

ORIGINAL

La depleción de células CD34⁺/CD144⁺ en pacientes de revascularización miocárdica no está mediada por un aumento de la apoptosis inducida por el TGF-beta plasmático[☆]

Marta Ramajo ^a, Santiago Redondo ^{a,b,*}, Álvaro González-Rocafort ^c, Jorge Navarro-Dorado ^a, Fernando Reguillo ^c, Manuel Carnero ^c, José Martínez-González ^d, Enrique Rodríguez ^c y Teresa Tejerina ^{a,*}

^a Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid, España

^b Servicio de Hematología, Hospital Nuestra Señora de Sonsoles, Ávila, España

^c Servicio de Cirugía Cardíaca, Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid, España

^d Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC-ICCC), Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España

Recibido el 14 de octubre de 2011; aceptado el 17 de octubre de 2011

Disponible en Internet el 9 de diciembre de 2011

PALABRAS CLAVE

Células progenitoras endoteliales;
Apoptosis;
Factor de crecimiento transformante beta;
Farmacología cardiovascular

Resumen

Introducción: La arteriosclerosis coronaria se ha relacionado con la depleción y la alteración funcional de las células progenitoras endoteliales (EPC). Nos propusimos determinar el número de células CD34⁺/KDR⁺ y CD34⁺/CD144⁺ en pacientes sometidos a revascularización miocárdica quirúrgica, comparados con pacientes operados de recambio valvular, así como el efecto de su plasma sobre EPC cultivadas de donantes sanos.

Métodos: El número de CD34⁺/KDR⁺ y CD34⁺/CD144⁺ se determinó por citometría de flujo. Las EPC cultivadas se obtuvieron de residuos leucoplaquetarios transfusionales. La apoptosis se midió por fragmentación de ADN. La expresión de CD34 y CD144 se determinó por Western blot.

Resultados: Encontramos un menor número de CD34⁺/CD144⁺ en pacientes revascularizados comparados con los de recambio valvular, pero en ambos casos fue un número mayor que el hallado en sujetos sanos. El plasma de pacientes revascularizados tuvo un efecto antiapoptótico sobre EPC de sujetos sanos (al día 7 de aislamiento), y este efecto fue inhibido por los bloqueadores de la vía del TGF-beta1 SIS3 y SB-431542. Previo a ello, en el día 4, el plasma de los pacientes revascularizados aumentó la expresión *in vitro* de CD34 y CD144.

Conclusión: El plasma de los pacientes revascularizados es antiapoptótico y aumenta la expresión de CD34 y CD144 en EPC de donantes sanos. Por lo tanto, el número subóptimo de CD34⁺/CD144⁺ que se observa *in vivo* sugiere un defecto en su liberación de la médula ósea.

© 2011 Elsevier España, S.L. y SEA. Todos los derechos reservados.

[☆] Parte de este trabajo fue presentado como póster en el XXIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Arteriosclerosis (Córdoba, 9-11 de junio de 2010) y galardonado con una Mención Especial (13/30).

* Autor para correspondencia.

Correos electrónicos: santiredondo@hotmail.com (S. Redondo), teje@med.ucm.es (T. Tejerina).

KEYWORDS

Endothelial progenitor cells;
Apoptosis;
Transforming growth factor beta;
Cardiovascular pharmacology

CD34⁺/CD144⁺ cell depletion in coronary artery bypass patients is not related to increased apoptosis by plasmatic TGF-beta**Abstract**

Introduction: Coronary atherosclerotic disease has been linked to endothelial progenitor cell (EPC) depletion and functional impairment. We assessed the number of CD34⁺/KDR⁺ and CD34⁺/CD144⁺ cells in coronary artery bypass grafting (CABG) patients, compared to valvular patients, and the apoptotic effect of the plasma from these two groups on early outgrowth cells (EOCs) from healthy donors.

Methods: CD34⁺/KDR⁺ and CD34⁺/CD144⁺ cell numbers were assessed by flow cytometry. EOCs were obtained from buffy coats from healthy donors. Apoptosis was measured as DNA fragmentation. In vitro expression of CD34 and CD144 was assessed by Western blot.

Results: We found a lower number of CD34⁺/CD144⁺ cells in CABG patients compared to valvular, but a higher number compared to healthy controls. Plasma from CABG patients decreased apoptosis in cultured EOCs from healthy donors (day 7); this effect was abrogated by the TGF-beta1 blockers SIS3 and SB-431542. Prior to apoptosis protection, in cultured cells from healthy donors (day 4), plasma from CABG increased CD34 and CD144 expression, contrary to what found in the blood of the patients.

Conclusions: CABG patients possess a lower number of CD34⁺/CD144⁺ cells than valvular ones. Plasma from CABG patients is antiapoptotic for EOCs from healthy donors and increases the expression of both CD34 and CD144. Suboptimal number of CD34⁺/CD144⁺ in vivo may be mediated by a primary bone marrow defect rather than a deleterious effect of plasma.

© 2011 Elsevier España, S.L. and SEA. All rights reserved.

Introducción

La arteriosclerosis es la primera causa de mortalidad global¹. Investigaciones recientes ponen de manifiesto la importancia de las células progenitoras endoteliales (EPC) en la patogenia de esta enfermedad². Diversos estudios muestran que existe un menor número, tanto de CD34⁺/KDR⁺ como de CD34⁺/CD144⁺, en los pacientes con enfermedad coronaria. Esta disminución parece estar relacionada no solo con los factores de riesgo clásicos, sino que tiene una relación directa con la obstrucción coronaria medida por coronariografía⁵, y es capaz de predecir futuros síndromes coronarios agudos⁶. Sin embargo, otros estudios muestran que hay un mayor número de EPC en relación con la arteriosclerosis⁷. Esta aparente discrepancia se puede explicar por la oscilación que parece existir en el número de EPC en respuesta a la isquemia⁸. Se ha postulado que estas células se liberan de la médula ósea en respuesta a la isquemia en los estadios iniciales de la enfermedad, viéndose posteriormente disminuidas a consecuencia de una liberación subóptima^{9,10}. Las EPC pueden cultivarse a partir de la sangre periférica. No obstante, no existe aún una única definición de consenso de las EPC, según los marcadores que presenten y las condiciones de cultivo. En los años recientes se ha ido comprobando que la mayoría de las condiciones de cultivo corresponden a un subtipo de células cuyo papel mayoritario es el apoyo de la angiogénesis por parte de las células endoteliales residentes mediante la secreción de citoquinas². A pesar de esta limitación, se ha comprobado que el comportamiento *in vitro* de estas células cultivadas corre paralelo a su función *in vivo*, y estas células tienen una posible utilidad terapéutica en procesos isquémicos². Se ha observado una mayor apoptosis

en EPC cultivadas de pacientes arterioscleróticos, especialmente de diabéticos^{11,12}. De hecho, en experimentos *in vitro* se ha comprobado que la hiperglucemia dificulta la adhesión de estas células sobre arterias humanas en condiciones de flujo¹³. Más aún, las EPC cultivadas a partir de la sangre periférica de pacientes diabéticos tienen alteradas sus capacidades de adhesión y migración, con una menor incorporación a los vasos dañados¹⁴.

El factor de crecimiento transformante beta (TGF-β1) es una citoquina que regula múltiples funciones en el organismo, y su fisiología parece estar alterada en la arteriosclerosis. En células endoteliales, el TGF-β1 puede tener un efecto antiapoptótico mediante la señalización por los segundos mensajeros Smad2/3¹⁵ y ALK-4¹⁶. En EPC el TGF-β1 se considera un mediador importante, ya que parece promover la supervivencia de las mismas en pacientes con shock traumático¹⁷. Sin embargo, se desconoce aún si este mecanismo fisiológico protector tiene lugar en la arteriosclerosis.

Por todo ello, en este trabajo nos propusimos determinar si se produce una liberación subóptima de EPC (CD34⁺/KDR⁺ y CD34⁺/CD144⁺) en pacientes con arteriosclerosis demostrada mediante coronariografía. También intentamos establecer si el plasma de estos pacientes era capaz de tener un efecto antiapoptótico sobre EPC de donantes sanos, ya que la modulación de este efecto protector podría tener interés terapéutico.

Material y métodos

Diseño clínico

Se reclutaron los pacientes del Servicio de Cirugía Cardiaca del Hospital Clínico Universitario San Carlos, Madrid,

en el periodo de mayo de 2007 a mayo de 2009. Los criterios de exclusión fueron: insuficiencia renal o hepática severa, cirugía cardiaca previa, ausencia de coronariografía previa, cáncer o enfermedades autoinmunes, cirugía mixta de revascularización miocárdica y de recambio valvular. El objetivo era comparar pacientes sometidos a cirugía de revascularización, con demostración angiográfica de enfermedad coronaria, con pacientes sometidos a recambio valvular, con demostración angiográfica de ausencia de enfermedad coronaria. Se analizaron finalmente los datos de 51 pacientes revascularizados y 49 de recambio valvular. Como cohorte de sujetos sanos (en los que no se hizo cateterismo por razones éticas evidentes), se eligió a un grupo de 27 trabajadores de la compañía Bosch España (Madrid), asintomáticos y sin ningún factor de riesgo cardiovascular. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital Clínico San Carlos, cumpliendo la Declaración de Helsinki. En todos los casos existió consentimiento informado.

Citometría de flujo

El porcentaje de células CD34⁺/KDR⁺ y CD34⁺/CD144⁺ se determinó en sangre periférica preoperatoria, según un protocolo ya publicado¹⁸. Las muestras de sangre se extrajeron antes de la cirugía en tubos EDTA-Vacutainer®. Entonces se añadieron 10 µl de los respectivos anticuerpos a cada alícuota de 100 µl de sangre. Estos anticuerpos fueron: anti-isotipo IgG_{1k} de ratón (555748 Becton-Dickinson, Franklin Lakes, Estados Unidos), anti-isotipo IgG_{1k} de ratón conjugado con isociocianato de fluoresceína o FITC (555748 Becton-Dickinson, Franklin Lakes, Estados Unidos), anti-isotipo IgG₁ de ratón conjugado con ficoeritrina (IC002P, R&D Systems, Minneapolis, Estados Unidos), anti-isotipo IgG_{2B} de ratón conjugado con ficoeritrina (IC0041P, R&D Systems, Minneapolis, Estados Unidos), anti-CD34 IgG_{1k} de ratón conjugado con FITC (555821, Becton Dickinson), anti-VEGF-R2 IgG₁ (anti-KDR) de ratón conjugado con ficoeritrina (FAB357P, R&D Systems) y anti-CD144 IgG_{2B} (anti-VE-cadherina) conjugado con ficoeritrina (FAB9381P, R&D Systems). Las mezclas de sangre y anticuerpo se incubaron durante 30 min a 4 °C y protegidas de la luz. Posteriormente, los hematíes se lisaron mediante incubación durante 10 min con una solución de lisis comercial (347691-MSDS-A, Becton Dickinson), a temperatura ambiente y protegidos de la luz. Se lavaron con PBS y se analizaron dentro de las 24 h siguientes. Este análisis se hizo en un citómetro de flujo FACScalibur (número de serie E2295, Becton Dickinson, San Jose, Estados Unidos). Se hizo una selección de células mononucleares, como se muestra en la figura 1, panel A. El análisis se hizo con el programa CellQuestPro®. Los perfiles representativos de citometría en cada condición (control IgG, CD34⁺/KDR⁺ y CD34⁺/CD144⁺) se muestran en la figura 1, paneles B, C y D. Los técnicos de citometría no conocían el origen ni el grupo de cada muestra.

Determinación de citoquinas en plasma

Los niveles de kit de citoquinas se midieron mediante kits de ELISA. En el de TGF-β1 se utilizó la medición de la citoquina total (libre y unida a proteína de unión), que ha demostrado mayor reproducibilidad en muestras humanas¹⁹.

Para el SDF-1 se utilizó plasma pobre en plaquetas, según las instrucciones del fabricante. Se determinó también la concentración plasmática de IL-6 y TNF-α, dado que las concentraciones de estas citoquinas se alteran de forma notable en la cirugía cardiaca²⁰.

Aislamiento y cultivo de EPC

Las EPC se cultivaron según un método ya descrito¹¹. Las células mononucleares de sangre periférica se separaron en gradiente de densidad de la solución separadora Ficoll® (GE-Healthcare, Madrid, España) a partir de residuos leucoplquetarios, subproductos de material transfusional de donantes sanos (Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid). Las células mononucleares se sembraron a una densidad de 10⁶ células/cm² sobre placas de cultivo celular recubiertas de una solución de fibronectina a 10 µg/ml (Tebu-Bio, Offenbach, Alemania), y mantenidas con medio de cultivo microvascular MV-2 al 5% de suero fetal bovino (PromoCell, Heidelberg, Alemania). En algunos experimentos, las células se incubaron con plasma de pacientes revascularizados o valvulares a una dilución 1:100. El medio se cambió el día 4 tras la siembra. El día 7 los cultivos desarrollaron una morfología típica de EPC, con formación de unidades formadoras de colonias (CFU) y doble positividad para la Dil-Ac-LDL y la lectina de *Ulex europaeus*, según el modelo descrito¹¹.

Fármacos y reactivos

Para inhibir la actividad de Smad3, las células se incubaron con SIS3 a 10 µM. Esta concentración ha demostrado inhibir de forma selectiva la actividad de Smad3 en modelos de células vasculares²¹. Para inhibir la actividad del ALK-4 se usó el compuesto SB-431542, también a 10 µM, como se ha descrito²². Ambos fármacos se compraron de Tocris (Bristol, Reino Unido) y se disolvieron a 1:1000 en DMSO.

Apoptosis

La apoptosis se midió mediante un kit comercial de fragmentación de ADN (Roche-Boehringer, Madrid, España). Las células se sembraron en placas de 96 pocillos y se marcaron con 5'-Bromo-2'-deoxi-uridina (BrdU) a 10 µl durante toda la noche. Posteriormente se incubaron en presencia o ausencia de plasma a 1:100 de pacientes revascularizados o valvulares, TGF-β1 (50 ng/ml), SIS3 o SB-431542 (ambos a 10 µM).

Western blot

Las células se lavaron con PBS frío y se lisaron en hielo con una solución de lisis (10% glicerol, 2,3% SDS, 62,5 mM Tris, pH 6,8, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA). Posteriormente se calentaron a 95 °C durante 5 min. Se cargaron cantidades iguales de proteína en geles de poliacrilamida al 10%. Las proteínas se transfirieron después a membranas de PVDF (GE-Healthcare, Madrid, España), cuyas uniones inespecíficas se bloquearon tras incubación durante toda la noche a 4 °C en una solución de leche en polvo desnatada al 5% en

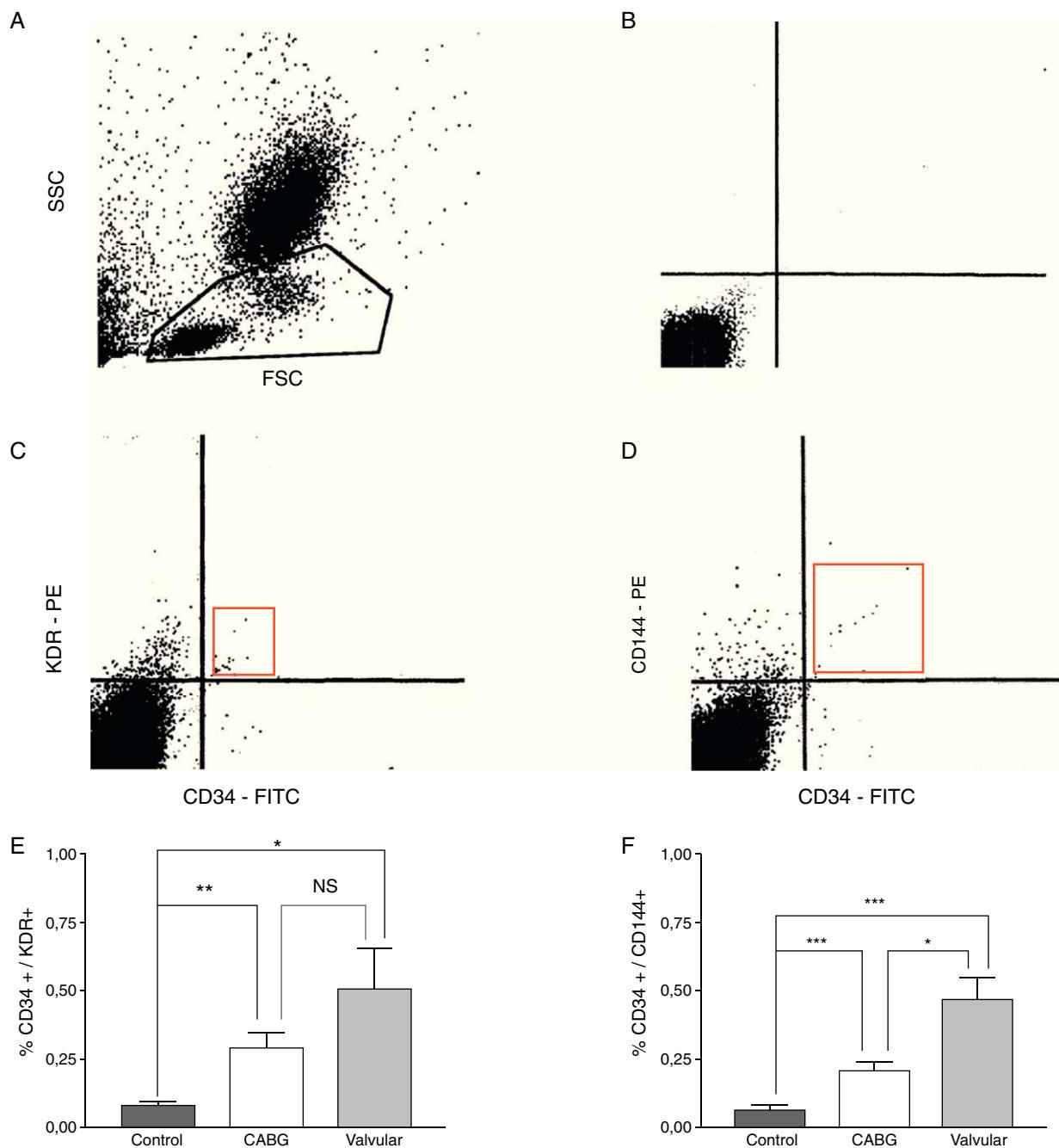


Figura 1 Porcentaje de células doblemente marcadas en sangre periférica. Panel A: Selección de las células mononucleares por tamaño y complejidad. Panel B: Perfil citométrico representativo para el control IgG. Panel C: Perfil citométrico representativo para CD34⁺/KDR⁺. Panel D: Perfil citométrico representativo para CD34⁺/CD144⁺. Las células positivas se destacan en el recuadro rojo. E y F muestran la positividad de CD34⁺/KDR⁺ y CD34⁺/CD144⁺ en distintos grupos de pacientes, respectivamente. CABG: pacientes de revascularización miocárdica. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001; t de Student.

tampón TBS-T (25 mM Trizma base, 75 mM NaCl, pH 7,4, 0,1% v/v Tween® 20). Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con anticuerpos anti-CD34 o anti-cadherin-5 (o anti-CD144) (ambos de Becton-Dikinson, Franklin Lakes, Estados Unidos), diluidos 1:1000 en TBS-T. Se usó un anticuerpo anti-beta actina (Sigma, Madrid, España), control de carga. Las proteínas se visualizaron con ECL+ (GE-Healthcare, Madrid, España).

Estadística

Los datos se muestran como media y desviación estándar (DE) en las variables continuas. Los análisis se hicieron con t de Student o U de Mann-Whitney. Se usó el test de análisis de la varianza (ANOVA) para las comparaciones entre diversos grupos, y después se hizo un post-test de Tukey. Se consideró significativa una p < 0,05.

Tabla 1 Características clínicas y farmacológicas de los pacientes

	Bypass	Valvular	p
Número	51	49	
Edad	64,65 ± 13,34	72,7 ± 10,4	0,106 ^a
Sexo (mujeres, %)	8 (15,69%)	22 (44,89%)	0,001 ^b
IMC (kg/m ²)	26,91 ± 0,4322	26,51 ± 0,5728	0,5726 ^c
FE (%)	62,51 ± 1,846	69,2 ± 1,409	0,006 ^c
Tabaco	12 (23,53%)	9 (18,37%)	0,698 ^b
Alcohol	15 (29,41%)	14 (28,57%)	0,898 ^b
Hipertensión	31 (60,78%)	27 (55,10%)	0,486 ^b
Dislipidemia	31 (60,78%)	16 (32,65%)	0,003 ^b
Diabetes	24 (47,06%)	5 (10,20%)	<0,001 ^b
IECA/ARA2	25 (49,02%)	19 (38,77%)	0,302 ^b
Beta-bloqueantes	16 (31,37%)	9 (18,37%)	0,133 ^b
Antagonistas del calcio	8 (15,69%)	10 (20,41%)	0,539 ^b
Antiagregantes	33 (64,71%)	8 (16,33%)	<0,001 ^b
Estatinas	34 (66,67%)	11 (22,45%)	<0,001 ^b
Nitratos	16 (31,37%)	2 (4,08%)	<0,001 ^b
Antidiabéticos orales	16 (31,37%)	2 (4,08%)	<0,001 ^b
Insulina	13 (25,49%)	1 (2,04%)	<0,001 ^b
IM<30 días	16 (31,37%)	0 (0%)	<0,001 ^b
EuroSCORE	3,569 ± 0,4194	5,735 ± 0,3581	<0,001 ^b

IMC: índice de masa corporal; FE: fracción de eyección; IM: infarto de miocardio.

^a U de Mann-Whiney-Wilcoxon test.

^b Chi-cuadrado.

^c t de Student.

Resultados

Pacientes analizados

Como se muestra en la **tabla 1**, los pacientes revascularizados resultaron tener una carga mayor de factores de riesgo cardiovascular (diabetes y dislipidemia) y de medicaciones cardiovasculares (antiplaquetarios, nitratos, antidiabéticos, insulina), comparados con los pacientes valvulares. Además, tuvieron una menor fracción de eyección, mayor tasa de infarto previo dentro de los 30 días anteriores a la cirugía, y una menor puntuación en la escala euroSCORE. Los pacientes revascularizados, además, tuvieron un mayor número de plaquetas y de monocitos, así como una mayor concentración de fibrinógeno, mientras que las concentraciones plasmáticas de TGF-β, SDF-1, IL-6 y TNF-α no variaron (**tabla 2**). En la cohorte de pacientes controles (con ausencia de coronariografía por razones clínicas evidentes), la edad media fue de 42,78 ± 1,969 años, y el porcentaje de mujeres fue del 35,71%.

Número de CD34⁺/KDR⁺ y CD34⁺/CD144⁺

Como puede verse en la **figura 1**, panel E, los pacientes revascularizados tuvieron una tendencia hacia una menor concentración de EPC de tipo CD34⁺/KDR⁺ comparados con los valvulares, si bien no se alcanzó la significación estadística. Sin embargo, el número de CD34⁺/KDR⁺ fue notablemente menor en el grupo de sujetos sanos, comparados con ambos grupos de pacientes sometidos a cirugía cardíaca. Los pacientes sometidos a revascularización

tuvieron un número significativamente menor de CD34⁺/CD144⁺ respecto a los valvulares (**figura 1**, panel F). Sin embargo, ambos tipos de pacientes tuvieron de nuevo un número de EPC mucho mayor que el grupo control. Es de destacar que, en los pacientes de cirugía cardiaca, el análisis multivariante mostró que pertenecer a uno u otro grupo (revascularizados o valvulares) se asoció con un menor número de CD34⁺/CD144⁺ después de que las *p* se ajustaran al número de comparaciones (*p* = 0,01428 después del ajuste).

Apoptosis en EPC cultivadas

Las EPC se caracterizaron al día 7 del aislamiento mediante la formación de CFU (unidades formadoras de colonias) y la doble positividad para Dil-Ac-LDL y la lectina de *Ulex europaeus*. Las EPC se obtuvieron a partir de células mononucleares de residuos leucoplaquetarios de donantes sanos. Se incubaron con plasma de pacientes revascularizados o valvulares a una dilución de 1:100. La apoptosis fue mayor en EPC de donantes sanos a las que se añadió plasma de pacientes valvulares a las 24 y 72 h (**fig. 2**, paneles A y B). Esta diferencia se vio anulada cuando se coincubó con los inhibidores SIS3 a 10 µM o SB-431542, también a 10 µM (**fig. 2**, paneles A y B). Por lo tanto, estas vías de señalización del TGF-β1 están implicadas en la supervivencia de las EPC inducida por el plasma de pacientes severamente ateroscleróticos. Sin embargo, el TGF-β1 por sí, añadido de forma exógena, no tuvo un efecto significativo en la apoptosis (1,000 ± 0,044 vs. 1,179 ± 0,083, *p* > 0,05). Cabe destacar que la fluvastatina (10-100 nM) y

Tabla 2 Datos bioquímicos y hematológicos

	Bypass	Valvular	p
Número	51	49	
Glucosa (mg/dl)	108,2 ± 5,126	108,9 ± 6,563	0,4258 ^a
Creatinina (mg/dl)	1,2 ± 0,049	1,154 ± 0,045	0,5003 ^b
Plaquetas (por μ l)	240.200 ± 9.392	211.100 ± 8.287	0,0228 ^b
Hemoglobina (g/dl)	13,09 ± 0,0263	13,76 ± 0,0258	0,0762 ^b
Leucocitos (por μ l)	8.255 ± 298	7.525 ± 298	0,0871 ^b
Neutrófilos (por μ l)	4.939 ± 225,6	4.534 ± 319,9	0,3008 ^b
Monocitos (por μ l)	689,6 ± 36,01	566,1 ± 28,20	0,0085 ^b
Linfocitos (por μ l)	2.273 ± 109,8	2.122 ± 125,3	0,3667 ^b
Fibrinógeno (mg/dl)	484,4 ± 20,63	387,7 ± 11,07	<0,0001 ^b
% Células	53,00 ± 1,718	54,55 ± 1,234	0,4690 ^b
TGF- β 1 (ng/ml)	55,73 ± 3,552	52,48 ± 3,464	0,5144 ^b
SDF-1 (ng/ml)	3,525 ± 0,1109	3,604 ± 0,1103	0,6152 ^b
IL-6 (pg/ml)	3,152 ± 0,8052	2,542 ± 0,2950	0,4824 ^b
TNF- α (pg/ml)	3,745 ± 0,5524	4,099 ± 0,6835	0,7216 ^b

Los valores se determinaron siempre previamente a la cirugía. La concentración de citoquinas se calculó mediante kit de ELISA.

^a U de Mann-Whiney-Wilcoxon.

^b t de Student.

el captopril (10-100 μ M), que poseen efecto antiapoptótico sobre células endoteliales^{23,24}, fueron incapaces de ejercer este efecto antiapoptótico sobre las EPC en las condiciones experimentales usadas (fig. 2, panel C, barras grises). De este modo, el efecto antiapoptótico del plasma de pacientes revascularizados no parece deberse a sus medicaciones. Por otro lado, cuando las EPC se cultivaron con plasma de pacientes revascularizados o valvulares, la expresión de

CD34+/CD144+ fue baja y no cambió entre los grupos (fig. 2, panel D).

Expresión de CD34 y CD144 en células cultivadas

En las células endoteliales, la proteína de membrana CD144 pertenece al complejo del receptor del TGF- β 1 y parece

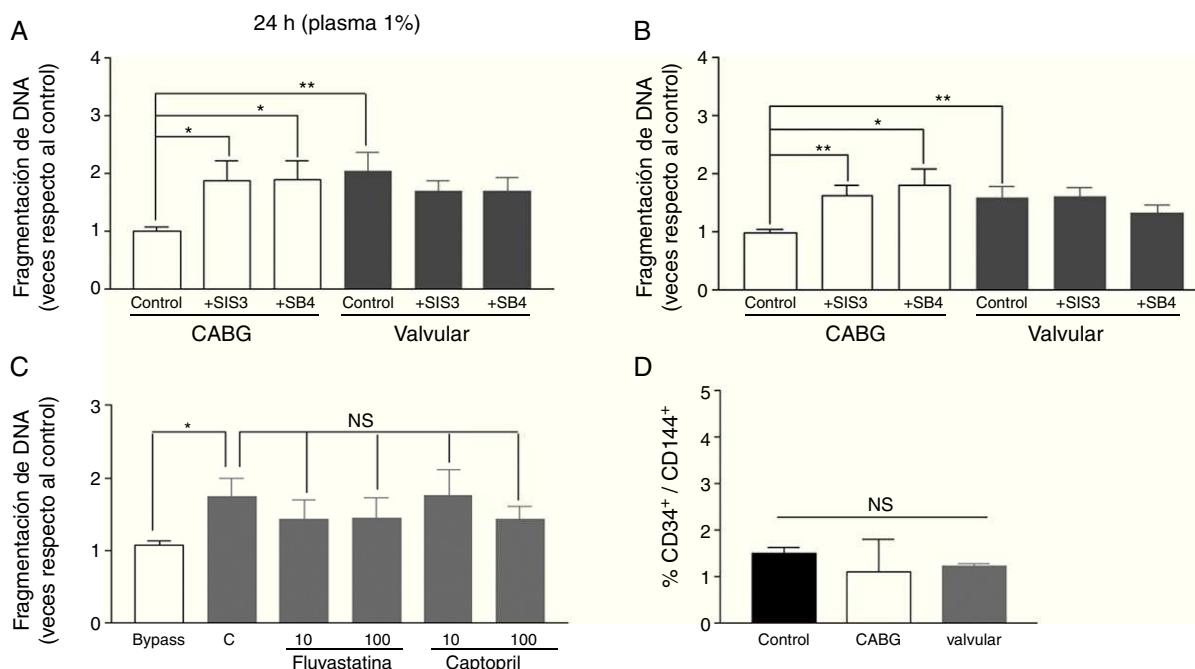


Figura 2 Efecto del plasma de pacientes revascularizados y valvulares sobre cultivos de células progenitoras endoteliales (EPC). Los paneles A y B muestran el efecto de los plasma de estos pacientes añadidos a 1:100 y a 24 y 72 h sobre EPC cultivadas de donantes y el efecto de SIS3 o SB-431542, ambos a 10 μ M. El panel C muestra el efecto del plasma de revascularizados (barra blanca), o valvulares (barras grises), en este último caso, con fluvastatina (10-100 nM) o captopril (10-100 μ M). Panel D: Número de CD34+/CD144+ en EPC de donantes sanos tras la adición de los plasma de los pacientes. *p < 0,05; **p < 0,01; t de Student.

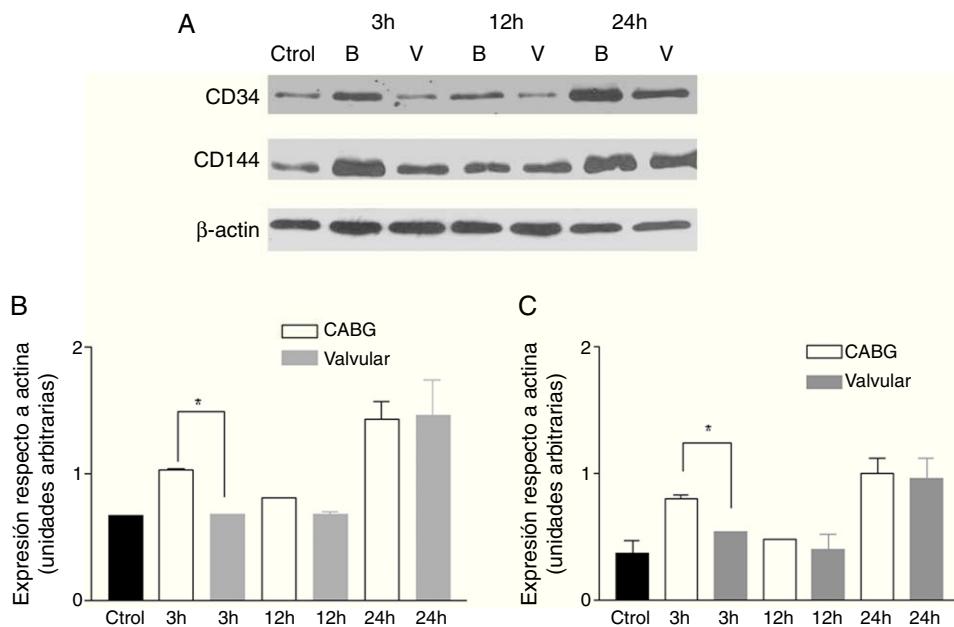


Figura 3 Efecto del plasma en la expresión in vitro de CD34 y CD144. La expresión de ambas proteínas se determinó por Western blot. El panel A muestra blots representativos. Los paneles B y C muestran la cuantificación de 3 blots diferentes. B: plasma de pacientes sometidos a bypass (revascularizados); V: plasma de valvulares. *p < 0,05; t de Student.

regular la respuesta celular a esta citoquina²⁵. Por lo tanto, se trató de comprobar si el plasma de los pacientes revascularizados era capaz de aumentar la concentración celular de los marcadores endoteliales CD34 y CD144 en EPC (día 4) como paso previo al efecto antiapoptótico (al día 7). Las EPC cultivadas de sujetos sanos se coincubaron con plasma de pacientes revascularizados o valvulares, a una dilución 1:100. Como se muestra en la figura 3 (paneles A, B y C), la expresión de CD34 y CD144 aumentó de forma transitoria tras la incubación con el plasma de pacientes revascularizados, alcanzando un máximo a las 3 h.

Discusión

Nuestros resultados muestran un menor número de CD34⁺/CD144⁺ en pacientes revascularizados con aterosclerosis severa. Sin embargo, el plasma de estos mismos pacientes hizo que las EPC cultivadas de donantes sanos adquirieran resistencia a la apoptosis a través de las vías del TGF-β1 Smad3 y ALK-4. Este efecto se asoció a un previo aumento en la concentración intracelular de CD34 y CD144. Por lo tanto, el presente estudio sugiere que, en pacientes ateroscleróticos, la vía del TGF-β1 parece comportarse como protectora sobre las EPC.

Al contrario que la mayoría de los estudios clínicos sobre EPC realizados hasta la fecha, nuestro estudio se ha llevado a cabo en pacientes en los que la presencia o ausencia de enfermedad coronaria ha sido demostrada mediante angiografía. Es de destacar que la pertenencia al grupo de revascularizados o de recambio valvular se relacionó con una disminución de las CD34⁺/CD144⁺ una vez las *p* fueron ajustadas al número de comparaciones, lo que sugiere

que este parámetro se relaciona directamente con la obstrucción coronaria. El número de CD34⁺/CD144⁺ en nuestro grupo de pacientes revascularizados fue menor que en los de recambio valvular, pero en estos dos grupos fue mayor que el hallado en el grupo control (fig. 1, panel F). Por lo tanto, nuestros resultados parecen sostener la idea de que las EPC se liberan a la sangre en respuesta a la isquemia y alcanzan niveles diferentes en los pacientes con enfermedad coronaria y en los que no la padecen. Este mecanismo podría explicar los hallazgos realizados por varios grupos, en los que las EPC están reducidas en la enfermedad cardiovascular³⁻⁶, mientras que fisiológicamente se movilizan en respuesta a la isquemia². De hecho, un estudio reciente realizado en una población amplia muestra que el número de CD34⁺/KDR⁺ está directamente relacionado con los factores de riesgo cardiovascular (que actuarían como estímulo isquémico), mientras que esta relación es inversa cuando se miden parámetros de daño vascular, como el cociente íntima-media (que serían consecuencia del «agotamiento» en la liberación de EPC)⁹. Esta idea de una depleción de EPC en la enfermedad cardiovascular avanzada es sugerida por la actual evidencia clínica¹⁰.

La disfunción de las EPC que tiene lugar en la aterosclerosis, tanto en número como en función, puede ser contrarrestada por mecanismos protectores. Entre ellos destaca la vía del TGF-β1, que se ha considerado como una citoquina antiaterosclerótica, en lo que se ha llamado la hipótesis de la «citoquina protectora»²⁶. Más aún, la fisiología del TGF-β1 puede regularse mediante muchos fármacos, tanto ya conocidos, como las tiazolidinodionas, la aspirina o las estatinas²⁶, como moléculas de diseño como el SIS-3 (que inhibe la Smad3, segundo mensajero del TGF-β1) o el SB-431542 (que bloquea la ALK-4, una quinasa de su-

complejo receptor)^{21,22}. La vía del TGF-β1 parece tener un efecto protector sobre células endoteliales¹⁵⁻¹⁷. En el presente estudio, demostramos que el TGF-β1 plasmático de pacientes ateroscleróticos tiene un efecto antiapoptótico sobre EPC procedentes de donantes sanos.

Una vez comprobado este hecho nos propusimos comprobar si el plasma de pacientes revascularizados era capaz de alterar la expresión de CD34 y CD144 antes del efecto antiapoptótico. Por lo tanto, se evaluó este efecto sobre EPC de donantes sanos (al día 4). Contrariamente a lo encontrado en la sangre de los pacientes, se observó un aumento en la expresión de CD34 y de CD144 tras la incubación con plasma de pacientes revascularizados (fig. 3, paneles A, B y C). Curiosamente, el mayor efecto se observó a las 3 h de incubación, un tiempo muy corto para la expresión *de novo* de una proteína, lo que sugiere la transmisión directa de CD34 y de CD144 a través de micropartículas endoteliales²⁷. De hecho, se ha demostrado que los restos apoptóticos de células endoteliales estimulan las EPC en cultivo²⁸. Dado que, en células endoteliales, CD144 está integrado en el complejo del receptor de TGF-β1²⁵, el aumento de CD144 inducido por el plasma de pacientes revascularizados (día 4) podría mediar el efecto antiapoptótico que se observa después en este mismo modelo de cultivo celular (al día 7, fig. 2, paneles A y B).

En resumen, en el presente estudio mostramos que los pacientes ateroscleróticos poseen un nivel subóptimo de EPC CD34+/CD144+. Sin embargo, en estos pacientes el TGF-β1 plasmático tiene un efecto protector sobre EPC cultivadas de donantes sanos. Por lo tanto, una respuesta anormal de las EPC al TGF-β1 podría mediar la liberación subóptima de EPC que se observa en la enfermedad cardiovascular y ser sujeto de intervenciones futuras.

Financiación

Nuestros laboratorios reciben financiación pública del Ministerio de Sanidad de España a través de FISS (PI080920) y RECAVA (Red Temática de Investigación Cardiovascular, RD06/0014/1007 y RD06/0014/0027).

Autoría

Todos los autores han participado en distintas fases relacionadas con el trabajo, en la idea, diseño, recogida de datos, análisis, interpretación y elaboración del manuscrito, y han aprobado la versión final.

Conflictos de intereses

Ninguno de los autores tiene conflicto de intereses.

Agradecimientos

Agradecemos el apoyo prestado por Fernando Ortego, el personal médico y de enfermería de Cirugía Cardiaca del Hospital Clínico San Carlos, el Centro de Microscopía y Citometría-UCM y el Centro de Transfusiones de la Comunidad de Madrid.

Bibliografía

- Myerson M, Coady S, Taylor H, Rosamond WD, Goff Jr DC, ARIC Investigators. Declining severity of myocardial infarction from 1987 to 2002: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. Circulation. 2009;119:503-14.
- Hristov M, Zernecke A, Liehn EA, Weber C. Regulation of endothelial progenitor cell homing after arterial injury. Thromb Haemost. 2007;98:274-7.
- Fadini GP, Maruyama S, Ozaki T, Taguchi A, Meigs J, Dimmeler S, et al. Circulating progenitor cell count for cardiovascular risk stratification: A pooled analysis. PLoS One. 2010;5:e11488.
- Deschaseaux F, Selmani Z, Falcoz PE, Mersin N, Menevau N, Penformis A, et al. Two types of circulating endothelial progenitor cells in patients receiving long term therapy by HMG-CoA reductase inhibitors. Eur J Pharmacol. 2007;562:111-8.
- Briguori C, Testa U, Riccioni R, Colombo A, Petrucci E, Condorelli G, et al. Correlations between progression of coronary artery disease and circulating endothelial progenitor cells. FASEB J. 2010;24:1981-8.
- Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kamper U, et al. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: Proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. Circulation. 2005;111:2981-7.
- Güven H, Shepherd RM, Bach RG, Capoccia BJ, Link DC. The number of endothelial progenitor cell colonies in the blood is increased in patients with angiographically significant coronary artery disease. J Am Coll Cardiol. 2006;48:1579-87.
- Valgimigli M, Rigolin GM, Fucili A, Porta MD, Soukhomovskaya O, Malagutti P, et al. CD34+ and endothelial progenitor cells in patients with various degrees of congestive heart failure. Circulation. 2004;110:1209-12.
- Xiao Q, Kiechl S, Patel S, Oberholzer F, Weger S, Mayr A, et al. Endothelial progenitor cells, cardiovascular risk factors, cytokine levels and atherosclerosis—results from a large population-based study. PLoS One. 2007;2:e975.
- Fadini GP, Boscaro E, de Kreuzenberg S, Agostini C, Seeger F, Dimmeler S, et al. Time course and mechanisms of circulating progenitor cell reduction in the natural history of type 2 diabetes. Diabetes Care. 2010;33:1097-102.
- Redondo S, Hristov M, Gümbel D, Tejerina T, Weber C. Biphasic effect of pioglitazone on isolated human endothelial progenitor cells: Involvement of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and transforming growth factor-beta1. Thromb Haemost. 2007;97:979-87.
- Kränel N, Adams V, Linke A, Gielen S, Erbs S, Lenk K, et al. Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25:698-703.
- Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, et al. Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. Circulation. 2002;106:2781-6.
- Ruiz E, Redondo S, Gordillo-Moscoso A, Rodriguez E, Reguillo F, Martinez-Gonzalez J, et al. EPC adhesion to arteries from diabetic and non-diabetic patients: Effect of pioglitazone. Front Biosci. 2009;14:3608-18.
- Walshe TE, Saint-Geniez M, Maharaj AS, Sekiyama E, Maldonado AE, D'Amore PA. TGF-beta is required for vascular barrier function, endothelial survival and homeostasis of the adult microvasculature. PLoS One. 2009;4:e5149.
- Lu Q. Transforming growth factor-beta1 protects against pulmonary artery endothelial cell apoptosis via ALK5. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2008;295:L123-33.
- Henrich D, Hahn P, Wahl M, Wilhelm K, Dernbach E, Dimmeler S, et al. Serum derived from multiple trauma patients

- promotes the differentiation of endothelial progenitor cells *in vitro*: possible role of transforming growth factor-beta1 and vascular endothelial growth factor165. *Shock.* 2004;21:13–6.
18. Redondo S, Hristov M, Gordillo-Moscoso AA, Ruiz E, Weber C, Tejerina T. High-reproducible flow cytometric endothelial progenitor cell determination in human peripheral blood as CD34+/CD144+/CD3- lymphocyte sub-population. *J Immunol Methods.* 2008;335:21–7.
19. Kropf J, Schurek JO, Wollner A, Gressner AM. Immunological measurement of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta1) in blood; assay development and comparison. *Clin Chem.* 1997;43:1965–74.
20. Radaelli A, Loardi C, Cazzaniga M, Balestri G, De Carlini C, Cerrito MG, et al. Inflammatory activation during coronary artery surgery and its dose-dependent modulation by statin/ACE-inhibitor combination. *Arterioscl Thromb Vasc Biol.* 2007;27:2750–5.
21. Redondo S, Ruiz E, Padilla E, Gordillo-Moscoso A, Tejerina T. Role of TGF-beta1 in vascular smooth muscle cell apoptosis induced by angiotensin II. *Eur J Pharmacol.* 2007;556:36–44.
22. DaCosta Byfield S, Major C, Laping NJ, Roberts AB. SB-505124 is a selective inhibitor of transforming growth factor-beta type I receptors ALK4, ALK5, and ALK7. *Mol Pharmacol.* 2004;65:744–52.
23. Yu W, Akishita M, Xi H, Nagai K, Sudoh N, Hasegawa H, et al. Angiotensin converting enzyme inhibitor attenuates oxidative stress-induced endothelial cell apoptosis via p38 MAP kinase inhibition. *Clin Chim Acta.* 2006;364:328–34.
24. Xu SZ, Zhong W, Watson NM, Dickerson E, Wake JD, Lindow SW, et al. Fluvastatin reduces oxidative damage in human vascular endothelial cells by upregulating Bcl-2. *J Thromb Haemost.* 2008;6:692–700.
25. Rudini N, Felici A, Giampietro C, Lampugnani M, Corada M, Swirski K, et al. VE-cadherin is a critical endothelial regulator of TGF-beta signalling. *EMBO J.* 2008;27:993–4.
26. Redondo S, Santos-Gallego CG, Tejerina T. TGF-beta1: A novel target for cardiovascular pharmacology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007;18:279–86.
27. Zernecke A, Bidzhekov K, Noels H, Shagdarsuren E, Gan L, Denecke B, et al. Delivery of MicroRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal.* 2009;2:ra81.
28. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells *in vitro*. *Blood.* 2004;104:2761–6.