

# Estudio del efecto angiogénico del antígeno excretor/secretor de *Dirofilaria immitis* en células endoteliales humanas

## INTRODUCCIÓN

La angiogénesis es un proceso en el que se forman nuevos vasos sanguíneos debidos a procesos obstructivos inflamatorios o hipoxia en donde la migración, crecimiento y diferenciación endotelial son especialmente importantes (Ollauri- Ibáñez et al., 2017). Las células angiogénicas son capaces de producir VEGF tras ser hipóxicas como estímulo para llevar a cabo esta remodelación vascular (Patel-Hett y D'Amore, 2011). Estos estímulos se producen en infecciones causadas por *Dirofilaria immitis* que causa la dirofilariosis cardiopulmonar canina obstruyendo la arteria pulmonar (Morchón et al., 2012). El objetivo fue estudiar el efecto del antígeno excretor/secretor de *D. immitis* sobre la angiogénesis en un modelo *in vitro* de células endoteliales humanas (HUVEC).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestras biológicas:

- Antígeno excretor/secretor de vermes adultos de *D. immitis* (DiES).
- Human recombinant VEGF (MERCK 32160405)
- Células endoteliales humanas HUVEC.

### Cultivos celulares HUVEC:

- ✓ Medio EBM-2 suplementado con BS, hidrocortisona, hFGF-B, VEGF, R3-ICF, ácido ascórbico, hEGF, GA-100, heparina, penicilina y estreptomina a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Las placas para expansión celular tratadas con gelatina de cerdo (0.1%), fibronectina (0,01%) y colágeno (0,01%) durante 4 horas.
- ✓ Se emplearon cultivos HUVECs no tratados (control) y tratados con VEGF, DiES y DiES+VEGF durante 24 h por triplicado.

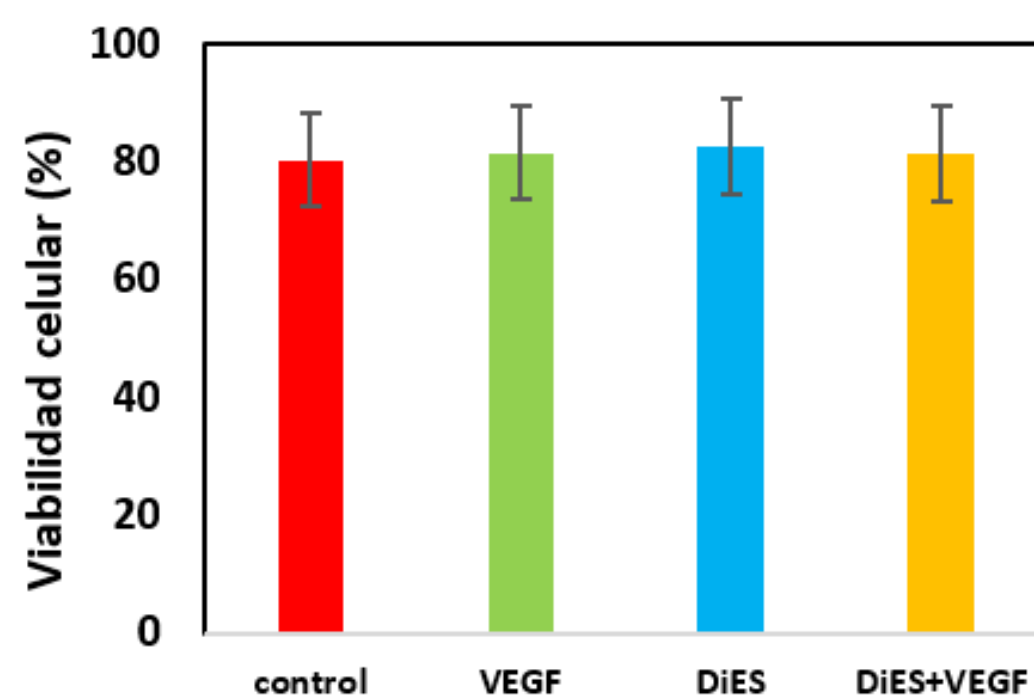
### Análisis

- Citotoxicidad y viabilidad celular.
- Análisis de VEGFR1 (anti-) y VEGFR2 (pro-angiogénico) por ELISA.
- Migración celular (*Wound Healing*) entre 0-6 h.
- Proliferación celular mediante MTT en 10 días.
- Formación de pseudocapilares con Matrigel® en 4 h.
- Análisis estadísticos mediante t-Student. Los resultados representan la media ± SD de 3 experimentos independientes.

## RESULTADOS

### 1. Viabilidad celular.

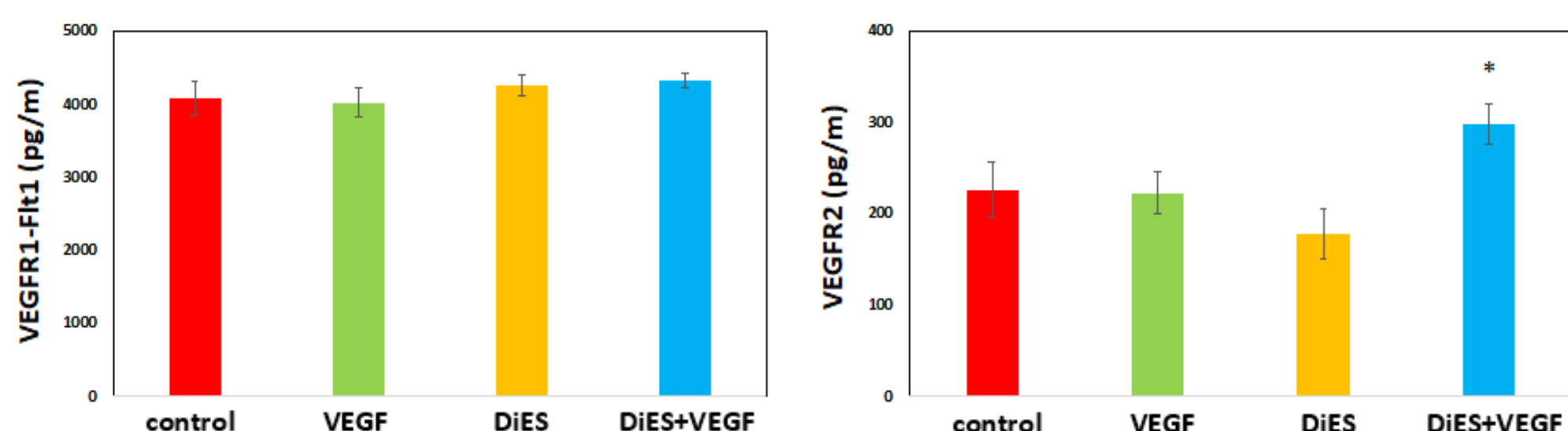
El efecto de los estímulos no produjo efecto citotóxico (Fig. 1).



**Figura 1.** Representación gráfica del porcentaje de viabilidad de las HUVEC después de ser tratadas con VEGF, DiES y DiES+VEGF durante 24 horas. Células no tratadas (c-) como control.

### 2. Análisis VEGFR1-Flt1 (anti-) y VEGFR2 (proangiogénico).

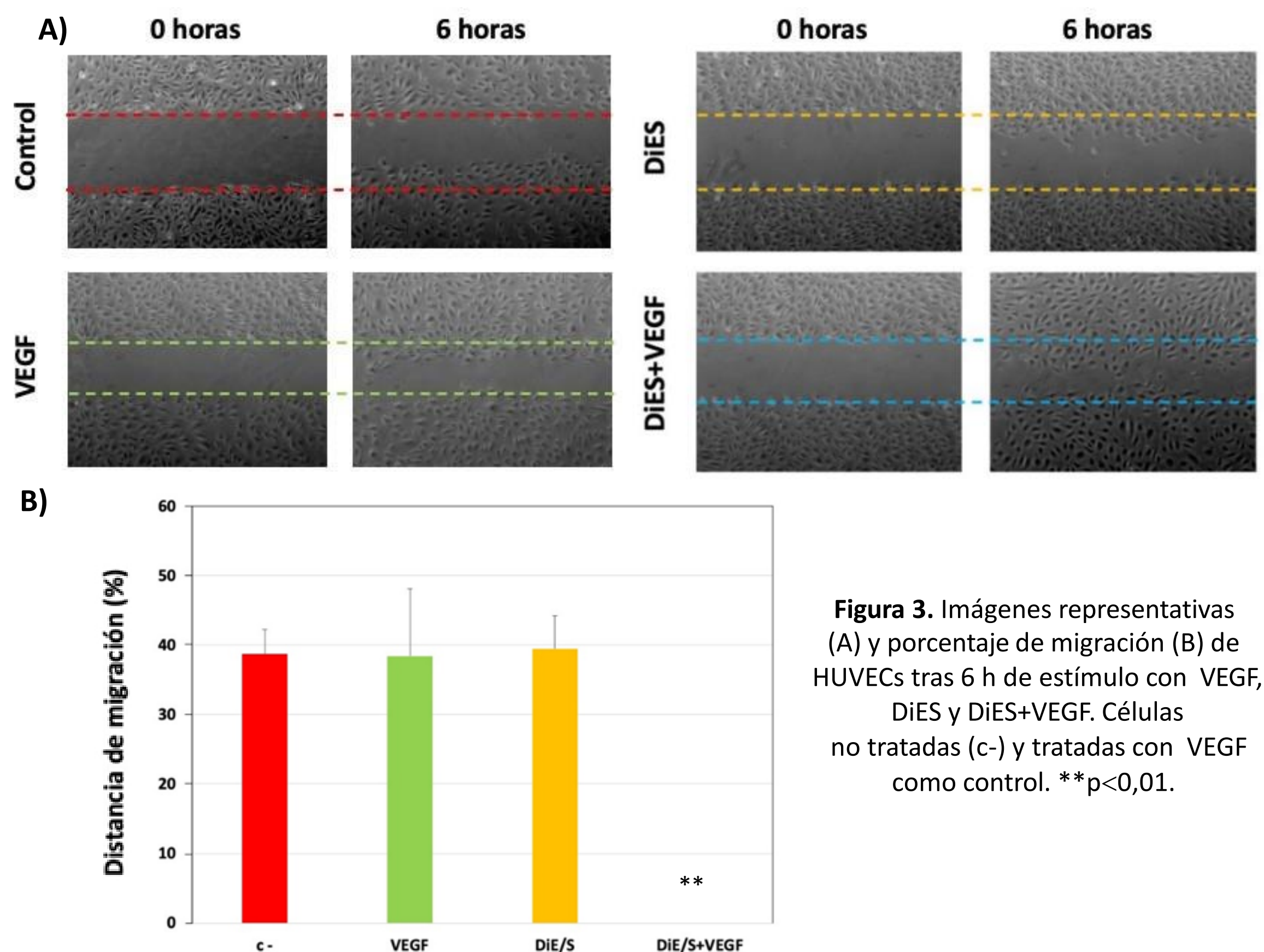
El efecto de DiES+VEGF reportó sobre VEGFR-2 diferencias significativas con el resto de tratamientos y el control ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.** Representación gráfica de producción de VEGFR1 y VEGFR2 en HUVEC después de ser tratadas con DiES y VEGF durante 24 horas. Células no tratadas y tratadas con VEGF como control. \*  $p < 0,05$ .

### 3. Migración celular.

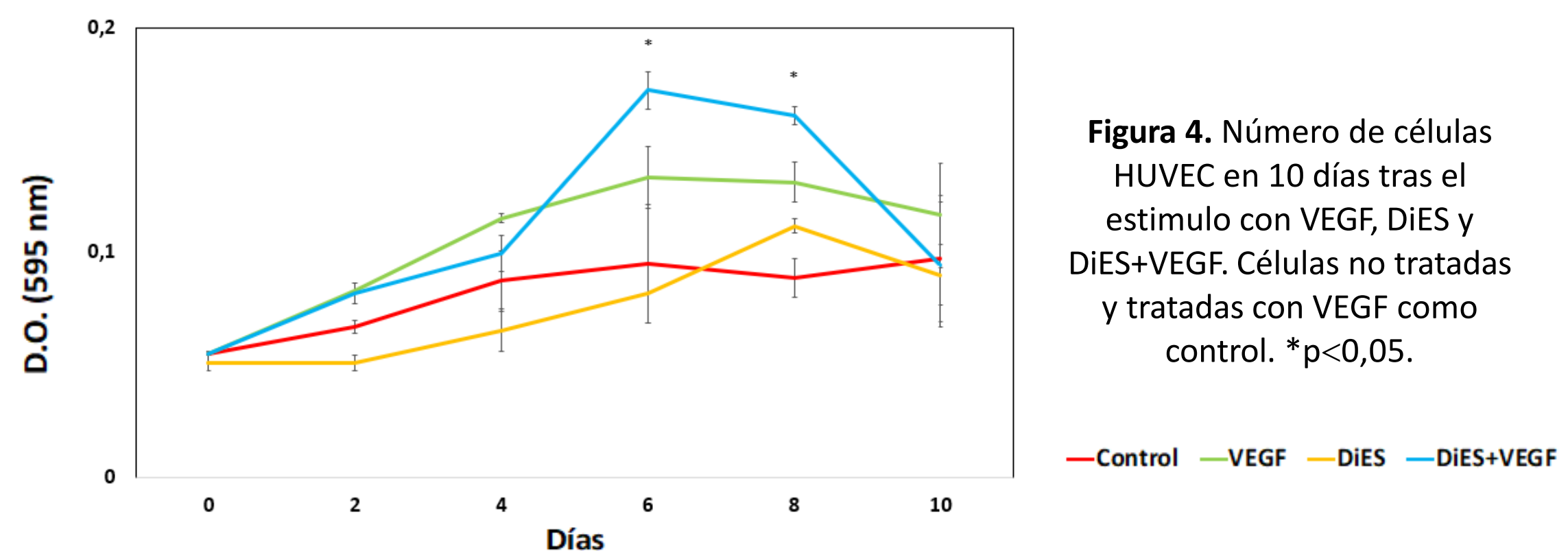
El efecto de DiES+VEGF produjo un aumento significativo en la migración celular en comparación con el resto de estímulos y células control ( $p < 0,01$ ) (Figura 3).



**Figura 3.** Imágenes representativas (A) y porcentaje de migración (B) de HUVECs tras 6 h de estímulo con VEGF, DiES y DiES+VEGF. Células no tratadas (c-) y tratadas con VEGF como control. \*\*  $p < 0,01$ .

### 4. Proliferación celular.

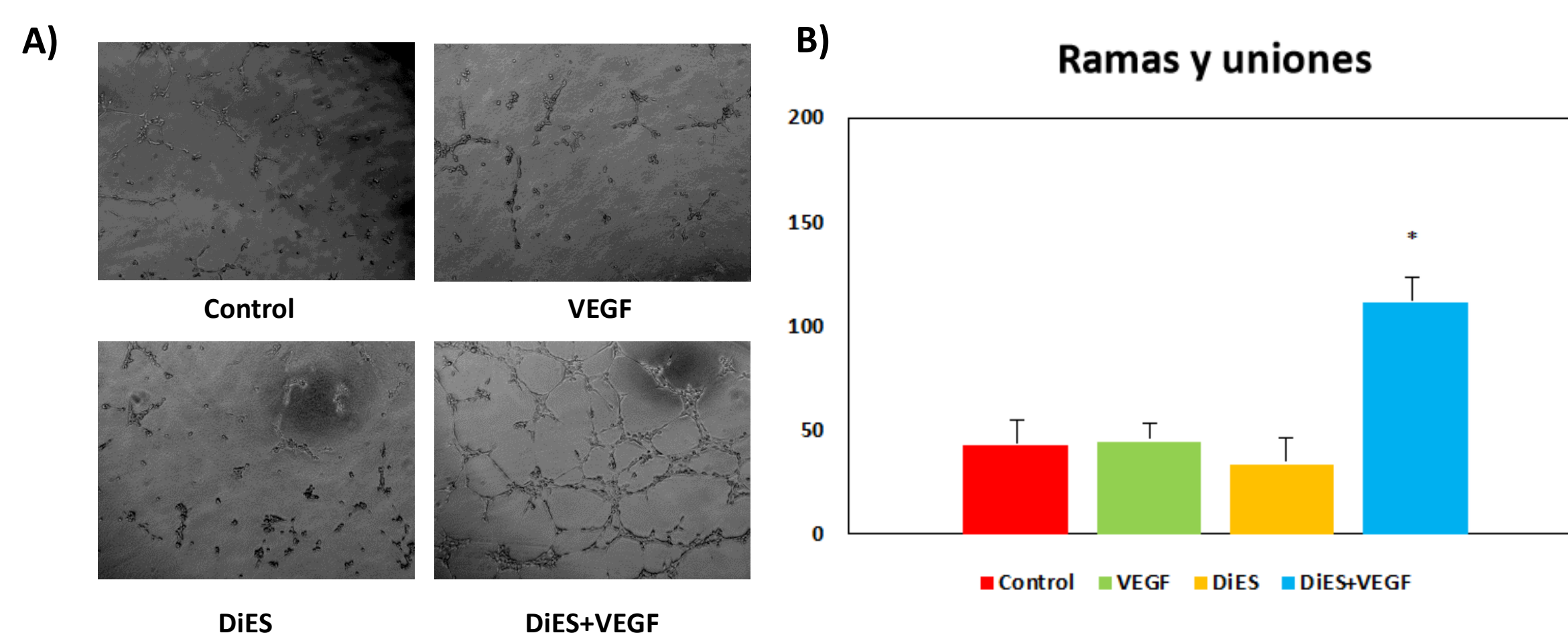
El efecto de DiES+VEGF produjo un aumento significativo en la proliferación celular en comparación con el resto de estímulos entre los días 6 y 8 ( $p < 0,05$ ) (Figura 4).



**Figura 4.** Número de células HUVEC en 10 días tras el estímulo con VEGF, DiES y DiES+VEGF. Células no tratadas y tratadas con VEGF como control. \*  $p < 0,05$ .

### 5. Formación de pseudocapilares.

El efecto de DiES+VEGF produjo un aumento significativo en la formación de pseudocapilares en comparación con el resto de estímulos ( $p < 0,05$ ) (Figura 5).



**Figura 5.** Imágenes representativas (A) y formación de estructuras pseudotubulares y conexiones celulares en placas de Matrigel® (B) a las 4 horas de estimular con VEGF, DiES y DiES+VEGF. Células no tratadas (c-) y tratadas con VEGF como control. \*  $p < 0,05$ .

## CONCLUSIÓN

El antígeno excretor/secretor de vermes adultos de *Dirofilaria immitis* junto con VEGF parecen actuar como estimulante proangiogénico, lo que podría permitir y favorecer su supervivencia en el sistema vascular.