

ESTUDIO PROSPECTIVO DE LA CAPACIDAD ANGIOGÉNICA DE MONOCITOS Y CÉLULAS CD 133+ EN UN MODELO MURINO DE ISQUEMIA PERIFÉRICA: COMPARACIÓN ENTRE DOS FUENTES CELULARES

Mercedes Alberca^{a,b}, Natalia López^{a,b}, Fermín M. Sánchez-Guijo^{a,b}, Eva M Villarón^{a,b}, José V Rivas^c, José M López-Novoa^c, José F Pérez-Fontán^d, Jesús G Briñón^e, Miguel A Arévalo^f, Belén Blanco^{a,b}, Ignacio Sánchez-Abarca^{a,b}, Soraya Martín^{a,b}, Jose A Pérez-Simón^{a,b}, Jesús F. San Miguel^{a,b}, M Consuelo del Cañizo^{a,b}.

^aServicio de Hematología, Hospital Universitario de Salamanca. ^bCentro de Investigación del Cáncer (CIC), Salamanca. ^cDepartamento de Fisiología. Universidad de Salamanca. ^dServicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario de Salamanca. ^eDepartamento de Biología Celular y Patología, Universidad de Salamanca. ^fDepartamento de Anatomía Humana e Histología, Universidad de Salamanca.

Descripción: La existencia de células progenitoras endoteliales (CPE) en sujetos adultos ha abierto numerosas expectativas en el tratamiento de los procesos isquémicos. Se ha descrito que los monocitos y las células CD133+ presentan actividad angiogénica. El objetivo del presente trabajo ha sido analizar de forma prospectiva el fenotipo y la capacidad angiogénica de dichas poblaciones celulares en un modelo murino de isquemia periférica. Las células se obtuvieron de sujetos sanos, los monocitos mediante adherencia a partir de leuco-concentrados de hemodonaciones y las células CD133+ a partir de productos de aféresis mediante selección inmunomagnética. Las células CD133+ purificadas se expandieron durante 7 días en presencia de SCGF (100ng/ml), VEGF (50ng/ml) y FLT-3 ligando (50ng/ml). Previo a la infusión se realizó un estudio inmunofenotípico en ambas poblaciones celulares. Como modelo murino se utilizaron 42 ratones Swiss nu/nu adultos a los que se les produjo una isquemia mediante sección de la arteria y vena femoral. El día de la isquemia se infundieron por vía IV monocitos (10^5 ó 10^6 células; n=14) ó células CD133+ (10^5 ó 10^6 células; n=14) ó suero fisiológico (grupo control; n=14). Para medir el efecto sobre la revascularización se utilizaron 2 técnicas: medida del flujo sanguíneo mediante láser Doppler y recuento del número de capilares (número vasos/ μm^2). Para analizar la localización de las células infundidas se utilizaron técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia con microscopía de luz, fluorescencia y confocal.

La pureza de monocitos y células CD133+ fue del 80% y del 82% respectivamente. Los monocitos expresaban CD14, CD31, CD45, CD64, CD105, lisozima. y Vc-cadherina y un 1.3% fue KDR⁺. Tras la expansión las células CD133+ expresaron CD14, CD45 y VE-cadherina y sólo un 2% eran CD133+ y CD34⁺. Únicamente el 0,16% de estas células fue KDR⁺. Al medir el flujo sanguíneo semanalmente, desde el día +4 hasta el +28 post infusión, observamos que en los ratones tratados con monocitos ó células CD133+ éste era superior ($p < 0,05$) al de ratones no tratados. La densidad capilar también aumentó en ratones que recibieron monocitos (48 capilares/ μm^2) ó células CD133+ (51 capilares/ μm^2) frente a los ratones que únicamente recibieron SF ($p = 0,09$ y $0,02$ respectivamente). Cuando analizamos la colocalización de las células infundidas con los vasos del ratón comprobamos que pese al aumento del número de capilares y del flujo sanguíneo, en los animales que recibieron 10^5 células, éstas no aparecían en los vasos neoformados. Sin embargo, cuando se utilizaron dosis altas, 10^6 monocitos ó CD133+, se detectaron células en los músculos isquémicos y mediante microscopía confocal vimos que se encontraban en las paredes de los vasos del ratón.

Conclusión: Nuestros datos apuntan a un efecto paracrino de ambas subpoblaciones en su capacidad de incrementar la revascularización post-isquemia, aunque algunas células son capaces de incorporarse a los vasos.