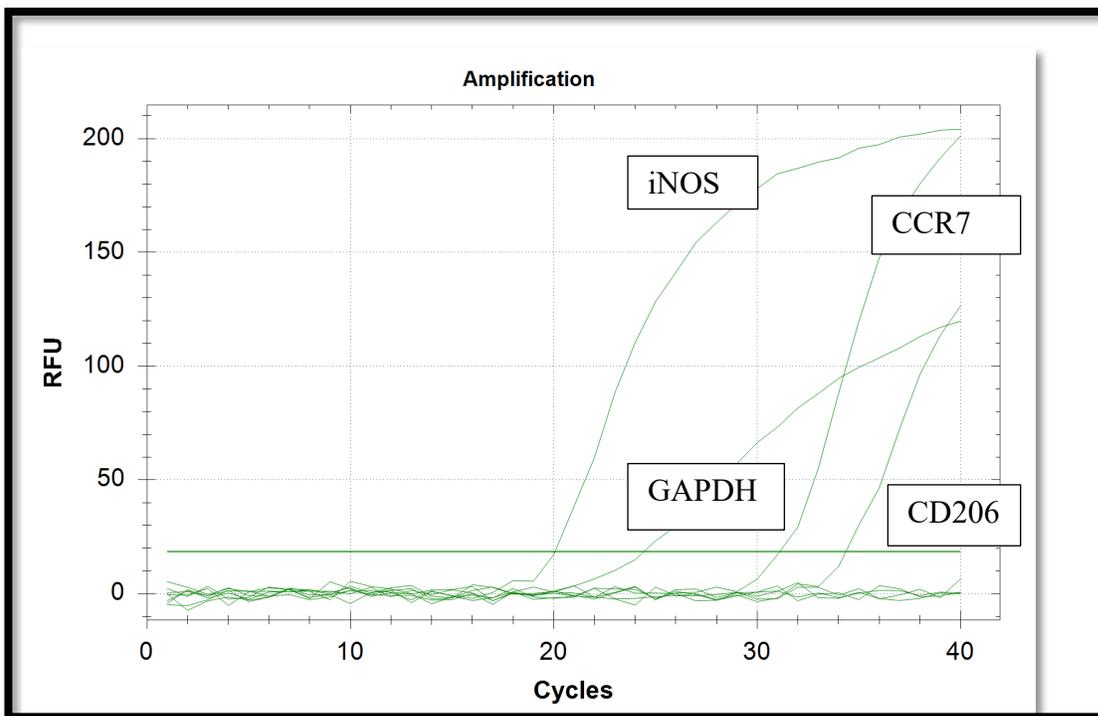


Figura 41. Gráfica de resultados de RT-PCR cuantitativa del control positivo de macrófagos RAW 264.7 fenotipo M1.

## 4.4 DISCUSIÓN

Los macrófagos son las primeras células que responden cuando se implanta un biomaterial, debido a que forman parte de la respuesta inmune innata y adaptativa. Existe evidencia creciente que las propiedades de superficie del biomaterial, tanto químicas como físicas, influyen en la función de los macrófagos y los dirigen hacia un fenotipo pro-inflamatorio (M1) o hacia un fenotipo antiinflamatorio (M2) responsable de la reparación tisular (58). Tradicionalmente se sabe que las señales químicas, tales como citoquinas y quimioquinas, inducen la polarización de los macrófagos hacia estos fenotipos (129). Sin embargo, existe evidencia creciente de que las características físicas de las superficies de los biomateriales, como el tamaño del poro (130) y la topografía (131) intervienen en este proceso (125). Se ha demostrado que los métodos de esterilización afectan significativamente las características de los nanotubos (NTs) de TiO<sub>2</sub> (68), pero existe escasa evidencia acerca de la influencia de los métodos de esterilización sobre las superficies nanoestructuradas en la inmunomodulación de los macrófagos. En este estudio se demostró que diferentes métodos de esterilización de las superficies nanoestructuradas pueden afectar el fenotipo de la línea celular de macrófagos murinos RAW 264.7. Los tres métodos de esterilización evaluados fueron autoclave húmeda, rayos UV y etanol al 70%. A lo largo del tiempo se ha observado que los macrófagos prefieren adherirse a superficies rugosas que a superficies lisas (132). Recientemente los investigadores han evaluado el efecto de las superficies rugosas sobre la secreción de citoquinas inflamatorias por los macrófagos, demostrando que superficies rugosas de Ti en ausencia de estimulación con LPS incrementan la secreción de  $\alpha$ -TNF mientras disminuyen la secreción de la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) en RAW 264.7 (133). Además, existe evidencia de que los biomateriales de uso médico con NTs 70 nm de diámetro reducen la respuesta inflamatoria. En dicho estudio se evaluó la respuesta de los macrófagos RAW 264.7 a las superficies de NTs con diferentes diámetros, y determinaron que los macrófagos mostraban una mayor adherencia a superficies nanoestructuradas cuando se comparan con superficies lisas del mismo material, y detectaron que las superficies con NTs de 70 nm de diámetro disminuyen de forma significativa la secreción de factor de necrosis tumoral (TNF) en macrófagos cultivados en dicha superficies (124). En otro estudio se demostró que los NTs disminuyen la activación de los macrófagos

RAW 264.7 a través de la inactivación simultánea de las vías de señalización p38/ERK/JNK MAPK y NF- $\kappa$ B, y que reducen la secreción de TNF- $\alpha$ , NO y de MCP-1, citoquinas proinflamatorias (134). Las superficies anodizadas utilizadas en nuestro estudio fueron NTs de 70 nm de diámetro, por lo que se puede concluir que estas superficies disminuyen la activación de los macrófagos, si se comparan con otros tamaños en diámetro. No obstante, los métodos de esterilización pueden afectar las características de los NTs. Los principales parámetros que son afectados por el método de esterilización son la química de superficie y la humectabilidad (66). Estudios previos demuestran que el método de esterilización utilizado en las superficies de Ti puede afectar su citocompatibilidad (68, 120, 135). Por otra parte, Vezeau y colaboradores, reportan que la esterilización con autoclave aumenta la hidrofobicidad de las superficies de los biomateriales, demostrado por incrementa del ángulo de contacto, debido a que acrecienta el grosor de la capa de óxido en las superficies de Titanio (135). En el estudio realizado por Junkar y colaboradores demuestran que los NTs son destruidos por el autoclave húmedo, mientras que las superficies de NTs esterilizadas con rayos UV permanecen intactas, indicando que el método de esterilización con autoclave no es una técnica apropiada para NTs de TiO<sub>2</sub>, afectando su biocompatibilidad (120). Los hallazgos presentados en este estudio son consistentes con los estudios discutidos, ya que los macrófagos RAW 264.7 mostraron una menor adherencia y proliferación sobre superficies de NTs esterilizadas con autoclave. En las imágenes obtenidas por SEM a 4 y 24 h de cultivo y en los experimentos de caracterización del citoesqueleto de actina por inmunofluorescencia, se demuestra que la mayoría de las células presentan escasos filopodias. Sin embargo, a 4 días de cultivo los macrófagos RAW 264.7 muestran células adheridas a las superficies tratadas con autoclave con una morfología extendida y espiculada, con filopodias de gran grosor que sugieren una mayor respuesta inflamatoria en etapas tardías (60).

Por otra parte, Han y colaboradores concluyen que los rayos UV mejoran la bioactividad y la respuesta celular de las superficies de Titanio al aumentar los grupos básicos Ti-OH en las superficies, haciéndolas más hidrofílicas (136). Por otro lado, Zhao concluye que los rayos UV y etanol aumentan la energía libre de superficie e inducen una mayor adhesión y proliferación celular que cuando se esterilizan con autoclave. Concluyeron que la energía

libre de superficie disminuye debido a que las grandes cantidades de contaminantes hidrofóbicos cubren la superficie y enmascaran la diferencia en la energía de superficie, resultado de las diferentes texturas en las superficies (68). El tratamiento de las superficies de NTs con rayos UV causa excitación de los electrones lo que origina una reacción catalítica, que remueve las especies reactivas de oxígeno generadas en la superficie de los NTs, facilitando la eliminación de los hidrocarburos que reaccionan con éstos radicales libres (137). Aunado a este principio, la irradiación directa de las superficies de Ti con rayos UV por sí misma también remueve la capa de hidrocarburos (138). A través de estos procesos, las superficies de Ti se vuelven más hidrofílicas y adquieren carga positiva, transformándose en una superficie con mayor bioactividad, promoviendo la absorción de proteínas y la adhesión celular (139). Los reportes presentados en este trabajo indican que los macrófagos RAW 264.7 cultivados sobre superficies de NTs esterilizadas con rayos UV, promueven una mayor adhesión y proliferación celular desde etapas tempranas hasta un periodo de 4 días. Después, en esta etapa también se observan macrófagos con rasgos morfológicos compatibles con diferenciación (indicar diferenciación a que tipo celular) (60). El estudio del citoesqueleto de actina de estas células sobre las superficies tratadas con UV, demuestran que esta superficie permite que el macrófago se active hacia el fenotipo M1 o proinflamatorio ya que presenta la morfología espiculada característica de estas células como lo se observó en los resultados de las células estimuladas con LPS utilizadas como control positivo de M1 en este estudio.

En el caso del protocolo de esterilización con etanol al 70%, en un estudio se demostró que disminuye en forma significativa la concentración de grupos hidroxilo en superficies de Ti y que esto puede afectar la adherencia celular (140). En este estudio se observó que en las superficies de NTs esterilizadas con etanol al 70% los macrófagos RAW 264.7 presentaron menor adherencia, de acuerdo con las imágenes obtenidas por SEM a 4 días. Además, se detectaron escasas filopodias y células con morfología redonda y bordes lisos, que también fueron analizados por SEM y por inmunofluorescencia del citoesqueleto de actina, información que sugieren que son compatibles con el fenotipo M1 o proinflamatorio.

La viabilidad de los macrófagos RAW 264.7 sobre las superficies de NTs esterilizadas con los tres métodos no fue afectada, indicando que las tres superficies permiten la proliferación celular sin resultar en cambios detectables. Se ha demostrado que señales topológicas pueden conducir cambios en la forma y en el citoesqueleto de los macrófagos (123). En los estudios del citoesqueleto de actina por inmunofluorescencia de los macrófagos RAW 264.7 a 24 h, se observó en las superficies de NTs tratadas con autoclave y las superficies lisas, que los macrófagos presentaron una morfología similar. Se detectó que los cuerpos celulares de aspecto redondeado y el citoesqueleto de F-actina agrupado y localizado principalmente hacia el núcleo, ambas son características que se han asociado al fenotipo M1 o proinflamatorio (125). Estos hallazgos indican que las superficies lisas de Ti y las superficies de NTs esterilizadas por autoclave inducen una respuesta inflamatoria propia del fenotipo M1 en etapas tempranas. De acuerdo a investigaciones previas se ha establecido que los macrófagos M1 predominan en la etapa temprana (1-5 días) después del daño o estímulo, mientras que los macrófagos M2 dominan en etapas tardías (4-10 días), aunque pueden estar presentes desde etapas iniciales (141). Esto quedó demostrado en este estudio en donde se observó el predominio de la morfología redondeada compatible con M1 y de escasas células con morfología en huso compatible con M2 a las 24 h de cultivo en superficies control y en superficies de NTs esterilizadas con autoclave. En cambio, en las superficies de NTs tratados con rayos UV, se observó la presencia de macrófagos con morfología compatible tanto con M1 como con M2 desde las 24 h de cultivo, indicando un balance entre ambas poblaciones celulares. Es necesario un balance entre estas poblaciones de macrófagos para una reparación apropiada del daño e integración del biomaterial (142). En el caso de las superficies de NTs esterilizadas con etanol al 70%, se encontró un predominio desde etapas tempranas hasta tardías de macrófagos compatibles con el fenotipo M1, indicando que este tipo de esterilización puede prolongar el estado inflamatorio. En los estudios por SEM a 4 días de los macrófagos RAW 264.7 sobre las tres superficies tratadas, se observó en autoclave y etanol al 70% únicamente células redondas compatibles con M1, en cambio, en las superficies tratadas con rayos UV se observaron células redondas y otras en huso o elongadas, indicando el inicio del cambio hacia el fenotipo antiinflamatorio. Con base a esto resultados podemos proponer que las superficies de NTs tratadas con autoclave y etanol al 70%

prolongan la inflamación, mientras que las superficies esterilizadas con rayos UV propician el cambio del estado inflamatorio al antiinflamatorio o asociado a la reparación tisular.

La habilidad de modular el fenotipo de las células inmunes por el ambiente físico es crítico para la reparación tisular, y es importante recordar que este es el objetivo de la medicina regenerativa. La polarización de los macrófagos que se genera durante la respuesta a cuerpo extraño inducida por el biomaterial implantado, resulta crítico que sea hacia el fenotipo M2, que es indicativo de remodelación alrededor del implante (57). Por lo que es conveniente utilizar una superficie que induzca la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M2 como son los NTs. Además, el método de esterilización debe ser conservador de los parámetros fisicoquímicos superficiales, de acuerdo con los hallazgos de este estudio resulta ser el método de esterilización con rayos UV. Según Hotchkiss, el incremento de la humectabilidad de la superficie tiene un efecto inmunomodulador más fuerte que la rugosidad, sus resultados sugieren que la humectabilidad junto con la rugosidad de la superficie incrementan la producción de proteínas pro y anti-inflamatorias que resulta en la activación de macrófagos M2 (143). Las superficies con NTs exhiben un fuerte efecto inhibitorio sobre los niveles de citoquinas y marcadores de superficie relacionadas a M1 (144), debido a esto, es indispensable que la arquitectura de los NTs sea conservada. Por lo tanto, las superficies de NTs esterilizadas con rayos UV y con etanol al 70%, son las que mejor conservan la morfología de los NTs y disminuyen los niveles de marcadores relacionados a M1, de acuerdo a lo sugerido por los estudios de RT-PCR.

Los macrófagos M1 proinflamatorios o clásicamente activados, producen NO y ROS, convirtiéndolos en agentes celulares más citotóxicos (145). Además, los M1 secretan grandes cantidades de citoquinas pro-inflamatorias que prolongan la inflamación. De manera contraria, los macrófagos M2, antiinflamatorios o alternativamente activados, poseen un alto potencial angiogénico comparado con los M1 (146). Producen factores de crecimiento, tales como, factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), VEGF y factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (146, 147). Los macrófagos M2 producen grandes cantidades de arginasa, la cual transforma la arginina en ornitina, un precursor de colágeno, esto contribuye a la formación de la matriz extracelular, promoviendo el crecimiento celular y la cicatrización

(148). Todas estas características determinan que los macrófagos M2 se asocien con reparación y crecimiento tisular (149). De acuerdo con los resultados obtenidos de esta investigación, las superficies con NTs esterilizadas con rayos UV son las que promueven en mayor grado el fenotipo M2.

En un estudio del citoesqueleto de macrófagos humanos, realizado por Vereyken, se observó que los macrófagos M1 de aspecto redondeado se asocian a menor motilidad y mayor adherencia, a diferencia de los M2 que son más elongados y se asocian a mayor motilidad, sugiriendo mayor tendencia a la migración tisular (127). De acuerdo a esto, nuestro estudio muestra por imágenes SEM y por medio del estudio del citoesqueleto de actina por inmunofluorescencia que los macrófagos RAW 264.7 cultivados sobre superficies de NTs esterilizadas con autoclave una mayor adherencia y en esta misma superficie y en la tratada con etanol al 70% una morfología redondeada asociada a M1, por lo tanto, una menor motilidad y mayor adherencia de los macrófagos RAW 264.7 en ambas superficies. En cambio, en las superficies de NTs tratadas con rayos UV, los macrófagos RAW 264.7 mostraron una morfología elongada indicando una mayor motilidad.

## CONCLUSIONES

Las principales aportaciones del estudio de los dos tipos celulares evaluados sobre superficies anodizadas de TiO<sub>2</sub> permiten concluir que las CE aisladas de pacientes con aterosclerosis son células en estado de senescencia, que presentan una mayor sobrevivencia, adherencia, migración celular, gran depósito de matriz extracelular y formación de uniones focales adherentes sobre las superficies de NTs. Todo esto promueve la formación de una monocapa endotelial adecuada sobre superficies de NTs a corto plazo.

En relación a la línea celular de macrófagos RAW 264.7, estudiados sobre superficies de NTs con los tres tratamientos de esterilización se puede concluir que el método de esterilización con rayos UV promueve la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M2 o antiinflamatorio asociado a una mejor reparación tisular, y que no es adecuado el uso de autoclave como método de esterilización de los dispositivos para uso médico fabricados con superficies de NTs porque promueve una mayor respuesta inflamatoria o polarización hacia el fenotipo M1 o pro-inflamatorio, que puede desencadenar la inflamación crónica que conduce al rechazo del biomaterial. En forma similar la esterilización con etanol al 70% de las superficies anodizadas estimula la diferenciación al fenotipo M1 o proinflamatorio.

## REFERENCIAS

1. Organization WH. Cardiovascular Diseases (CVDs): WHO; 2021 [Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-\(cvds\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-(cvds))].
2. Peng L, Eltgroth ML, LaTempa TJ, Grimes CA, Desai TA. The effect of TiO<sub>2</sub> nanotubes on endothelial function and smooth muscle proliferation. *Biomaterials*. 2009;30(7):1268-72.
3. Oh S, Brammer KS, Moon K-S, Bae J-M, Jin S. Influence of sterilization methods on cell behavior and functionality of osteoblasts cultured on TiO<sub>2</sub> nanotubes. *Materials Science and Engineering: C*. 2011;31(5):873-9.
4. Hauser S, Jung F, Pietzsch J. Human Endothelial Cell Models in Biomaterial Research. *Trends Biotechnol*. 2017;35(3):265-77.
5. Beltrán-Partida E, Valdéz-Salas B, Moreno-Ulloa A, Escamilla A, Curiel MA, Rosales-Ibáñez R, et al. Improved in vitro angiogenic behavior on anodized titanium dioxide nanotubes. *J Nanobiotechnology*. 2017;15(1):10-.
6. Moore KJ, Sheedy FJ, Fisher EA. Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(10):709-21.
7. Mc Namara K, Alzubaidi H, Jackson JK. Cardiovascular disease as a leading cause of death: how are pharmacists getting involved? *Integr Pharm Res Pract*. 2019;8:1-11.
8. Poznyak A, Grechko AV, Poggio P, Myasoedova VA, Alfieri V, Orekhov AN. The Diabetes Mellitus-Atherosclerosis Connection: The Role of Lipid and Glucose Metabolism and Chronic Inflammation. *Int J Mol Sci*. 2020;21(5).
9. Lahoz C, Mostaza JM. [Atherosclerosis as a systemic disease]. *Rev Esp Cardiol*. 2007;60(2):184-95.
10. Song P, Rudan D, Zhu Y, Fowkes FJI, Rahimi K, Fowkes FGR, et al. Global, regional, and national prevalence and risk factors for peripheral artery disease in 2015: an updated systematic review and analysis. *Lancet Glob Health*. 2019;7(8):e1020-e30.
11. Beckman JA, Schneider PA, Conte MS. Advances in Revascularization for Peripheral Artery Disease: Revascularization in PAD. *Circulation Research*. 2021;128(12):1885-912.
12. Tu C, Das S, Baker AB, Zoldan J, Suggs LJ. Nanoscale strategies: treatment for peripheral vascular disease and critical limb ischemia. *ACS Nano*. 2015;9(4):3436-52.

13. Norgren L, Hiatt WR, Dormandy JA, Nehler MR, Harris KA, Fowkes FG. Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). *J Vasc Surg.* 2007;45 Suppl S:S5-67.
14. Stenting for peripheral artery disease of the lower extremities: an evidence-based analysis. *Ont Health Technol Assess Ser.* 2010;10(18):1-88.
15. Zhao Y, Vanhoutte PM, Leung SWS. Vascular nitric oxide: Beyond eNOS. *Journal of Pharmacological Sciences.* 2015;129(2):83-94.
16. Sturtzel C. Endothelial Cells. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1003:71-91.
17. Kruger-Genge A, Blocki A, Franke RP, Jung F. Vascular Endothelial Cell Biology: An Update. *Int J Mol Sci.* 2019;20(18).
18. Gifre-Renom L, Daems M, Lutun A, Jones EAV. Organ-Specific Endothelial Cell Differentiation and Impact of Microenvironmental Cues on Endothelial Heterogeneity. *International journal of molecular sciences.* 2022;23(3):1477.
19. Potente M, Makinen T. Vascular heterogeneity and specialization in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017;18(8):477-94.
20. dela Paz NG, D'Amore PA. Arterial versus venous endothelial cells. *Cell Tissue Res.* 2009;335(1):5-16.
21. Kuhlencordt PJ, Gyurko R, Han F, Scherrer-Crosbie M, Aretz TH, Hajjar R, et al. Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice. *Circulation.* 2001;104(4):448-54.
22. Khakpour S, Wilhelmsen K, Hellman J. Vascular endothelial cell Toll-like receptor pathways in sepsis. *Innate Immun.* 2015;21(8):827-46.
23. Gerhardt H. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis.* 2008;4(4):241-6.
24. Phng LK, Gerhardt H. Angiogenesis: a team effort coordinated by notch. *Dev Cell.* 2009;16(2):196-208.
25. Wacker A, Gerhardt H. Endothelial development taking shape. *Curr Opin Cell Biol.* 2011;23(6):676-85.
26. Schwartz SM, Liaw L. Growth control and morphogenesis in the development and pathology of arteries. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993;21 Suppl 1:S31-49.

27. Pixley FJ. Macrophage Migration and Its Regulation by CSF-1. *Int J Cell Biol.* 2012;2012:501962.
28. Goerdt S, Politz O, Schledzewski K, Birk R, Gratchev A, Guillot P, et al. Alternative versus classical activation of macrophages. *Pathobiology.* 1999;67(5-6):222-6.
29. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity.* 2010;32(5):593-604.
30. Pusztaszeri MP, Seelentag W, Bosman FT. Immunohistochemical expression of endothelial markers CD31, CD34, von Willebrand factor, and Fli-1 in normal human tissues. *J Histochem Cytochem.* 2006;54(4):385-95.
31. Doddapattar P, Dhanesha N, Chorawala MR, Tinsman C, Jain M, Nayak MK, et al. Endothelial Cell-Derived Von Willebrand Factor, But Not Platelet-Derived, Promotes Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2018;38(3):520-8.
32. Melincovici CS, Boşca AB, Şuşman S, Mărginean M, Mişu C, Istrate M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) - key factor in normal and pathological angiogenesis. *Rom J Morphol Embryol.* 2018;59(2):455-67.
33. Shimizu A, Zankov DP, Kurokawa-Seo M, Ogita H. Vascular Endothelial Growth Factor-A Exerts Diverse Cellular Effects via Small G Proteins, Rho and Rap. *Int J Mol Sci.* 2018;19(4).
34. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology.* 2008;8(12):958-69.
35. Falk E. Pathogenesis of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2006;47(8 Suppl):C7-12.
36. Xu H, Jiang J, Chen W, Li W, Chen Z. Vascular Macrophages in Atherosclerosis. *J Immunol Res.* 2019;2019:4354786.
37. Ma L, Dai J, Chen J, Cai HW, Li JY, Li XY, et al. Research Progress of Angiogenesis in Atherosclerotic Plaque in Chinese Medicine and Western Medicine. *Chin J Integr Med.* 2018;24(12):950-5.
38. Rutanen J, Leppänen P, Tuomisto TT, Rissanen TT, Hiltunen MO, Vajanto I, et al. Vascular endothelial growth factor-D expression in human atherosclerotic lesions. *Cardiovasc Res.* 2003;59(4):971-9.

39. Kubatova H, Poledne R, Pitha J. Immune cells in carotid artery plaques: what can we learn from endarterectomy specimens? *Int Angiol.* 2020;39(1):37-49.
40. Shah PK. Inflammation, infection and atherosclerosis. *Trends in Cardiovascular Medicine.* 2019;29(8):468-72.
41. Serruys PW, de Jaegere P, Kiemeneij F, Macaya C, Rutsch W, Heyndrickx G, et al. A Comparison of Balloon-Expandable-Stent Implantation with Balloon Angioplasty in Patients with Coronary Artery Disease. *New England Journal of Medicine.* 1994;331(8):489-95.
42. Nakamura K, Keating JH, Edelman ER. Pathology of Endovascular Stents. *Interv Cardiol Clin.* 2016;5(3):391-403.
43. Borhani S, Hassanajili S, Ahmadi Tafti SH, Rabbani S. Cardiovascular stents: overview, evolution, and next generation. *Prog Biomater.* 2018;7(3):175-205.
44. Hou Z, Xiang M, Chen N, Cai X, Zhang B, Luo R, et al. The biological responses and mechanisms of endothelial cells to magnesium alloy. *Regen Biomater.* 2021;8(3):rbab017.
45. Kang SJ, Mintz GS, Akasaka T, Park DW, Lee JY, Kim WJ, et al. Optical coherence tomographic analysis of in-stent neoatherosclerosis after drug-eluting stent implantation. *Circulation.* 2011;123(25):2954-63.
46. Otsuka F, Byrne RA, Yahagi K, Mori H, Ladich E, Fowler DR, et al. Neoatherosclerosis: overview of histopathologic findings and implications for intravascular imaging assessment. *Eur Heart J.* 2015;36(32):2147-59.
47. Otsuka F, Joner M, Prati F, Virmani R, Narula J. Clinical classification of plaque morphology in coronary disease. *Nat Rev Cardiol.* 2014;11(7):379-89.
48. van den Berg JC. In-stent restenosis management: the best is yet to come. *J Cardiovasc Surg (Torino).* 2017;58(4):508-17.
49. Brammer KS, Oh S, Gallagher JO, Jin S. Enhanced cellular mobility guided by TiO<sub>2</sub> nanotube surfaces. *Nano Lett.* 2008;8(3):786-93.
50. Kowalski D, Kim D, Schmuki P. TiO<sub>2</sub> nanotubes, nanochannels and mesosponge: Self-organized formation and applications. *Nano today.* 2013;8(3):235-64.
51. Sprague EA, Luo J, Palmaz JC. Endothelial cell migration onto metal stent surfaces under static and flow conditions. *J Long Term Eff Med Implants.* 2000;10(1-2):97-110.

52. Kulkarni M, Mazare A, Gongadze E, Perutkova Š, Kralj-Iglič V, Milošev I, et al. Titanium nanostructures for biomedical applications. *Nanotechnology*. 2015;26(6):062002.
53. Douglas G, Van Kampen E, Hale AB, McNeill E, Patel J, Crabtree MJ, et al. Endothelial cell repopulation after stenting determines in-stent neointima formation: effects of bare-metal vs. drug-eluting stents and genetic endothelial cell modification. *European heart journal*. 2013;34(43):3378-88.
54. Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: a review. *Tissue Eng*. 2005;11(1-2):1-18.
55. Ahn A, Frishman WH, Gutwein A, Passeri J, Nelson M. Therapeutic angiogenesis: a new treatment approach for ischemic heart disease--part I. *Cardiol Rev*. 2008;16(4):163-71.
56. Bhattacharyya D, Xu H, Deshmukh RR, Timmons RB, Nguyen KT. Surface chemistry and polymer film thickness effects on endothelial cell adhesion and proliferation. *J Biomed Mater Res A*. 2010;94(2):640-8.
57. Brown BN, Ratner BD, Goodman SB, Amar S, Badylak SF. Macrophage polarization: An opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine. *Biomaterials*. 2012;33(15):3792-802.
58. Sridharan R, Cameron AR, Kelly DJ, Kearney CJ, O'Brien FJ. Biomaterial based modulation of macrophage polarization: a review and suggested design principles. *Materials Today*. 2015;18(6):313-25.
59. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials. *Seminars in Immunology*. 2008;20(2):86-100.
60. Lu J, Webster TJ. Reduced immune cell responses on nano and submicron rough titanium. *Acta Biomater*. 2015;16:223-31.
61. Gao S, Lu R, Wang X, Chou J, Wang N, Huai X, et al. Immune response of macrophages on super-hydrophilic TiO<sub>2</sub> nanotube arrays. *J Biomater Appl*. 2020;34(9):1239-53.
62. Bai L, Liu Y, Zhang X, Huang X, Yao X, Hang R, et al. Favorable manipulation of macrophage/endothelial cell functionality and their cross-talk on silicon-doped titania nanotube arrays. *Nanoscale*. 2019;11(13):5920-31.

63. Liu X, Zhang R, Hou J, Wu J, Zhang M, Fang S, et al. Interleukin-35 promotes early endothelialization after stent implantation by regulating macrophage activation. *Clin Sci (Lond)*. 2019;133(7):869-84.
64. Welt FG, Rogers C. Inflammation and restenosis in the stent era. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22(11):1769-76.
65. Park JH, Olivares-Navarrete R, Baier RE, Meyer AE, Tannenbaum R, Boyan BD, et al. Effect of cleaning and sterilization on titanium implant surface properties and cellular response. *Acta Biomater*. 2012;8(5):1966-75.
66. Doundoulakis JH. Surface analysis of titanium after sterilization: role in implant-tissue interface and bioadhesion. *J Prosthet Dent*. 1987;58(4):471-8.
67. Singh S, Schaaf NG. Dynamic sterilization of titanium implants with ultraviolet light. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1989;4(2):139-46.
68. Zhao L, Mei S, Wang W, Chu PK, Wu Z, Zhang Y. The role of sterilization in the cytocompatibility of titania nanotubes. *Biomaterials*. 2010;31(8):2055-63.
69. Lausmaa J, Kasemo B, Hansson S. Accelerated oxide growth on titanium implants during autoclaving caused by fluorine contamination. *Biomaterials*. 1985;6(1):23-7.
70. Guo T, Oztug NAK, Han P, Ivanovski S, Gulati K. Influence of sterilization on the performance of anodized nanoporous titanium implants. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2021;130:112429.
71. Zhong S, Luo R, Wang X, Tang L, Wu J, Wang J, et al. Effects of polydopamine functionalized titanium dioxide nanotubes on endothelial cell and smooth muscle cell. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2014;116:553-60.
72. Beltran-Partida E, Valdez-Salas B, Escamilla A, Curiel M, Valdez-Salas E, Nedev N, et al. Disinfection of titanium dioxide nanotubes using super-oxidized water decrease bacterial viability without disrupting osteoblast behavior. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;60:239-45.
73. Cooksey C. Hematoxylin and related compounds--an annotated bibliography concerning their origin, properties, chemistry, and certain applications. *Biotech Histochem*. 2010;85(1):65-82.
74. Feldman AT, Wolfe D. Tissue processing and hematoxylin and eosin staining. *Methods Mol Biol*. 2014;1180:31-43.

75. Jenkins J, Ishak MI, Eales M, Gholinia A, Kulkarni S, Keller TF, et al. Resolving physical interactions between bacteria and nanotopographies with focused ion beam scanning electron microscopy. *iScience*. 2021;24(7):102818.
76. Stockert JC, Horobin RW, Colombo LL, Blázquez-Castro A. Tetrazolium salts and formazan products in Cell Biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta Histochem*. 2018;120(3):159-67.
77. Dos Santos VP, Pozzan G, Castelli V, Caffaro RA. Arteriosclerosis, atherosclerosis, arteriolosclerosis, and Monckeberg medial calcific sclerosis: what is the difference? *J Vasc Bras*. 2021;20:e20200211-e.
78. Mackay LS, Dodd S, Dougall IG, Tomlinson W, Lordan J, Fisher AJ, et al. Isolation and characterisation of human pulmonary microvascular endothelial cells from patients with severe emphysema. *Respir Res*. 2013;14(1):23.
79. Hewett PW. Vascular endothelial cells from human micro- and macrovessels: isolation, characterisation and culture. *Methods Mol Biol*. 2009;467:95-111.
80. Novikova OA, Nazarkina ZK, Cherepanova AV, Laktionov PP, Chelobanov BP, Murashov IS, et al. Isolation, culturing and gene expression profiling of inner mass cells from stable and vulnerable carotid atherosclerotic plaques. *PLoS One*. 2019;14(6):e0218892.
81. Poursaleh A, Esfandiari G, Sadegh Beigee F, Eshghifar N, Najafi M. Isolation of intimal endothelial cells from the human thoracic aorta: Study protocol. *Med J Islam Repub Iran*. 2019;33:51.
82. Mattila PK, Lappalainen P. Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(6):446-54.
83. Schillemans M, Karampini E, Kat M, Bierings R. Exocytosis of Weibel-Palade bodies: how to unpack a vascular emergency kit. *J Thromb Haemost*. 2019;17(1):6-18.
84. Birukova AA, Shah AS, Tian Y, Moldobaeva N, Birukov KG. Dual role of vinculin in barrier-disruptive and barrier-enhancing endothelial cell responses. *Cell Signal*. 2016;28(6):541-51.
85. Flasker A, Kulkarni M, Mrak-Poljsak K, Junkar I, Cucnik S, Zigon P, et al. Binding of human coronary artery endothelial cells to plasma-treated titanium dioxide nanotubes of different diameters. *J Biomed Mater Res A*. 2016;104(5):1113-20.

86. Gimbrone MA, Jr., García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis. *Circulation research*. 2016;118(4):620-36.
87. Yamamoto Y, Ishikawa Y, Shimpo M, Matsumura M. Mönckeberg's sclerosis. *J Gen Fam Med*. 2021;22(1):55-6.
88. Richardson MR, Lai X, Witzmann FA, Yoder MC. Venous and arterial endothelial proteomics: mining for markers and mechanisms of endothelial diversity. *Expert Review of Proteomics*. 2010;7(6):823-31.
89. Franke RP, Fuhrmann R, Hiebl B, Jung F. Influence of radiographic contrast media (Iodixanol und Iomeprol) on the morphology of human arterial and venous endothelial cells on extracellular matrix in vitro. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*. 2011;48:41-56.
90. Lehle K, Haubner F, Münzel D, Birnbaum DE, Preuner JG. Development of a disease-specific model to evaluate endothelial dysfunction in patients with diabetes mellitus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2007;357(1):308-13.
91. Aird WC. Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(1):a006429.
92. Fuchs S, Dohle E, Kolbe M, Kirkpatrick CJ. Outgrowth Endothelial Cells: Sources, Characteristics and Potential Applications in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. In: Kasper C, van Griensven M, Pörtner R, editors. *Bioreactor Systems for Tissue Engineering II: Strategies for the Expansion and Directed Differentiation of Stem Cells*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2010. p. 201-17.
93. Borissoff JI, Spronk HM, ten Cate H. The hemostatic system as a modulator of atherosclerosis. *N Engl J Med*. 2011;364(18):1746-60.
94. Srámek A, Bucciarelli P, Federici AB, Mannucci PM, De Rosa V, Castaman G, et al. Patients with type 3 severe von Willebrand disease are not protected against atherosclerosis: results from a multicenter study in 47 patients. *Circulation*. 2004;109(6):740-4.
95. Braune S, Groß M, Walter M, Zhou S, Dietze S, Rutschow S, et al. Adhesion and activation of platelets from subjects with coronary artery disease and apparently healthy individuals on biomaterials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016;104(1):210-7.

96. Mohan CC, Chennazhi KP, Menon D. In vitro hemocompatibility and vascular endothelial cell functionality on titania nanostructures under static and dynamic conditions for improved coronary stenting applications. *Acta Biomater.* 2013;9(12):9568-77.
97. Bencina M, Rawat N, Lakota K, Sodin-Semrl S, Igljic A, Junkar I. Bio-Performance of Hydrothermally and Plasma-Treated Titanium: The New Generation of Vascular Stents. *Int J Mol Sci.* 2021;22(21).
98. Auerbach R, Lewis R, Shinnars B, Kubai L, Akhtar N. Angiogenesis assays: a critical overview. *Clin Chem.* 2003;49(1):32-40.
99. Palmaz JC, Benson A, Sprague EA. Influence of surface topography on endothelialization of intravascular metallic material. *J Vasc Interv Radiol.* 1999;10(4):439-44.
100. Braz J, Martins GM, Morales N, Naulin P, Fuentes C, Barrera NP, et al. Live endothelial cells on plasma-nitrided and oxidized titanium: An approach for evaluating biocompatibility. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 2020;113:111014.
101. Huan Z, Yu H, Li H, Ruitter MS, Chang J, Apachitei I, et al. The effects of plasma electrolytically oxidized NiTi on in vitro endothelialization. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2016;141:365-73.
102. Ter Meer M, Daamen WF, Hoogeveen YL, van Son GJF, Schaffer JE, van der Vliet JA, et al. Continuously Grooved Stent Struts for Enhanced Endothelial Cell Seeding. *Cardiovasc Intervent Radiol.* 2017;40(8):1237-45.
103. Dorland YL, Huvneers S. Cell-cell junctional mechanotransduction in endothelial remodeling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2017;74(2):279-92.
104. Omidvar R, Tafazzoli-Shadpour M, Mahmoodi-Nobar F, Azadi S, Khani MM. Quantifying effects of cyclic stretch on cell-collagen substrate adhesiveness of vascular endothelial cells. *Proc Inst Mech Eng H.* 2018;232(5):531-41.
105. Sack KD, Teran M, Nugent MA. Extracellular Matrix Stiffness Controls VEGF Signaling and Processing in Endothelial Cells. *J Cell Physiol.* 2016;231(9):2026-39.
106. Wu J, Li J, Wu F, He Z, Yang P, Huang N. Effect of micropatterned TiO<sub>2</sub> nanotubes thin film on the deposition of endothelial extracellular matrix: For the purpose of enhancing surface biocompatibility. *Biointerphases.* 2015;10(4):04a302.

107. Monchaux E, Vermette P. Effects of surface properties and bioactivation of biomaterials on endothelial cells. *FBS*. 2010;2(1):239-55.
108. Kuznetsova TG, Starodubtseva MN, Yegorenkov NI, Chizhik SA, Zhdanov RI. Atomic force microscopy probing of cell elasticity. *Micron*. 2007;38(8):824-33.
109. Chen X, Feng L, Jin H. Constant or fluctuating hyperglycemias increases cytomembrane stiffness of human umbilical vein endothelial cells in culture: roles of cytoskeletal rearrangement and nitric oxide synthesis. *BMC Cell Biol*. 2013;14:22-.
110. Davidson SM, Duchon MR. Endothelial Mitochondria. *Circulation Research*. 2007;100(8):1128-41.
111. Ginhoux F, Guilliams M. Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis. *Immunity*. 2016;44(3):439-49.
112. Locati M, Curtale G, Mantovani A. Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity. *Annu Rev Pathol*. 2020;15:123-47.
113. Martinez FO, Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep*. 2014;6:13-.
114. Jin S-S, He D-Q, Luo D, Wang Y, Yu M, Guan B, et al. A Biomimetic Hierarchical Nanointerface Orchestrates Macrophage Polarization and Mesenchymal Stem Cell Recruitment To Promote Endogenous Bone Regeneration. *ACS Nano*. 2019;13(6):6581-95.
115. Thomsen P, Gretzer C. Macrophage interactions with modified material surfaces. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*. 2001;5(2):163-76.
116. He Y, Luo J, Zhang Y, Li Z, Chen F, Song W, et al. The unique regulation of implant surface nanostructure on macrophages M1 polarization. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2020;106:110221.
117. Luu TU, Gott SC, Woo BWK, Rao MP, Liu WF. Micro- and Nanopatterned Topographical Cues for Regulating Macrophage Cell Shape and Phenotype. *ACS applied materials & interfaces*. 2015;7(51):28665-72.
118. Wang J, Qian S, Liu X, Xu L, Miao X, Xu Z, et al. M2 macrophages contribute to osteogenesis and angiogenesis on nanotubular TiO(2) surfaces. *J Mater Chem B*. 2017;5(18):3364-76.

119. Yao S, Feng X, Li W, Wang L-N, Wang X. Regulation of RAW 264.7 macrophages behavior on anodic TiO<sub>2</sub> nanotubular arrays. *Frontiers of Materials Science*. 2017;11(4):318-27.
120. Junkar I, Kulkarni M, Drasler B, Rugelj N, Mazare A, Flaker A, et al. Influence of various sterilization procedures on TiO<sub>2</sub> nanotubes used for biomedical devices. *Bioelectrochemistry*. 2016;109:79-86.
121. Valdez-Salas B, Beltrán-Partida E, Castillo-Urbe S, Curiel-Álvarez M, Zlatev R, Stoytcheva M, et al. In Vitro Assessment of Early Bacterial Activity on Micro/Nanostructured Ti6Al4V Surfaces. *Molecules*. 2017;22(5).
122. Luu TU, Gott SC, Woo BW, Rao MP, Liu WF. Micro- and Nanopatterned Topographical Cues for Regulating Macrophage Cell Shape and Phenotype. *ACS Appl Mater Interfaces*. 2015;7(51):28665-72.
123. McWhorter FY, Wang T, Nguyen P, Chung T, Liu WF. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(43):17253-8.
124. Chamberlain LM, Brammer KS, Johnston GW, Chien S, Jin S. Macrophage Inflammatory Response to TiO<sub>2</sub> Nanotube Surfaces. *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*. 2011;Vol.02No.03:8.
125. McWhorter FY, Davis CT, Liu WF. Physical and mechanical regulation of macrophage phenotype and function. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015;72(7):1303-16.
126. Neumeister P, Pixley FJ, Xiong Y, Xie H, Wu K, Ashton A, et al. Cyclin D1 governs adhesion and motility of macrophages. *Mol Biol Cell*. 2003;14(5):2005-15.
127. Vereyken EJF, Heijnen PDAM, Baron W, de Vries EHE, Dijkstra CD, Teunissen CE. Classically and alternatively activated bone marrow derived macrophages differ in cytoskeletal functions and migration towards specific CNS cell types. *J Neuroinflammation*. 2011;8:58-.
128. Verreck FA, de Boer T, Langenberg DM, van der Zanden L, Ottenhoff TH. Phenotypic and functional profiling of human proinflammatory type-1 and anti-inflammatory type-2 macrophages in response to microbial antigens and IFN-gamma- and CD40L-mediated costimulation. *J Leukoc Biol*. 2006;79(2):285-93.

129. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*. 2004;25(12):677-86.
130. Garg K, Pullen NA, Oskeritzian CA, Ryan JJ, Bowlin GL. Macrophage functional polarization (M1/M2) in response to varying fiber and pore dimensions of electrospun scaffolds. *Biomaterials*. 2013;34(18):4439-51.
131. McWhorter FY, Wang T, Nguyen P, Chung T, Liu WF. Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(43):17253-8.
132. Rich A, Harris AK. Anomalous preferences of cultured macrophages for hydrophobic and roughened substrata. *J Cell Sci*. 1981;50:1-7.
133. Refai AK, Textor M, Brunette DM, Waterfield JD. Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines. *J Biomed Mater Res A*. 2004;70(2):194-205.
134. Neacsu P, Mazare A, Schmuki P, Cimpean A. Attenuation of the macrophage inflammatory activity by TiO<sub>2</sub> nanotubes via inhibition of MAPK and NF-kappaB pathways. *Int J Nanomedicine*. 2015;10:6455-67.
135. Vezeau PJ, Koorbusch GF, Draughn RA, Keller JC. Effects of multiple sterilization on surface characteristics and in vitro biologic responses to titanium. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996;54(6):738-46.
136. Han Y, Chen D, Sun J, Zhang Y, Xu K. UV-enhanced bioactivity and cell response of micro-arc oxidized titania coatings. *Acta Biomater*. 2008;4(5):1518-29.
137. Foster HA, Ditta IB, Varghese S, Steele A. Photocatalytic disinfection using titanium dioxide: spectrum and mechanism of antimicrobial activity. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;90(6):1847-68.
138. Att W, Hori N, Iwasa F, Yamada M, Ueno T, Ogawa T. The effect of UV-photofunctionalization on the time-related bioactivity of titanium and chromium-cobalt alloys. *Biomaterials*. 2009;30(26):4268-76.
139. Iwasa F, Hori N, Ueno T, Minamikawa H, Yamada M, Ogawa T. Enhancement of osteoblast adhesion to UV-photofunctionalized titanium via an electrostatic mechanism. *Biomaterials*. 2010;31(10):2717-27.

140. Hirano M, Kozuka T, Asano Y, Kakuchi Y, Arai H, Ohtsu N. Effect of sterilization and water rinsing on cell adhesion to titanium surfaces. *Applied Surface Science*. 2014;311:498-502.
141. Troidl C, Jung G, Troidl K, Hoffmann J, Mollmann H, Nef H, et al. The temporal and spatial distribution of macrophage subpopulations during arteriogenesis. *Curr Vasc Pharmacol*. 2013;11(1):5-12.
142. Pajarinen J, Kouri VP, Jämsen E, Li TF, Mandelin J, Konttinen YT. The response of macrophages to titanium particles is determined by macrophage polarization. *Acta Biomater*. 2013;9(11):9229-40.
143. Hotchkiss KM, Reddy GB, Hyzy SL, Schwartz Z, Boyan BD, Olivares-Navarrete R. Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation. *Acta biomaterialia*. 2016;31:425-34.
144. Klopffleisch R. Macrophage reaction against biomaterials in the mouse model - Phenotypes, functions and markers. *Acta Biomater*. 2016;43:3-13.
145. Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM. Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J Leukoc Biol*. 2006;80(6):1298-307.
146. Kodelja V, Müller C, Tenorio S, Schebesch C, Orfanos CE, Goerdts S. Differences in angiogenic potential of classically vs alternatively activated macrophages. *Immunobiology*. 1997;197(5):478-93.
147. Song E, Ouyang N, Hörbelt M, Antus B, Wang M, Exton MS. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. *Cell Immunol*. 2000;204(1):19-28.
148. Gratchev A, Guillot P, Hakiy N, Politz O, Orfanos CE, Schledzewski K, et al. Alternatively activated macrophages differentially express fibronectin and its splice variants and the extracellular matrix protein betaIG-H3. *Scand J Immunol*. 2001;53(4):386-92.
149. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958-69.

# ANEXOS

14/5/2019

<https://sirelcis.imss.gob.mx/s2/scnic/protocolos/dictamen/9951>

MÉXICO  
GOBIERNO DE LA REPÚBLICA



**Dirección de Prestaciones Médicas**  
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
Coordinación de Investigación en Salud



## Dictamen de Aprobación

Martes, 14 de mayo de 2019

Ref. 09-B5-61-2800/201900/ 1 0 2 7

M.C. José Carlos Alcocer Cañez  
COORDINACION CLINICA DE CIRUGIA, H GRAL ZONA NUM 30  
Baja California

Presente:

Informo a usted que el protocolo titulado: **Evaluación del proceso de angiogénesis in vitro de células endoteliales arteriales de pacientes con aterosclerosis sobre superficies nanoestructuradas.**, fue sometido a la consideración de este Comité Nacional de Investigación Científica.

Los procedimientos propuestos en el protocolo cumplen con los requerimientos de las normas vigentes, con base en las opiniones de los vocales del Comité de Ética en Investigación y del Comité de Investigación del Comité Nacional de Investigación Científica del IMSS, se ha emitido el dictamen de **APROBADO**, con número de registro: R-2019-785-035.

De acuerdo a la normatividad vigente, deberá informar a esta Comité en los meses de enero y julio de cada año, acerca del desarrollo del proyecto a su cargo. Este dictamen sólo tiene vigencia de un año. Por lo que en caso de ser necesario requerirá solicitar una reaprobación al Comité de Ética en Investigación del Comité Nacional de Investigación Científica, al término de la vigencia del mismo.

Atentamente,

Dra. María Susana Navarrete Navarro  
Secretaria Ejecutiva  
Comité Nacional de Investigación Científica

Anexo comentarios:  
Se anexa dictamen y comentarios  
SNN/ iah. F-CNIC-2018-247

**IMSS**

SEGURIDAD Y SOLIDARIDAD SOCIAL

4° piso Bloque "B" de la Unidad de Congresos Av. Cuauhtémoc 330 Col. Doctores México 06720 56276900 ext. 21210 [conise@cicis.gob.mx](mailto:conise@cicis.gob.mx)

<https://sirelcis.imss.gob.mx/s2/scnic/protocolos/dictamen/9951>

1/1



GOBIERNO DE  
MÉXICO



2020  
LEONORA VICARIO  
PRESIDENTA MADRE DE LA ESCUELA

Dirección de Prestaciones Médicas  
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
Coordinación de Investigación en Salud  
División de Desarrollo de la Investigación  
Comité de Ética en Investigación

Oficio No. 09 B5 61 61 2820/2020/ 0745

Ciudad de México, a 25 de mayo de 2020.

**Dr. José Carlos Alcocer Cañez**  
Investigador Responsable  
Coordinación Clínica de Cirugía,  
H Gal. Zona Núm. 30  
Presente

En relación al protocolo titulado: "Evaluación del proceso de angiogénesis in vitro de células endoteliales arteriales de pacientes con aterosclerosis sobre superficies nanoestructuradas", con número de registro **2019-785-035**, el Comité de Ética en Investigación **CONBIOÉTICA-09-CEI-009-20160601** **revisó y aprobo** la solicitud de reaprobación anual del proyecto por el periodo del 27 de mayo de 2020 al 26 de mayo de 2021. A su vez, se aprueba el cronograma actualizado.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente

**Dr. Marcos Gutiérrez de la Barrera**  
Presidente  
Comité de Ética en Investigación  
Coordinación de Investigación en Salud  
Centro Médico Nacional Siglo XXI

RBB/mcjbm  
FCNIC-2018-247

Av. Cuauhtémoc No. 330 Bloque "B" – 4º. Piso, Anexo a la Unidad de Congresos del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Col. Doctores, Alcaldía Cuauhtémoc, Ciudad de México., C. P. 06720Tel. (55) 5627-6900, Ext. 21230





**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
UNIDAD DE EDUCACIÓN, INVESTIGACIÓN Y POLÍTICAS  
DE SALUD**

**COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD  
CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO (ADULTOS)**

**CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPACIÓN EN  
PROTOCOLOS DE INVESTIGACIÓN**

**Nombre del estudio:** “Evaluación del proceso de angiogénesis in vitro de células endoteliales arteriales de pacientes con aterosclerosis sobre superficies nanoestructuradas”

**Patrocinador externo:** Instituto de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Baja California.

**Mexicali, B.C. a** \_\_\_\_\_

**Número de registro:** R-2019-785-035

**Justificación y objetivo del estudio:** Evaluar el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos sobre dispositivos de reemplazo vascular para mejorar la circulación en áreas del cuerpo afectadas por aterosclerosis.

**Procedimientos:** Se tomarán fragmentos de vasos sanguíneos del miembro amputado para aislar sus células, analizarlas y colocarlas sobre superficies sintéticas, al terminar los estudios las muestras serán desechadas, solo serán utilizadas en este estudio.

**Posibles riesgos y molestias:** No sufrirá ningún riesgo ni molestia asociados a este procedimiento.

**Posibles beneficios que recibirá al participar en el estudio:** Con su participación contribuirá al desarrollo de mejores superficies sintéticas que mejorarán la circulación.

**Participación o retiro:** Si tiene alguna duda puede preguntar, si desea no participar con su muestra en el estudio puede retirarse en el momento que quiera sin que afecte la atención médica recibida por parte del IMSS.

**Privacidad y confidencialidad:** Usted no será identificado, la muestra se manejará con número de folio durante su análisis y su nombre no aparecerá en ninguna presentación ni publicación que derive de este estudio, se mantendrá absoluta confidencialidad.

**Colección de tejido:**

**No autorizo que se tome la muestra del miembro amputado.**

**Si autorizo que se tome la muestra del miembro amputado solo para este estudio.**

**Si autorizo que se tome la muestra del miembro amputado para este estudio y estudios futuros.**

**Beneficios al término del estudio:** Ninguno en forma directa para usted.

**En caso de dudas o aclaraciones relacionadas con el estudio dirigirse a:**

**Investigador responsable:** José Carlos Alcocer Cañez, médico no familiar del Hospital General de Zona No. 30 del IMSS, matrícula 11075384, teléfono (686) 555 51 50 extensión 31329, en horario de 7:30 am a 2 pm de lunes a viernes.

**Colaboradores:**

Martha Teresa García López Portillo, Unidad de Ciencias de la Salud, UABC. Teléfono (686) 565 35 07, en horario de 4 a 7 pm de lunes a viernes.

Ernesto Alonso Beltrán Partida, Investigador del laboratorio de Biología celular del Instituto de Ingeniería UABC, teléfono (686) 566 41 50 extensión 120, en horario de 8 am a 6 pm de lunes a viernes.

Benjamín Valdez Salas, Jefe del laboratorio de Corrosión y materiales del Instituto de Ingeniería UABC, teléfono (686) 566 41 50 extensión 106, en horario de 8 am a 6 pm de lunes a viernes.

Ernesto Alonso Valdez Salas, Instituto de ingeniería UABC. Teléfono (686) 5 66 41 50, en horario de 8 am a 2 pm de lunes a viernes.

En caso de dudas o aclaraciones sobre sus derechos como participante podrá dirigirse a: Comisión de Ética de Investigación de la CNIC del IMSS: Avenida Cuauhtémoc 330 4º piso Bloque “B” de la Unidad de Congresos, Colonia Doctores. México, D.F., CP 06720. Teléfono (55) 56 27 69 00 extensión 21230, Correo electrónico: [comiteeticainv.imss@gmail.com](mailto:comiteeticainv.imss@gmail.com)

---

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del participante

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de quien obtiene el consentimiento

Testigo 1

Testigo 2

\_\_\_\_\_  
Nombre, dirección, relación y firma

\_\_\_\_\_  
Nombre, dirección, relación y firma

**Clave: 2810-009-013**