

Efecto de la sobreexpresión de angiogenina sobre células aisladas del menisco humano

Carlos Landa Solís,* María Cristina Velasquillo Martínez,** Homero García Pérez,*** José Clemente Ibarra Ponce de León****

* Investigador en Ciencias Médicas. Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación.

** Coordinadora de la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación.

*** Pasante de la Licenciatura en Biología de la UNAM.

**** Jefe de la Unidad de Ingeniería de Tejidos, Terapia Celular y Medicina Regenerativa del Instituto Nacional de Rehabilitación.

Dirección para correspondencia:
María Cristina Velasquillo Martínez
Instituto Nacional de Rehabilitación. Calzada México-Xochimilco Núm. 289, Col. Arenal de Guadalupe, 14389, México, D.F. Tel. 5999 1000, Ext. 19610
E-mail: mvelasquillo@inr.gob.mx
clementeibarra@yahoo.com

Este artículo puede ser consultado en versión completa en:
<http://www.medigraphic.com/rid>

Palabras clave: Fibrocondrocitos, angiogenina, CD34.

Key words: Fibrochondrocytes, Angiogenin, CD34.

Resumen

El menisco se caracteriza por su baja irrigación sanguínea, ya que el 75% recibe los nutrientes por difusión pasiva a través del fluido sinovial, por lo que la vascularización juega un papel primordial en la recuperación temprana de un menisco dañado. **Metodología:** De pacientes sometidos a meniscectomía, se aislaron y cultivaron fibrocondrocitos, los cuales se transfectaron con el vector adenoviral Ad-GFP-Ang. El nivel de expresión de la angiogenina, así como los cambios morfológicos que provoca la sobreexpresión, fueron evaluados por citometría de flujo. **Resultados:** Se obtuvo 90% de viabilidad al transfectar 4,500 MOI de Ad-GFP-Ang; estas células incrementaron la expresión del gen reportero de GFP, el cual se consideró un marcador directo de expresión de la proteína de angiogenina, induciendo cambios fenotípicos evidenciados por la expresión del antígeno de superficie CD34 ($p < 0.05$) y morfológicos, dados por el incremento de tamaño así como por la complejidad celular. **Conclusión:** La sobreexpresión del gen de angiogenina induce cambios fenotípicos y morfológicos que pudieran asociarse a una restauración pronta de una lesión del menisco.

Abstract

*The meniscus is characterized by low blood irrigation because 75% of the meniscus receives nutrients by passive diffusion through the synovial fluid, reason why the vasculature plays an essential role in early recovery of a damaged meniscus. **Methodology:** In patients undergoing meniscectomy, were isolated and cultured fibrochondrocytes which were transfected with adenoviral vector Ad-GFP-Ang. The angiogenin level expression as well as the morphological changes, caused by the overexpression of the latter were evaluated by flow cytometry. **Results:** We obtained 90% viability to transfected 4500 MOI of Ad-GFP-Ang, these cells increased the expression of GFP reporter gene which was considered a direct marker of protein expression of angiogenin, which induced phenotypic changes evidenced by expression of surface antigen CD34 ($p < 0.05$), and morphological, given by the increase in size and complexity of the cell. **Conclusion:** Over expression of angiogenin gene induces phenotypic and morphological changes that could be associated with early restoration of a meniscus injury.*

www.medigraphic.org.mx

Introducción

El menisco es una estructura fibrocartilaginosa en forma de C que permite la transmisión de cargas, absorción de impactos, estabilidad articular y congruencia articular, evitando el daño de la superficie femoral y articular tibial.¹ Histológicamente, está compuesto

principalmente por agua y un entramado de fibras de colágena y células dispuestas en una matriz de proteoglicanos y glicoproteínas.

Las células del menisco son responsables de sintetizar y mantener la matriz extracelular. Se han descrito dos poblaciones celulares que constituyen al menisco: una fusiforme, localizada en la superficie

del menisco, otra ovoidea o poligonal, dispuesta en el resto del mismo. A esta misma, se le ha llamado fibrocondrocito por su apariencia y por la capacidad de formar una matriz extracelular fibrosa.²

El aporte sanguíneo a los meniscos ocurre sólo en la región periférica pegada a la cápsula y es nula en la porción central; el 75% del menisco recibe los nutrientes por medio del fluido sinovial vía difusión pasiva.³ La escasa irrigación sanguínea ocasiona que sane pobremente después de una lesión,⁴ esto da como resultado que numerosas lesiones del tejido y la degeneración propia de la edad tiendan a ser permanentes, lo que provoca dolor y puede ocasionar daño en el cartílago vecino al fémur y la tibia, llevando al desarrollo temprano de osteoartritis;⁵ por lo tanto, la vascularización es importante para la recuperación de un menisco dañado.⁶ La angiogenina humana (ANGH) es un factor de crecimiento que se ha asociado con la formación de nuevos vasos sanguíneos mediante la activación de células endoteliales por la acción de estímulos angiogénicos, la invasión de células endoteliales activadas dentro de los tejidos y la migración, proliferación y diferenciación de células endoteliales para formar una nueva microvasculatura.⁷ Este factor posee, además, otras actividades no angiogénicas como la inhibición de la degranulación de neutrófilos y la estimulación de la esterificación de colesterol por células del músculo liso, y posiblemente, contribuye a los estados tempranos de la arteroesclerosis.⁸

Actualmente, se conoce poco acerca de los mecanismos que controlan su expresión en diferentes tejidos, tanto normales como patológicos.⁹ En nuestra unidad se ha construido un vector adenoviral deficiente en replicación que contiene una nueva isoforma del gen de angiogenina humana aislada de una biblioteca de cDNA obtenida de hepatoma humano. Esta nueva isoforma difiere de la ya reportada en el tejido hepático normal en la región 5'-UTR no traducida.¹⁰

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la sobreexpresión del vector adenoviral Ad-GFP-Ang en células aisladas del menisco humano *in vitro*. Este modelo permitirá proponer nuevas estrategias en la reparación del menisco y además evitará la meniscectomía en los pacientes que sufren lesiones en este tejido.

Material y métodos

Material biológico

Se obtuvieron diez muestras del menisco lateral o medial de los remanentes de meniscectomías realizadas

por ortoscopia en pacientes del Instituto Nacional de Rehabilitación (INR), que decidieron participar bajo consentimiento informado.

AISLAMIENTO Y CULTIVO DE LAS CÉLULAS DE MENISCO

En condiciones de esterilidad, cada muestra fue disgregada mecánicamente y sometida a una digestión enzimática con 0.3% de colagenasa tipo I (Worthington) en DMEM/F12 (GIBCO), durante 4 a 6 h a 37 °C y a una agitación constante de 200 rpm. Se centrifugaron 300 g por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el botón celular en 5 mL de medio DMEM/F12 suplementado con 10% de suero bovino fetal (SFB) (GIBCO) y antibiótico antimicótico al 1% (GIBCO). Los cultivos primarios se realizaron en cajas de 25 cm² (Corning), con medio DMEM/F12 suplementado con SFB (GIBCO) al 10% y antibiótico antimicótico al 1%. Las células fueron incubadas a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de humedad hasta alcanzar el 90% de confluencia. Posteriormente, las células fueron cosechadas con tripsina al 2.5% en EDTA ([53mM] GIBCO) y sembradas nuevamente en cajas de 25 cm² (Corning) para hacer un segundo pase y ser infectadas con los vectores adenovirales.

AMPLIFICACIÓN DE LOS VECTORES ADENOVIRALES «Ad-GFP y Ad-GFP-Ang»

El vector Ad-GFP (dirige la expresión de la proteína verde fluorescente como gen reportero) y el Ad-GFP-ANG (dirige la expresión de la proteína verde fluorescente a la misma intensidad que la expresión de la proteína de angiogenina) fueron producidos con el sistema AdEasy (Pharmingen, BD). Para su ampliación, se utilizaron células HEK293 (ATTC: CRL-1573), las cuales fueron cultivadas en una caja de 75 cm² (Corning), con DMEM-F12 con suero bovino fetal al 10% y antibiótico al 0.2% durante 3 días, después fueron transfectadas con Ad-GFP-Ang o Ad-GFP en medio de cultivo Opti-MEM (GIBCO) con 1% de antibiótico durante 2 h, incubadas y monitoreadas 48 h hasta observar un efecto citopático; enseguida fueron cosechadas empleando tripsina al 2.5% en EDTA ([53mM] GIBCO), colectadas y lisadas con tres ciclos de congelamiento (hielo seco, dióxido de carbono [CO₂] en estado sólido) y calentamiento (descongelamiento en baño María a 37 °C). Con el sobrenadante se infectaron las células HEK293 sembradas en 5 cajas de 75 cm² (Corning) con una confluencia del 80%. A 24 horas de la infección, las células se recuperaron de las cajas desprendiéndolas mecánicamente y se lisaron

por tres ciclos de congelamiento y calentamiento. El lisado celular se almacenó a -80 °C hasta su uso.

PURIFICACIÓN DE LOS VECTORES ADENOVIRALES Ad-GFP-Ang y Ad-GFP

Para purificar los vectores adenovirales (Ad-GFP-Ang y Ad-GFP), se utilizó el kit de purificación Adeno-X Virus (BD Biosciences) de acuerdo con el protocolo establecido por BD Biosciences. Los adenovirus fueron preservados en congelación a -80 °C.

TITULACIÓN POR DENSIDAD ÓPTICA DE Ad-GFP-Ang y Ad-GFP

Se determinó el título viral (cantidad de virones/mL) por densidad óptica, según lo publicado por el Adenovirus Reference Material Working Group Meeting, Sep-05-01 meeting minutes. Se utilizó un espectrofotómetro Gene Quant Pro (Amersham Biosciences) con longitud de onda de 260 nm. Se utilizó la siguiente fórmula:

Partículas virales = OD_{260 nm} x dilución/9.09 x 10⁻¹³

INFECCIÓN DE LAS CÉLULAS DE MENISCO

Las células aisladas del menisco y cultivadas en segundo pase fueron infectadas con un vector control Ad-GFP y el Ad-GFP-ANG por separado a 4,000, 4,500, 5,000, 5,500, 6,000 y 7,000 MOI' (múltiplo de infección, número de partículas virales por célula) y se incubaron por 2 h a 37 °C con 5% de CO₂ en medio Opti-MEM sin suero. Posterior a la infección, se retiró el medio con el virus y se adicionó medio DMEM con SFB al 10% y se mantuvieron en incubación durante 48 h.

EFICIENCIA DE TRANSFECCIÓN

La eficiencia de infección del Ad-GFP-Ang se determinó 48 h después de la transfección, para lo cual se cosecharon las células con tripsina al 0.2% y se lavaron con PBS. Las células se centrifugaron a 300 g durante 5 min. El botón celular se resuspendió con 10 µL de 7ADD para determinar la viabilidad celular y 5µL de anticuerpo monoclonal anti-CD34 conjugado con ficoeritrina (BD Pharmingen), se incubó en oscuridad a temperatura ambiente durante 10 minutos. El análisis se realizó mediante citometría de flujo con el equipo FACS Calibur (Beckton & Dickinson, CA). El cálculo del índice medio de fluorescencia, así como los promedios del tamaño relativo (FSC-Height) contra granularidad relativa (SSC-Height) se realizaron

utilizando el software Cell Quest. Los resultados se analizaron en gráficos de puntos o citogramas, donde se observó el total de células positivas y negativas marcadas con Ad-GFP-Ang/CD34/7ADD. Se contabilizaron 10,000 eventos por muestreo, tanto en cultivo primario como en primer y segundo pases a diferentes MOI del adenovirus.

Análisis estadístico

Para las muestras de citometría de flujo en segundo pase, se utilizó la prueba de T para muestras independientes, tomando como valor significativo $p < 0.05$. Se utilizó el programa *Statistica* versión 7.

Resultados

Viabilidad celular

El peso promedio de las muestras de tejido fibrocartilaginoso obtenido por menisectomía parcial o total fue de 1.145 g. Se realizó el conteo celular recuperando en promedio 1.5×10^6 células. Se registró un porcentaje de viabilidad celular del 85.35% por la prueba de exclusión de azul de tripano.

Eficiencia de infección del Ad-GFP-Ang

La máxima eficiencia de transfección se obtuvo a los 4,500 MOI con un promedio de infección de 80.37% de fluorescencia de la proteína verde fluorescente (GFP) (*Figura 1*) y un promedio de viabilidad del 98% (*Cuadro I*), lo que pone de manifiesto que con el 80% de las células infectadas que están expresando la proteína verde fluorescente, el efecto citopático de las células aisladas del menisco es mínimo.

Complejidad y tamaño celular

Con el fin de determinar si la infección adenoviral provocó cambios en el tamaño o complejidad celular, se realizó una comparación entre los promedios registrados para tamaño relativo celular (FSC) y complejidad relativa celular (SSC) mediante citometría de flujo (*Cuadro II*). De las tres poblaciones muestreadas, el control negativo (células sin infectar) y positivo (células infectadas con el Ad-GFP a 4,500 MOI) se comportaron de manera homogénea, mostrando valores semejantes de complejidad (SSC) y de tamaño (FSC), siendo poblaciones más concentradas en un área; esto significa que son homogéneas en su complejidad y tamaño, mientras que la población tratada con el Ad-GFP-Ang

a 4,500 MOI se comportó de una manera distinta al momento de graficar, mostrando una población con diferencias estadísticamente significativas en su complejidad e incrementada en su tamaño respecto a los controles (*Figura 2*).

Expresión del antígeno de superficie CD34

Para determinar si la sobreexpresión del gen de angiogenina humana modifica la expresión del antígeno de superficie CD34 de las células aisladas del menisco

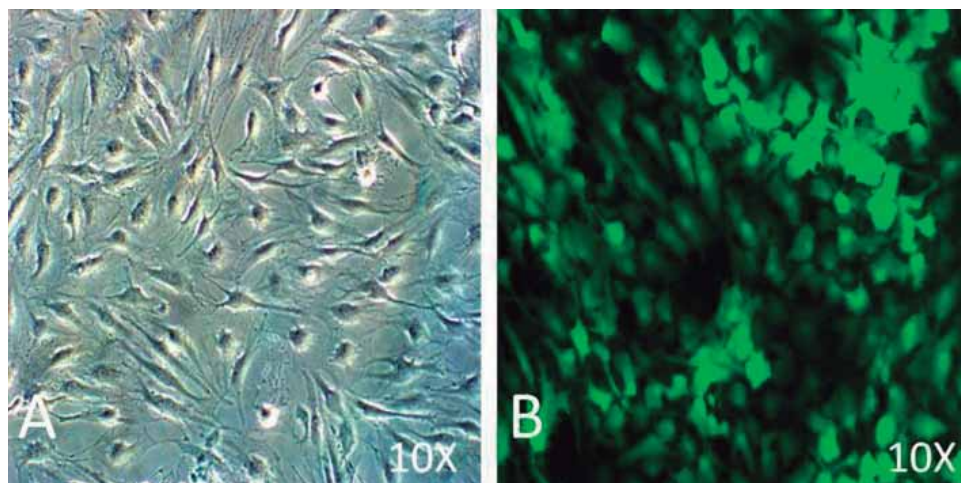


Figura 1. A) Microscopia óptica en el campo claro de células del menisco humano en cultivo primario a una semana de postdigestión enzimática. B) Microscopia de fluorescencia donde se observan las células transfectadas por el Ad-GFP-Ang en segundo pase de cultivo. Imagen en color en: www.medigraphic.com/rid

Cuadro I. Eficiencia de la transfección de células del menisco con Ad-GFP-Ang.

MOI	4,000	4,500	5,000	5,500	6,000	7,000
Segundo pase GFP	75%	80%	77%	72%	77%	75%
Viabilidad 2º pase	93%	98%	84%	83%	80%	83%

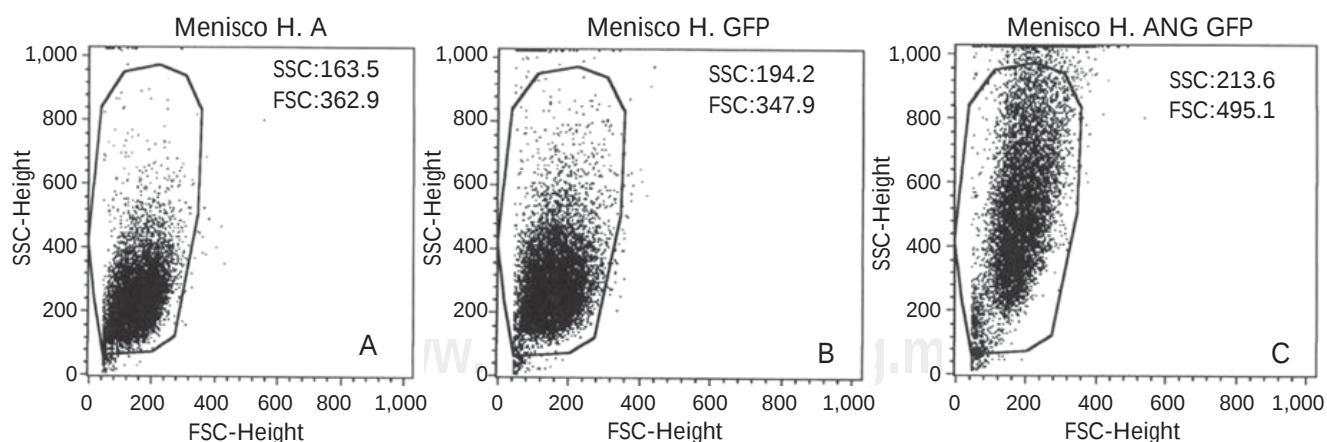


Figura 2. Parámetros del tamaño relativo (FSC-Height) contra granularidad relativa (SSC-Height) de células del menisco cultivadas. A) Población de células aisladas del menisco humano en segundo pase sin transfección. B) Población de células aisladas del menisco humano en segundo pase e infectadas con el Ad-GFP. C). Población de células aisladas del menisco humano en segundo pase infectadas con el Ad-GFP-Ang.

Cuadro II. Cambios en el tamaño (FSC) y complejidad celular relativa (SSC) en células de menisco humano cultivado en segundo pase.

	Células sin infectar	Células infectadas con AdGFP	Células infectadas con AdGFP-Ang
FSC tamaño	163.5	194.23	213.62
SSC complejidad	362.93	347.93	495.19*
* p < 0.05			

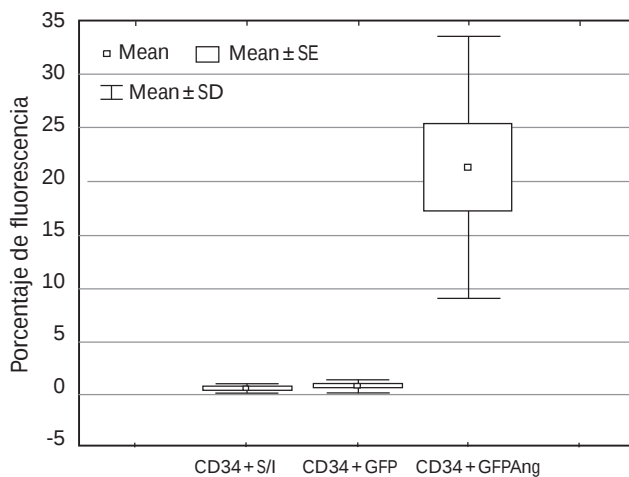


Figura 3. Comparación de los porcentajes de fluorescencia entre 3 poblaciones celulares en 2º pase y positivas al marcador de superficie CD34.

humano, se realizó la cuantificación del CD34 mediante citometría de flujo. El grupo control presentó un promedio del 0.5% de células positivas a CD34; para el caso de las células infectadas con Ad-GFP a una concentración de 4,500 MOI's; el promedio de las células positivas al CD34 fue del 0.7%. Al ser comparadas las células sin infectar y las infectadas con el Ad-GFP contra las células infectadas con el Ad-GFP-Ang, éstas presentan diferencias estadísticamente significativas, ya que el promedio de células positivas para el CD34 fue del 21.3% (Figura 3).

Discusión

Al comparar los parámetros para el tamaño relativo celular (FSC) y la complejidad relativa celular (SSC) por citometría de flujo entre las células no infectadas, las infectadas con el vector control (que sólo expresan

la proteína verde fluorescente), y las células infectadas con el vector que promueven la síntesis de angiogenina en una proporción igual a la proteína verde fluorescente; estas últimas presentaron diferencias estadísticamente significativas en lo que respecta a la complejidad celular respecto a los controles, así como también un incremento en el tamaño celular de éstas, lo que determina el efecto de la angiogenina sobre la morfología de las células aisladas del menisco humano cultivadas *in vitro* (Figura 2).

En el 2005, Peter Verdonk y cols.¹² publicaron la caracterización fenotípica de los fibrocondrocitos humanos en cultivos de alginato y en monocapa, siendo CD44(+), CD105(+), CD34(-) y CD31(-).⁹ En nuestro trabajo, se estableció el porcentaje del marcador de superficie CD34, el cual es un antígeno glicoproteico transmembranal de una sola cadena, mismo que se expresa en células precursoras hematopoyéticas y células endoteliales.¹²⁻¹⁴ Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Verdonk, ya que ambos controles fueron negativos para el CD34, pero en el caso de las células transfectadas con el Ad-GFP-Ang existe una diferencia estadísticamente significativa en comparación con los controles, así como también se observaron cambios en la complejidad y tamaño celular por citometría de flujo en las células transfectadas con el Ad-GFP-Ang al ser comparadas contra las células controles.

El incremento en el porcentaje de células detectadas como CD34+ podría sugerir que una población de estas células adquirió un fenotipo de célula endotelial, lo que abre la posibilidad para que en posteriores estudios se profundice más en este efecto de la infección con el Ad-GFP-Ang sobre las células aisladas del menisco humano.

Conclusiones

La transferencia y expresión del gen verde fluorescente en células aisladas del menisco humano mediante adenovirus pudo ser cuantificada por citometría de flujo. Los altos porcentajes de transfección con el vector Ad-GFP-Ang (80% en promedio) pueden reflejar elevados niveles de expresión de angiogenina en las células aisladas de menisco, lo cual puede explicar los cambios en la relación tamaño-granularidad contra los controles, así como la expresión del antígeno de superficie CD34.

Este conocimiento puede ser aplicado a diversas áreas en la ingeniería de tejidos, proveyendo herramientas prácticas para la regeneración del menisco en la región avascular, así como su reparación en todas las zonas dañadas.

Bibliografía

1. Rath E, Richmond JC. The menisci: basic science and advances in treatment. *Br J Sports Med* 2000; 34 (4): 252-257.
2. Webber RJ. *In vitro* culture of meniscal tissue. *Clin Orthop Relat Res* 1990; 252: 114-117.
3. Messner K, Gao J. The menisci of the knee joint. Anatomical and functional characteristics and a rationale for clinical treatment. *J Anat* 1998; 193 (Pt 2): 161-178.
4. Felson DT. Arthroscopy as a treatment for knee osteoarthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2010; 24 (1): 47-50.
5. King TV, Vallee BL. Neovascularization of the meniscus with angiogenin. An experimental study in rabbits. *J Bone Joint Surg* 1991; 73 (4): 587-590.
6. Aufder Heide AC, Athanasiou KA. Mechanical stimulation toward tissue engineering of the knee meniscus. *Ann Biomed Eng* 2004; 32 (8): 1161-1174.
7. Zheng MH, King E, Kirilak Y, Huang L, Papadimitriou JM, Wood DJ, Xu J. Molecular characterization of chondrocytes in autologous chondrocyte implantation. *Int J Mol Med* 2004; 13 (5): 623-628.
8. Pyatibratov MG, Tolkatchev D, Plamondon J, Xu P, Ni F, Kostyukova AS. Binding of human angiogenin inhibits actin polymerization. *Arch Biochem Biophys* 2010; 495 (1): 74-81.
9. Miller JC, Pien HH, Sahani D, Sorensen AG, Thrall JH. Imaging angiogenesis: applications and potential for drug development. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97 (3): 172-187.
10. Moore F, Riordan JF. Angiogenin activates phospholipase C and elicits a rapid incorporation of fatty acid into cholesterol esters in vascular smooth muscle cells. *Biochemistry* 1990; 29 (1): 228-233.
11. Neznanov NS, Makarova IV, Kramerova IA, Bendukidze KA, Bozhkov VM, Gazarian KG. Several copies of angiogenin gene are present in the mammalian genome. *Mol Biol (Mosk)* 1990; 24 (3): 709-715.
12. Verdonk PCM, Forsythz RG, Wangy J, Almqvistx KF, Verdonkx R, Veysy EM, Verbruggeny G. Characterization of human knee meniscus cell phenotype. *Osteo Arthritis and Cartilage* 2005; 13: 548-560.
13. Lansdorp PM, Dougherty GJ, Humphries RK. CD34 epitopes. In: Knapp W, Dörken B, Gilks WR. *Leucocyte typing IV: white cell differentiation antigens*. New York, NY: Oxford University Press; 1989: 826-827.
14. Loken MR, Shah VO, Dattilio KL, Civin CI. Flow cytometric analysis of human bone marrow. II Normal B-lymphocyte development. *Blood* 1987; 70: 1316-1324.