



**HOSPITAL UNIVERSITARIO REINA SOFÍA**

**INSTITUTO MAIMÓNIDES DE INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA DE CÓRDOBA (IMIBIC)**

Departamento de Medicina

**UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA**

**Implicación de las microvesículas  
endoteliales en el desarrollo de daño  
vascular.**

**Andrés Carmona Muñoz**

Córdoba 2017

TITULO: *Implicación de las microvesículas endoteliales en el desarrollo de daño vascular*

AUTOR: *Andrés Carmona Muñoz*

---

© Edita: UCOPress. 2018  
Campus de Rabanales  
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A  
14071 Córdoba

[https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/  
ucopress@uco.es](https://www.uco.es/ucopress/index.php/es/ucopress@uco.es)

---



**IMPLICACION DE LAS  
MICROVESÍCULAS ENDOTELIALES  
EN EL DESARROLLO DE DAÑO  
VASCULAR.**

Memoria presentada por

**Andrés Carmona Muñoz**

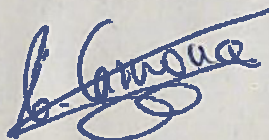
Licenciado en Biología y Bioquímica para optar al grado de,

**Doctor en Biología**

Tesis doctoral realizada bajo la dirección del Pr. Dr. Pedro Aljama García  
y la Pra. Dra. Julia Carracedo Añón en el Instituto Maimónides de  
Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC).

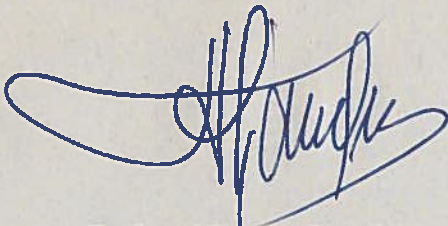
**Programa de Doctorado de Biomedicina**

El doctorando,

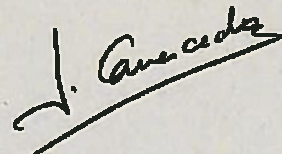


**Andrés Carmona Muñoz**

**Directores**



**Pedro Aljama García**



**Julia Carracedo Añón**





**TÍTULO DE LA TESIS:** Implicación de las microvesículas endoteliales en el desarrollo de daño vascular

**DOCTORANDO/A:** Andrés Carmona Muñoz

**INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

El trabajo de investigación que se presenta es un estudio original que ha permitido avanzar en el conocimiento de las microvesículas endoteliales y otros biomarcadores en los mecanismos que regulan el daño vascular.

La tesis presentada por el doctorado es una tesis por compendio de artículos. Los resultados obtenidos de este trabajo han sido publicados en revistas científicas de reconocido prestigio internacional en el campo de investigación en Nefrología y en Fisiología Renal: American Journal of Physiology-Renal Physiology and Frontiers in Physiology. A nuestro criterio, dicho trabajo cumple con la estructura y los indicios de calidad requeridos por la normativa vigente y muestra una correcta correspondencia entre los objetivos planteados y los resultados obtenidos.

La tesis doctoral se enmarca dentro del proyecto de investigación financiado por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (CTS-7352) de la Junta de Andalucía.

Cabe destacar la formación técnica y científica alcanzada por el doctorando en estos años. El período de tiempo que ha transcurrido para la ejecución del trabajo de doctorado, le ha permitido adquirir conocimientos teóricos y metodológicos que le capacitan y confieren una preparación y madurez suficientes para desarrollar sus propias hipótesis y participar en la redacción y coordinación de nuevos proyectos y artículos científicos, iniciando una nueva etapa que continuará a la consecución del grado de doctor.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 4 de diciembre de 2017

Firma del/de los director/es

Fdo.: Pedro Aljama García

Fdo.: Julia Carracedo Afón





**TÍTULO DE LA TESIS:** Implicación de las microvesículas endoteliales en el desarrollo de daño vascular

**DOCTORANDO/A:** Andrés Carmona Muñoz

**INFORME RAZONADO DEL RESPONSABLE DE LA LÍNEA DE INVESTIGACIÓN**

(se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

Andrés Carmona Muñoz presenta es un trabajo original que ha permitido avanzar en el conocimiento de las microvesículas endoteliales y otros biomarcadores en los mecanismos que regulan el daño vascular.

La tesis presentada por el doctorado es una tesis por compendio de artículos. Los resultados obtenidos de este trabajo han sido publicados en revistas científicas de reconocido prestigio internacional en el campo de investigación en Nefrología y en Fisiología Renal: American Journal of Physiology-Renal Physiology and Frontiers in Physiology.

La tesis doctoral se enmarca dentro del proyecto de investigación financiado por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa (CTS-7352) de la Junta de Andalucía.

Finalmente, cabe destacar la formación técnica y científica alcanzada por el doctorando en estos años. El período de tiempo que ha transcurrido para la ejecución del trabajo de doctorado, le ha permitido adquirir conocimientos teóricos y metodológicos que le capacitan y confleren una preparación y madurez suficientes para desarrollar sus propias hipótesis y participar en la redacción y coordinación de nuevos proyectos y artículos científicos.

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 11 de diciembre de 2017

Firma del responsable de la línea de investigación

Fdo.: Pedro Aljama García





## *Abreviaturas*

---

**ADN:** Ácido dexosirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero

**BMP-2:** Proteína morfogénica ósea 2

**CCR2:** *C-C chemokine receptor type 2*

**CD:** Cluster de diferenciación

**CD105:** Endoglina

**CD14:** Receptor de lipopolisacárido de origen bacteriano

**CD16:** Receptor de la fracción Fc de la inmunoglobulina G

**CD51:** Integrina alfa V

**CD62E:** E- Selectina

**CD62L:** L- Selectina

**CD64:** Receptor tipo I para la fracción Fc de la IgG o FcγRI

**CE:** Células endoteliales

**CEC:** Células endoteliales circulantes

**CV:** Calcificación vascular

**ECV:** Enfermedad cardiovascular

**ELISA:** *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, Inmunoensayo ligado a enzima

**eNOS:** Óxido nítrico sintasa endotelial

**eNOS:** Óxido nítrico sintasa endotelial

**EPC:** Células progenitoras endoteliales

**ERC:** Enfermedad renal crónica

**ET-1:** Endotelina-1

**FGF:** Factor de crecimiento de fibroblastos

## *Abreviaturas*

---

**HIF-1 $\alpha$** : Factor inducible de hipoxia-1 $\alpha$

**HUVEC**: Línea de células endoteliales humanas de vena umbilical

**IAM**: Infarto agudo de miocardio

**ICAM-1**: Molécula de adhesión intracelular 1 (CD54)

**I $\kappa$ B**: Inhibidor NF $\kappa$ B

**IL**: Interleuquina

**IS**: Indoxyl sulfato

**IsEMV**: Microvesículas derivadas de HUVEC tratadas con indoxyl sulfato

**LES**: Lupus eritematoso sistémico

**MCP-1**: Proteína quimiotáctica para monocitos

**M-CSF**: Factor estimulante de colonias de monocitos

**miRNA**: microRNA

**MV**: Microvesículas

**MVE**: Microvesículas endoteliales

**MVP**: Microvesículas derivadas de plaquetas

**NF  $\kappa$ B**: Factor nuclear kappa B

**NO**: Óxido nítrico

**NTA**: *nanoparticle tracking analysis*

**OCN**: Osteocalcina

**PCR**: Proteína C reactiva

**PDGF**: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

**PECAM-1**: Molécula de adhesión plaquetaria a células endoteliales-1 (CD31)

**ROS**: Especies reactivas de oxígeno

**SDF-1**: Factor derivado de células estromales tipo 1

## *Abreviaturas*

---

**TGF- $\beta$** : Factor transformante del crecimiento  $\beta$

**TNF $\alpha$** : Tumor de necrosis tumoral alpha

**TRPS**: *tunable resistive pulse sensing*

**VCAM-1**: Molécula de adhesión celular vascular 1 (CD106)

**VE-cadherina**: Cadherina del endotelio vascular (CD144)

**VEGF**: Factor de crecimiento del endotelio vascular

**VEGFR-2**: Receptor tipo 2 del factor de crecimiento endotelial

**vWF**: Factor de von Willebrand





# ÍNDICE

---







<b>I. RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>6</b>
1. Daño endotelial en la patología vascular y en la enfermedad renal crónica.....	7
1.1 Fisiología del endotelio .....	8
1.2 Marcadores de disfunción endotelial .....	8
1.3 Mecanismos implicados en el proceso inflamatorio y el daño endotelial asociado a uremia .....	9
1.4 Papel de los monocitos como nexo entre inflamación y daño endotelial .....	10
2. Procesos relacionados con el daño del endotelio. Generación de microvesículas ..	13
2.1 Definición de microvesículas .....	14
2.2 Aislamiento de microvesículas .....	17
2.3 Biogénesis y eliminación de microvesículas .....	17
2.4 Microvesículas y comunicación celular .....	18
2.5 Las microvesículas como elementos transportadores de miRNA .....	19
2.6 Microvesículas y su papel en patologías .....	20
2.7 Liberación de microvesículas endoteliales. Un mecanismo relacionado con el daño del endotelio.....	21
3. Reparación endotelial y células progenitoras endoteliales.....	29
3.1 Definición de las células progenitoras endoteliales.....	29
3.2 Fenotipo y características de las células progenitoras endoteliales .....	30
3.3 Funciones de las células progenitoras endoteliales .....	31
3.4 Movilización de las células progenitoras endoteliales.....	32
3.5 Células progenitoras endoteliales y enfermedad cardiovascular.....	33
3.6 Células progenitoras endoteliales e inflamación .....	34
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>35</b>

## Índice

---

<b>V. OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
<b>VI. CAPÍTULO I:</b> <i>Endothelial damage and vascular calcification in patients with chronic kidney disease</i> .....	<b>37</b>
<b>VII. CAPÍTULO II:</b> <i>Markers of endothelial damage in patients with chronic kidney disease on hemodialysis</i> .....	<b>48</b>
<b>VIII. CAPÍTULO III:</b> <i>Microvesicles derived from indoxyl sulfate treated endothelial cells induce endothelial progenitor cells dysfunction</i> .....	<b>56</b>
<b>IX. DISCUSIÓN</b> .....	<b>69</b>
<b>X. CONCLUSIONES</b> .....	<b>82</b>
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>84</b>
<b>XII. ANEXO I</b> .....	<b>107</b>





# RESUMEN

---









La enfermedad cardiovascular (ECV) es una patología comúnmente asociada a la enfermedad renal crónica (ERC) que representa la principal causa de morbilidad y mortalidad en este colectivo. Esta alta incidencia de ECV, tiene lugar como consecuencia de la disfunción endotelial causada por diferentes factores presentes en los pacientes con ERC. Además, estos pacientes presentan frecuentemente calcificaciones vasculares (CV) que dificultan el tratamiento de la ECV y el pronóstico de la misma. Este hecho ha llevado a proponer la identificación de biomarcadores precoces de daño endotelial y calcificación vascular que podrían ser clave para paliar la ECV asociada a la ERC.

Un mecanismo que se ha propuesto para explicar la disfunción endotelial en la ERC es la participación del sistema inmune; concretamente, se ha asociado con el aumento de una subpoblación de monocitos activados en el suero de pacientes urémicos, los monocitos CD14+CD16++. Estas células aumentan en sangre periférica de pacientes, incluso en ausencia de datos clínicos relacionados con un proceso inflamatorio activo, o sin que en sangre periférica se observe un aumento de otros marcadores de inflamación como la PCR o citoquinas pro-inflamatorias. Además, entre esta subpoblación de monocitos y la aparición de eventos cardiovasculares se ha encontrado una relación directa.

Las microvesículas (MV) se describieron originalmente como unas estructuras producidas por diferentes células activadas, se han considerado como marcadores indicativos de activación y/o apoptosis celular y reflejan un daño celular. Se ha demostrado que los niveles elevados de microvesículas derivadas de células endoteliales (MVE) en plasma se pueden considerar un indicador de daño endotelial en situaciones patológicas; sin embargo también se observan niveles bajos de MVE en el plasma de sujetos sin patología vascular.

La situación de barrera de la célula endotelial (CE) hace que esta se vea sometida constantemente a estímulos y agresiones por el torrente circulatorio, por lo que un número relativamente pequeño de estas células es destruido de manera continuada. Para mantener la homeostasis vascular, las células endoteliales dañadas son reemplazadas por células progenitoras endoteliales (EPC), que tienen su origen en médula ósea, y circulan en un bajo porcentaje en sangre periférica. Estas células precursoras, van a diferenciarse y a reemplazar las CE dañadas, devolviendo la

## *Resumen*

---

integridad y el equilibrio vascular. Las MVE producidas por CE sirven de estímulo para la diferenciación de EPC por lo que las MVE podrían actuar como “mensajeros” entre células maduras y células reparadoras.

En base a estas premisas, el **objetivo principal** de la tesis ha sido caracterizar el papel de MVE producidas en respuesta a diferentes agentes lesivos para el endotelio vascular relacionados con la enfermedad renal crónica, determinando la funcionalidad de las mismas en la regulación del balance daño/reparación endotelial.

Los resultados obtenidos sugieren:

1.- En los pacientes con ERC, se produce un aumento en las MVE que se asocia con una disminución en el número de EPC, lo que sugiere un desequilibrio entre los procesos de daño endotelial y de reparación en pacientes con ERC, principalmente aquellos con CV. Las MV de pacientes con ERC inducen la expresión de osteocalcina, molécula procalcificante, en células de músculo liso vascular, fibroblastos y EPC. Nuestros resultados sugieren que las EPC estimuladas con MV, a través de la expresión de OCN, pueden participar directamente en el proceso de VC.

2.- Los pacientes con hemodiálisis mantienen un estado inflamatorio y sufren alteraciones endoteliales que pueden identificarse utilizando marcadores precoces cuantificables en sangre periférica. En particular, las MV, con un tamaño de 400-1000 nm, tienen un posible valor predictivo de utilidad en la prevención de la ECV en pacientes con HD. Además, la diabetes mellitus altera estos factores implicados en el daño inflamatorio y endotelial.

3.- El indoxyl sulfato, puede inducir la vesiculación de las CE y producir MVE con diferentes características de membrana, contenido de miRNA y otras moléculas, lo que hace que el mantenimiento de la homeostasis vascular de las EPC no sea completamente funcional. Estas características específicas de las MVE podrían utilizarse como nuevos biomarcadores para el diagnóstico y el pronóstico de la enfermedad vascular.

## *Resumen*

---

Palabras clave: calcificación vascular, células progenitoras endoteliales, enfermedad cardiovascular, enfermedad renal crónica, microvesículas endoteliales, monocitos CD14+CD16++.







# ***ABSTRACT***

---











## *Abstract*

---

Cardiovascular disease (CVD) is a pathology commonly associated with chronic kidney disease (CKD) that represents the main cause of morbidity and mortality in this group. This high incidence of CVD occurs as a result of endothelial dysfunction caused by different factors present in patients with CKD. In addition, these patients frequently show vascular calcifications (CV) that hinder the treatment of CVD and its prognosis. This fact has led to propose the identification of early biomarkers of endothelial damage and vascular calcification that could be a key factor to palliate CVD associated with CKD.

The immune system has been proposed as a mechanism to explain endothelial dysfunction in CKD; specifically it has been associated with the rise of an activated monocytes subpopulation in the uremic patient's serum, CD14+ CD16++ monocytes. These cells are increased in the peripheral blood of uremic patients, even when there is a lack of clinical data related to an active inflammatory process, or without an increase in other inflammatory markers such as PCR or pro-inflammatory cytokines in peripheral blood. Furthermore, a direct link has been found between this subpopulation of monocytes and the appearance of cardiovascular events it.

Microvesicles (MV) were originally described as structures produced by different activated cells; they have been considered as indicative markers of cellular activation and / or apoptosis and reflect cellular damage. It has been shown that high levels of endothelial microvesicles (EMV) in plasma can be considered as an indicator of endothelial damage in pathological situations; however, low levels of EMV are also observed in the plasma of subjects without vascular pathology.

The role as a barriers of the endothelial cells (EC) constantly exposes them to the stimuli and attacks from the blood torrent, so a relatively small number of these cells are destroyed continuously. In order to maintain vascular homeostasis, damaged endothelial cells are replaced by endothelial progenitor cells (EPC), originated in bone marrow, and they circulate in a low percentage in peripheral blood. These precursor cells will differentiate and replace damaged EC, returning the vascular integrity and balance. EVM produced by EC works as stimulation for the EPC differentiation so the EMV could act as "messengers" between reparative cells and mature cells.

Based on these premises, the main objective of the thesis has been to characterize the role of EMV produced in response to different harmful agents to the vascular endothelium related to CKD, determining the functionality of these microvesicles in the regulation of endothelial damage / repair balance.

The results obtained suggest:

1.- In patients with CKD, there is an increase in EMV that is associated with a decrease in the number of EPC, which suggests an imbalance between the processes of endothelial damage and repair in patients with CKD, mainly those with CV. The MV of CKD patients induce the expression of osteocalcin, a procalcifying molecule, in vascular smooth muscle cells, fibroblasts and EPC. Our results suggest that EPC stimulated with MV, through the expression of OCN, can participate directly in the VC process.

2.- Patients with hemodialysis remain in an inflammatory state and suffer endothelial alterations that can be identified using quantifiable early markers in peripheral blood. In particular, MVs, which measure 400-1000 nm, have a possible predictive value in the prevention of CVD in patients with HD. In addition, diabetes mellitus alters these factors of inflammatory and endothelial damage.

3.- The indoxyl sulfate, is able to induce EC vesiculation and produce MVE with different characteristics of membrane, miRNA content and other molecules, which means that the maintenance of the vascular homeostasis of EPC is not completely functional. These specific features of the EMV might be used like new biomarkers for the CVD diagnosis and prognosis.

Keywords: cardiovascular disease, chronic kidney disease, endothelial microvesicles, endothelial progenitor cells, vascular calcification, CD14+CD16++ monocytes.









# INTRODUCCIÓN

---









## *Introducción*

---

La enfermedad cardiovascular (ECV) en general, y en particular la aterosclerosis, se considera la patología más frecuente y la principal causa de mortalidad en los países occidentales; representando el doble de las muertes que ocurren por cáncer y multiplicando por 10 las producidas por accidente. A pesar de los significativos avances médicos, la detección precoz de la enfermedad y un seguimiento cuidadoso de su evolución, siguen siendo las herramientas principales en la lucha contra esta entidad.

En los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC), la patología cardiovascular tiene una incidencia muy superior a la de la población general (Schiffrin, Lipman, and Mann 2007). Esta tasa de mortalidad no se puede explicar solamente por factores de riesgo cardiovascular clásicos tales como diabetes, tabaquismo, hipertensión, hipercolesterolemia y edad; sino que además de estos factores, los pacientes con ERC presentan factores de riesgo cardiovascular no tradicionales que se relacionan con su enfermedad, como son la uremia, alteraciones del metabolismo fósforo-calcio, aumento del estrés oxidativo, malnutrición, hiperhomocisteinemia, disfunción endotelial e inflamación crónica (Chade, Lerman, and Lerman 2005, Stenvinkel and Alvestrand 2002, Descamps-Latscha et al. 2005). De hecho, la mortalidad de los pacientes con ERC por ECV es muy elevada incluso desde las primeras fases de la enfermedad, cuando el paciente todavía no presenta sintomatología (Foley, Parfrey, and Sarnak 1998).

La ECV asociada a la ERC comparte numerosas similitudes con la ECV del anciano. Numerosos autores postulan que el mayor reto que se vislumbra en el tratamiento de la ERC puede estar ligado a entender por qué la ERC promueve un envejecimiento precoz del sistema cardiovascular en los enfermos (White, Yaqoob, and Harwood 2015). Esto hace que, igual que ocurre en los ancianos, los pacientes con ERC presenten una alta frecuencia de calcificaciones vasculares (CV) que dificultan el tratamiento de la ECV y empeoran el pronóstico de la misma (Kendrick and Chonchol 2011). En los enfermos con ERC el desarrollo progresivo de CV es una de las principales causas de las alteraciones en la hemodinámica, y como consecuencia de la morbilidad y mortalidad cardiovascular (Wilson et al. 2001).

### *1.- Daño endotelial en la patología vascular y en la enfermedad renal crónica*

Para la detección precoz de la ECV, el principal elemento indicativo de deterioro vascular es la alteración del endotelio. De hecho, la disfunción y el daño endotelial se consideran el primer estadio en la ECV (Tesfamariam and DeFelice 2007). La disfunción endotelial es el primer evento en el desarrollo de aterosclerosis (Steffel and Lüscher 2009). El endotelio modula las propiedades mecánicas y geométricas de las arterias. Por ello, la disfunción endotelial podría estar implicada, no sólo en el desarrollo de la aterosclerosis, sino también en el remodelado vascular (arteriosclerosis) y, en definitiva, en el elevado riesgo cardiovascular descrito en los pacientes urémicos (Mombouli and Vanhoutte 1999).

La disfunción endotelial se caracteriza funcionalmente por la desregulación de la producción de óxido nítrico (NO) y endotelina 1 (ET-1) (Kawashima and Yokoyama 2004, Sudano et al. 2007) que conduce a la incapacidad funcional de las células endoteliales (CE), así como un aumento en las moléculas de adhesión y quimiotaxis y una alteración en la permeabilidad (Holubarsch 2000). De forma progresiva, la disfunción endotelial avanza desprendiéndose de la capa íntima de las células dañadas y originado un “huevo desnudo” que expone al exterior el espacio subendotelial rico en colágeno y proteínas fibrilares, cuya consecuencia a largo plazo es el desarrollo de una enfermedad aterosclerótica (Ross and Glomset 1973, Ross 1999).

Existen otras moléculas que tienen relación con estos procesos, como el factor transformante de crecimiento  $\beta$  (TGF-  $\beta$ ), con importantes aplicaciones en la génesis de la fibrosis que acompaña a la inflamación vascular y de los órganos diana del proceso patológico cardiovascular (Redondo, Santos-Gallego, and Tejerina 2007). Además, hay que tener en cuenta otros factores de crecimiento secretados por las células activadas en el proceso de daño endotelial, tales como factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (Volger et al. 2007) o el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Celletti et al. 2001), que se encuentran relacionados con el crecimiento de la placa aterosclerótica.



### 1.1 Fisiología del endotelio vascular

En los últimos años se ha demostrado que el endotelio es algo más que una simple barrera inerte entre la sangre y la pared vascular. El endotelio se considera un elemento activo que participa en la regulación del tono vascular, del crecimiento y migración de la fibra muscular lisa vascular subyacente y del mantenimiento de la arquitectura vascular, en la regulación la composición de la matriz subendotelial, en la permeabilidad a sustancias, en fenómenos inflamatorios (reclutamiento y transmigración de leucocitos y plaquetas), y en el balance entre coagulación y fibrinólisis. Ello requiere la participación de distintos mediadores que tienen como núcleo central la CE, requiriendo para su buen funcionamiento de su integridad tanto funcional como estructural (Cases et al. 2003).

Las CE, son células aplanadas conectadas entre sí en la capa interior de los vasos sanguíneos formando una monocapa que tapiza todo el sistema vascular y controla la comunicación entre la sangre y los vasos sanguíneos, ejerciendo un papel dual como sensor y transmisor de señales. Sus precursores, las células progenitoras del endotelio (EPC), se originan en la médula ósea, entran en la circulación y llegan a la zona donde deben ejercer su función, regenerando o activando la regeneración (Drexler 1997).

### 1.2 Marcadores de disfunción endotelial

En la práctica clínica, existen marcadores de inflamación que se han relacionado con el daño endotelial, como la proteína C reactiva (PCR). Esta proteína pertenece a la familia de las pentraxinas, grupo de proteínas muy preservadas durante la evolución y que preceden al desarrollo de las respuestas inmunes. Sus niveles sanguíneos son el resultado directo de su síntesis hepática. La activación del gen encargado de su síntesis se produce por la acción de la interleucina-6 (IL-6) (Castell et al. 1990) . La interleucina-1 (IL-1), los glucocorticoides, y los productos de activación del complemento actúan sinérgicamente potenciando las acciones de la IL-6 (Castell et al. 1990). La función biológica principal de la PCR es el reconocimiento de patógenos y de las células dañadas del huésped (incluidos antígenos nucleares, lipoproteínas y células apoptóticas), y participar en su eliminación activando las células fagocíticas y el sistema de complemento (Lacson and Levin 2004). Consecuentemente a su función, es una proteína que se encuentra elevada en numerosas patologías, tales como procesos infecciosos (Grützmeier and Sandström

1999), virales, como la progresión del virus de inmunodeficiencia humana adquirida (VIH) (Lau et al. 2006), enfermedades inflamatorias del tejido conectivo, como el lupus eritematoso sistémico (LES) o la artritis reumatoide (HILL 1951), en obesidad (Aronson et al. 2004), diabetes mellitus (DM) (Goldberg 2000), y también se encuentra relacionada con el hábito de fumar y el desarrollo de ECV (Abdelmouttaleb et al. 1999).

### 1.3 Mecanismos implicados en el proceso inflamatorio y el daño endotelial asociado a la uremia

La inflamación es un proceso complejo que se asocia con numerosas enfermedades, siendo una de ellas la ERC. En la década de los 90 aparecieron estudios que relacionaban la inflamación provocada por la uremia con la ECV y el mal pronóstico de este tipo de pacientes (Noh et al. 1998, Iseki et al. 1999). Existen dos aspectos que pueden desencadenar un proceso inflamatorio en la ERC, como son la retención de moléculas y/o mediadores del proceso inflamatorio, y la generación de nuevas moléculas proinflamatorias intrínsecas al proceso urémico

La respuesta inflamatoria juega un papel muy importante en la defensa del organismo frente a agresiones externas. Su principal objetivo es eliminar los agentes que pueden producir daño tisular. Pero si esta inflamación se perpetúa en el tiempo, como pasa en la uremia, el estado inflamatorio crónico puede llegar a ser nocivo para el organismo, pasando de ser un mecanismo de defensa a ser un mecanismo de daño (Barton 2008). Por tanto, el estado de microinflamación crónica que hay en la uremia, se ha propuesto como uno de los mecanismos responsables de la disfunción endotelial, primer paso para el posterior desarrollo de aterosclerosis; aunque la forma en que se produce este daño no es del todo bien conocida.

Como consecuencia de este proceso inflamatorio asociado a la uremia, el endotelio dañado produce proteínas tales como proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), que participa en la etiopatogenia de la aterosclerosis (Lin, Kakkar, and Lu 2014), psoriasis (Lembo et al. 2014) o artritis reumatoide (Pavkova Goldbergova et al. 2012); factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF) que es un regulador importante de la respuesta inmune y de la homeostasis tisular, y factor nuclear  $\kappa$ B (NF $\kappa$ B) que transcribe genes que se encuentran relacionados con el proceso inflamatorio (Sima, Stancu, and Simionescu 2009).

### 1.4 Papel de los monocitos como nexo entre inflamación y daño endotelial

Existe otro mecanismo que explica la relación entre inflamación y daño endotelial de los pacientes con ERC. Se basa en una activación del sistema inmune de monocitos representada por una subpoblación monocítica, CD14+CD16++. Estas células se encuentran aumentadas en sangre periférica de pacientes urémicos aún sin existir un aumento esencial de marcadores de inflamación típicos como la PCR o las citoquinas proinflamatorias (Ramirez et al. 2006).

Los monocitos de sangre periférica constituyen una población celular muy heterogénea (Ziegler-Heitbrock et al. 2010), que puede ser diferenciada por la expresión de moléculas de membrana por citometría de flujo. La mayoría de los monocitos presentan una elevada expresión de una glicoproteína de membrana anclada por el receptor GPI (glicosilfosfatidilinositol) del lipopolisacárido bacteriano, o molécula CD14 y normalmente, no expresan el receptor Fc de la inmunoglobulina G (FcγRIII) o CD16. A finales de la década de los 80 (Passlick, Flieger, and Ziegler-Heitbrock 1989), se describió una subpoblación de monocitos que tenían baja expresión de CD14 y que además, coexpresaban la molécula CD16. La función biológica de CD16 en la célula es actuar como componente del receptor de baja afinidad para Fc, y mediar en la fagocitosis y en la citotoxicidad debida a células dependientes de anticuerpos.

En función de la expresión en membrana de los receptores CD14 y CD16, los monocitos se diferencian en diferentes subpoblaciones. La nomenclatura que actualmente se acepta fue aprobada por el Comité de Nomenclatura de la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas (IUIS) (Ziegler-Heitbrock 2000) (Figura 1):

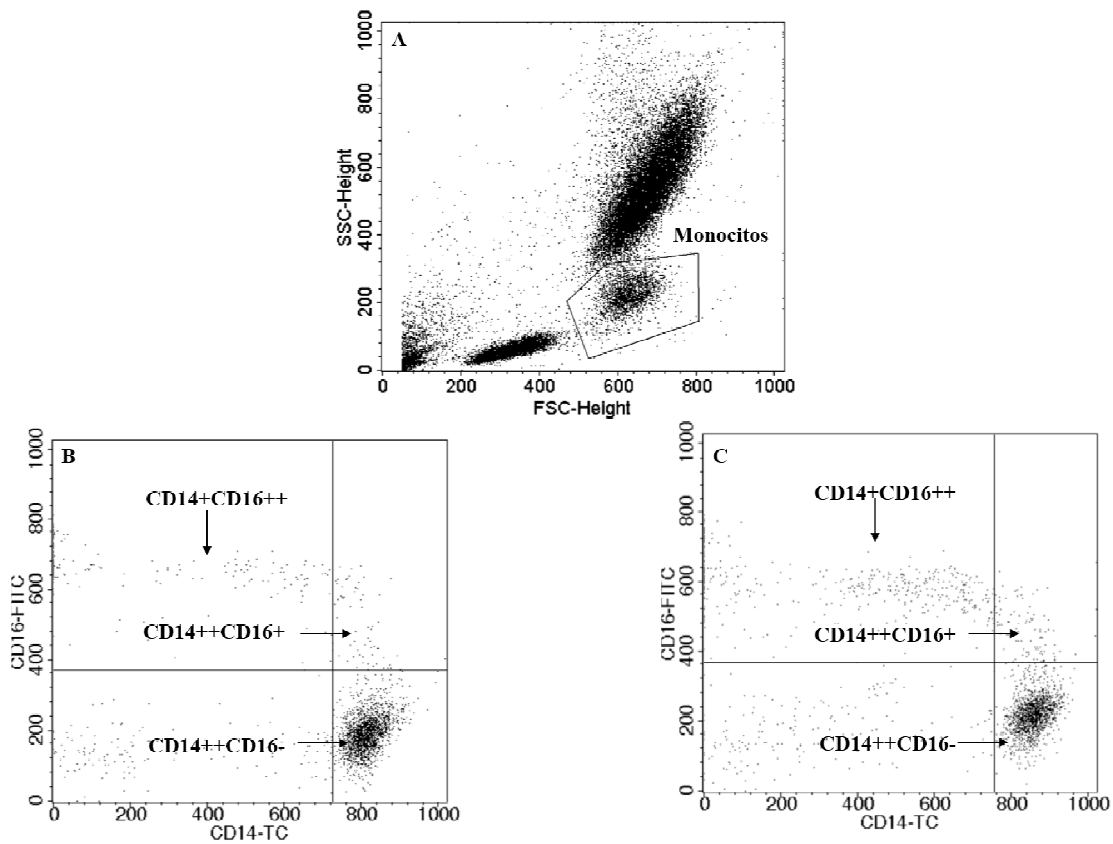
- *Monocitos Clásicos CD14++CD16-*: Las células CD14++CD16- forman el grupo de “monocitos clásicos” y representan el 90-95% del total de monocitos periféricos en un individuo sano; expresan CCR2 (Receptor quemoquina C-C tipo 2), receptor tipo I para la fracción Fc de la IgG o FcγRI (CD64) que es una glicoproteína de membrana que se une con alta afinidad a anticuerpos IgG y, L-selectina (CD62L) que es una molécula de adhesión celular que se expresa en linfocitos y monocitos, cuya función es la adhesión inicial de la subpoblación de monocitos clásicos al endotelio vascular. Su función principal es eliminar los neutrófilos apoptóticos en los lugares de inflamación (Auffray, Sieweke, and Geissmann 2009).

## *Introducción*

---

- *Monocitos Intermedios CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup>*: Esta población representa el porcentaje de monocitos de sangre periférica en sujetos sanos (Wildgruber et al. 2016). En pacientes con ECV y ERC se ha observado una relación directa entre esta subpoblación CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> y la aparición de eventos cardiovasculares (Rogacev et al. 2012, Rogacev et al. 2011, Heine et al. 2008). Estas células muestran una morfología típica de macrófagos, actividad fagocítica, características angiogénicas y generación de especies reactivas de oxígeno intracelular. Para su movilización requieren CCR2, CXCR4 (Receptor quemoquina C-X-C tipo 4) que es el receptor del factor derivado de células estromales tipo 1 (SDF-1) y CD44, que es una glicoproteína de membrana implicada en la adhesión entre células y diferentes componentes de la matriz extracelular (Mandl et al. 2014).

- *Monocitos no clásicos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup>*: esta población representa normalmente el 5-10% del total de monocitos en sangre periférica en sujetos sanos. Estos monocitos exhiben una mayor expresión de citoquinas proinflamatorias, una mayor efectividad para la presentación antigénica y una mayor capacidad de extravasación, hechos que podrían explicar su frecuente asociación con la etiopatogénesis de múltiples enfermedades (Ziegler-Heitbrock 2007, Urra et al. 2009, Mizuno et al. 2005).



**Figura 1.** *Análisis de las subpoblaciones monocíticas por citometría de flujo. Para analizar las tres subpoblaciones de monocitos se realiza, A) una región donde se incluyen el total de monocitos en la ventana de tamaño (FSC) y complejidad (SSC). A partir de esta región, se separan las subpoblaciones de monocitos utilizando los anticuerpos CD14 y CD16. B) Se muestran las subpoblaciones de un sujeto sano y C) paciente con ERC*

Aunque la subpoblación de monocitos CD14+CD16++ sea minoritaria en sujetos sanos, puede llegar a alcanzar hasta el 40% del total de monocitos en algunas enfermedades inflamatorias como en el VIH (Fischer-Smith et al. 2001), en LES, en IRC (Nockher and Scherberich 1998) y en la artritis reumatoide (Cairns, Crockard, and Bell 2002). Estos monocitos han sido descritos como una subpoblación de células más maduras que CD14++CD16- y productoras de citoquinas proinflamatorias como factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )(Belge et al. 2002).

Además, la subpoblación de monocitos CD14+CD16++ presenta unas características especiales tales como unos telómeros más cortos que la subpoblación

de monocitos CD14<sup>++</sup>CD16<sup>-</sup> y una mayor de concentración de citoquinas proinflamatorias a nivel citoplásmico (Ramírez et al. 2006, Ulrich et al. 2008). Así mismo, la subpoblación monocítica CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> induce microinflamación endotelial por un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS), e inducen un aumento de la apoptosis en células endoteliales de cordón umbilical humanas (HUVECs).

Los monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> presentan una mayor capacidad para alcanzar y unirse al endotelio vascular dañado, produciendo en este endotelio un incremento en la liberación de citoquinas y factores angiogénicos, una mayor expresión de moléculas de adhesión endotelial, y un aumento en la liberación de microvesículas (MV) que tienen un efecto nocivo para las CE (Ramírez et al. 2011, Merino et al. 2011, Ramírez et al. 2006). Además, en los últimos años con los avances en las “ómicas” se han esclarecido diferencias entre las subpoblaciones monocíticas a nivel de proteoma y también del transcriptoma (Zhao et al. 2009).

En definitiva, la acumulación de monocitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>++</sup> en sangre periférica parece jugar un papel destacado en la inducción y/o ser responsables de perpetuar el proceso inflamatorio en los pacientes con ERC, así como participar en la generación del daño endotelial asociado a esta inflamación.

### *2. Procesos relacionados con daño del endotelio. Generación de microvesículas*

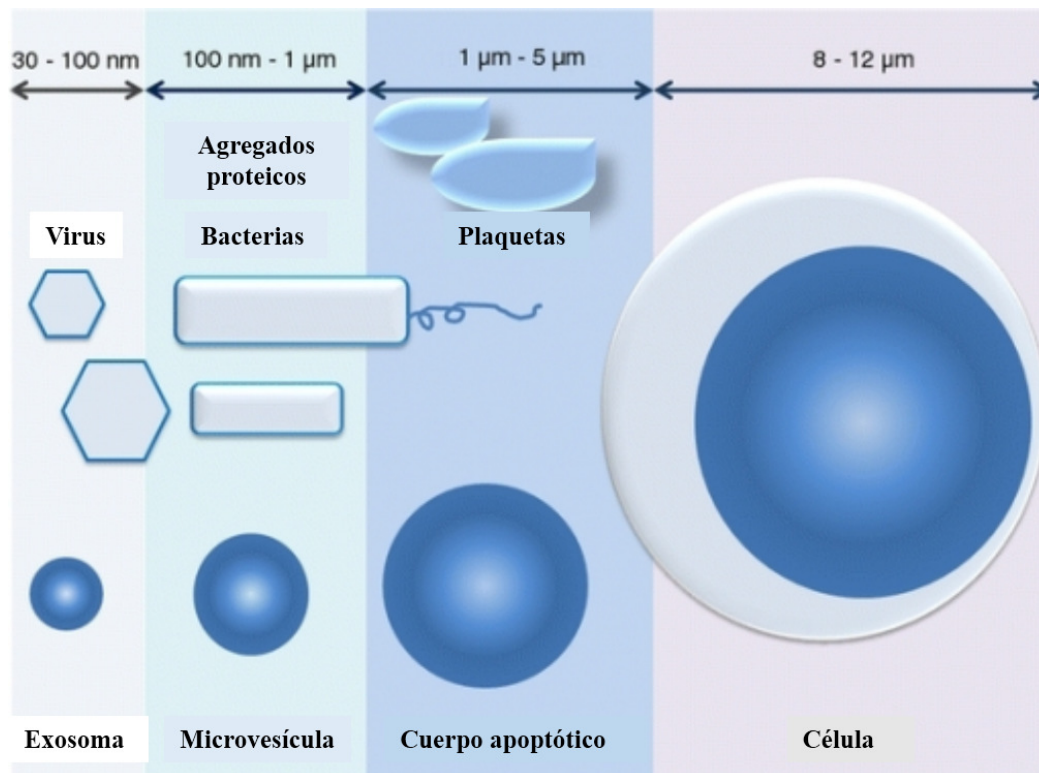
Las CE presentan una superficie no adherente y anticoagulante en relación con el flujo de sangre circulante; la lesión de estas células endoteliales puede provocar un aumento de la adhesión celular y la iniciación de la coagulación con el consiguiente desarrollo de inflamación y trombosis (Jimenez et al. 2003). Como hemos comentado anteriormente, la alteración del endotelio se ha considerado como el primer estadio para el desarrollo de ECV. En consecuencia, la detección de la alteración morfológica o funcional de la CE resulta fundamental para el diagnóstico precoz y la intervención profiláctica en muchas situaciones protrombóticas y proarterioscleróticas. Sin embargo, controlar el estado del endotelio resulta difícil debido a su inaccesibilidad; esta situación ha mejorado en los últimos años porque se ha demostrado que las células endoteliales pueden liberar MV, también conocidas como micropartículas, con características que reflejan el estado de la célula que las originó (Minciacchi, Freeman, and Di Vizio 2015).

### 2.1 Definición de Microvesículas

La vesiculación celular fue descrita por primera vez por Wolf (1967), que describió la liberación de “residuos” celulares tras la activación plaquetaria (Wolf 1967). Actualmente sin embargo, se sabe que la vesiculación celular es un proceso altamente regulado por la propia célula y que va a tener funciones y características específicas relacionadas con su proceso de producción.

Las MV pueden definirse como partículas esféricas provistas de una capa fosfolipídica (van der Pol et al. 2012), que producen casi todos los tipos celulares, como las CE, y que se liberan como consecuencia de un proceso de activación, lesión y/o apoptosis (Combes et al. 1999).

En cuanto a su tamaño, estas estructuras se clasifican en tres tipos: los exosomas, con un tamaño comprendido entre 30 y 100 nm; las micropartículas ó microvesículas, que oscilan entre 100 y 1000 nm; y los cuerpos apoptóticos con un diámetro entre 1 y 3  $\mu\text{m}$  (György et al. 2011, van der Pol et al. 2014). El proceso de identificación y separación de las vesículas extracelulares ofrece una gran dificultad debido a su gran variabilidad (Figura 2).



**Figura 2.** Rangos de tamaños de los principales tipos de vesículas de membrana. Mientras que los exosomas comparten la distribución del tamaño con los virus, las microvesículas se asemejan en tamaño a bacterias y agregados de proteínas (por ejemplo, inmunocomplejos).

## *Introducción*

---

*Cuerpos apoptóticos y plaquetas caen en el rango de tamaño de 1-5  $\mu\text{m}$ . Modificado de (György B et al, 2011).*

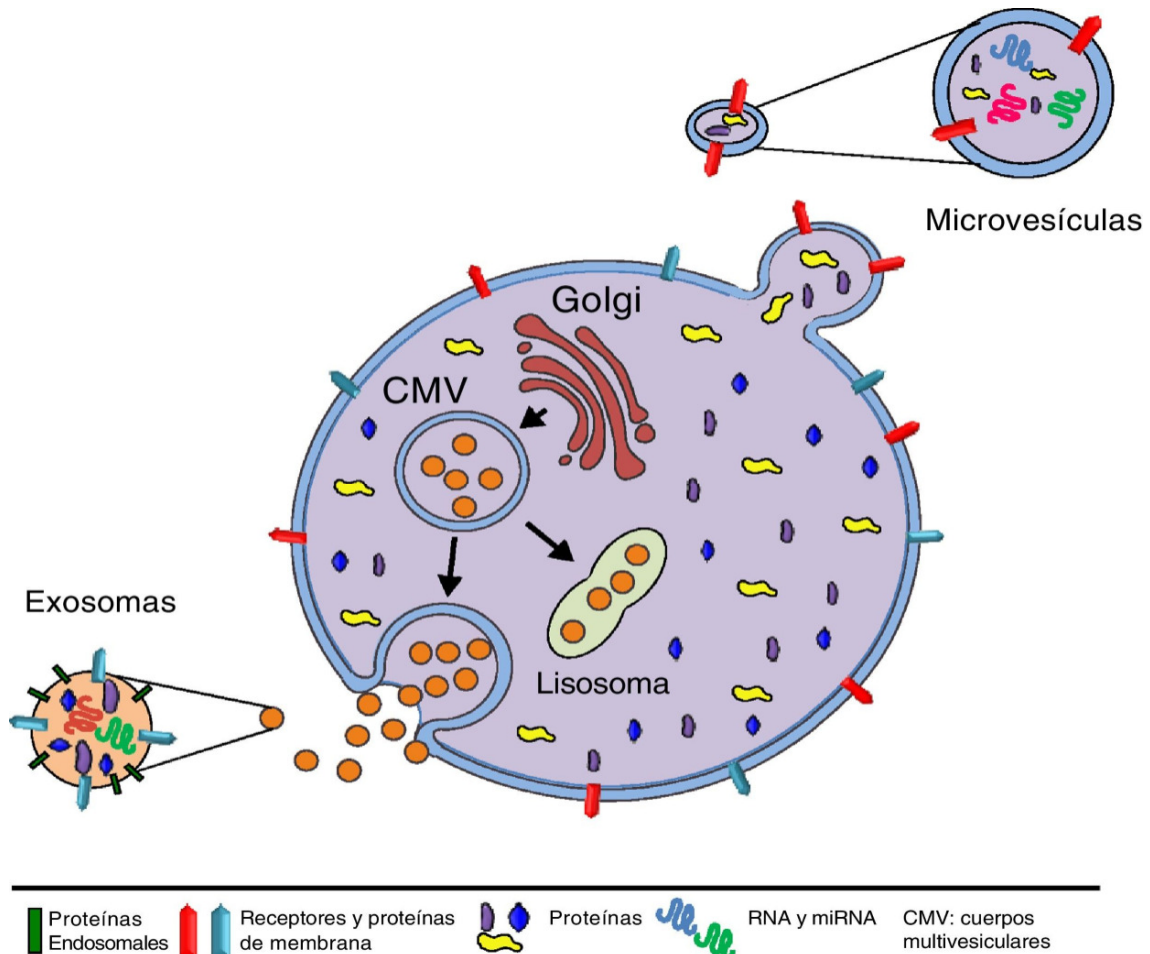
Los exosomas son las vesículas de menor tamaño y derivan de un proceso de endocitosis de la membrana celular, que a su vez se fusionan en cuerpos intracelulares (Johnstone et al. 1987). Una vez formados, se liberan al espacio extracelular, donde llevarán a cabo su función, mediante la fusión con la membrana plasmática o liberándose directamente por exocitosis por un proceso de activación celular. Estas vesículas están implicadas en la comunicación célula-célula transmitiendo la información principalmente de tres formas, mediante interacción ligando-receptor, por fusión con la membrana citoplasmática o por fagocitosis (Burger et al. 2013). Los exosomas contienen microRNA (miRNA), ARN mensajero (ARNm), fragmentos de DNA y proteínas (Valadi et al. 2007). Tienen una nula o baja capacidad de ligarse a Anexina V (Février and Raposo 2004).

Los Cuerpos apoptóticos son fragmentos celulares formados en la etapa tardía del proceso de apoptosis denominado “*budding*” que sufren determinadas células y que se forman como consecuencia de la fragmentación de la célula durante este proceso. Estos cuerpos apoptóticos son posteriormente fagocitados por macrófagos, células parenquimatosas o células neoplásicas y degradados dentro de los fagolisosomas (Elmore 2007). De manera diferencial con otros tipos de vesículas, contienen DNA e histonas y presentan alta capacidad de unión a Anexina V (Distler et al. 2006).

Las MV, a pesar de que durante mucho tiempo fueron consideradas como desechos celulares originadas de forma pasiva ante estímulos de daño celular, actualmente se acepta de manera consensuada que podrían originarse de forma activa. Presentan una función importante como mediadoras de la intercomunicación celular por su capacidad para transportar enzimas, proteínas, fragmentos de material genético ya sea ADN o ARN, así como moléculas de miRNA (Beyer and Pisetsky 2010, Burger et al. 2013). Por ello, las MV constituyen un sistema de comunicación célula-célula tanto local como sistémico (Lee et al. 2011). Pueden actuar sobre las células diana directamente uniéndose a ligandos, receptores de superficie y/o enzimas asociadas a la membrana, entregando o liberando su contenido directamente al citoplasma. El que las MV desencadenen mecanismos homeostáticos o deletéreos sobre otras células diana dependerá tanto de su contenido interno, que será



consecuencia de los estímulos que hayan llevado a su formación, como del número de



MV generadas (Hugel et al. 2005) (Figura 3).

*Figura 3. Origen y composición de las microvesículas extracelulares. Modificada de (Rovira J et al, 2017).*

Debido al diferente tamaño de las tres “entidades” de MV, el procesamiento de la muestra ha de ser diferente para cada una de ellas. Hasta 2010, no existió un consenso al respecto en cuanto al manejo de la muestra, lo cual había dado lugar a una gran heterogeneidad de estudios (Lacroix et al. 2012). De hecho, el estudio de las MV está todavía en pleno desarrollo, y aún hay numerosas limitaciones en los métodos de detección y bastantes diferencias en los protocolos de obtención y purificación de MV, que van desde el anticoagulante utilizado, la velocidad de centrifugación, las condiciones de filtración, y el tipo de almacenamiento utilizado (Orozco and Lewis 2010).

La determinación y/o cuantificación de las MV puede hacerse por diferentes técnicas tales como Western blot, “*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*” (ELISA), microscopía de barrido, microscopía electrónica, espectrofotometría de masas, citometría de flujo (Franquesa et al. 2014), “*nanoparticle tracking analysis*” (NTA), “*tunable resistive pulse sensing*” (TRPS) (van der Pol et al. 2016).

### 2.2 Aislamiento de microvesículas

Uno de los mayores retos es mejorar y estandarizar los métodos de aislamiento y análisis de MV (Théry et al. 2006). Actualmente, las MV se suelen aislar en su mayor parte a partir de los sobrenadantes de células cultivadas realizando una ultracentrifugación diferencial. Se pueden usar diferentes velocidades de ultracentrifugación para separar MV de tamaños diferentes (Aalberts et al. 2012). Además, debido al creciente interés en exosomas y otras MV y de su uso como biomarcadores con potencial diagnóstico y terapéutico para la enfermedad, se están desarrollando y comercializando kits que permiten "procedimientos de aislamiento fáciles".

### 2.3 Biogénesis y eliminación de microvesículas

La formación de MV tiene lugar mediante una evaginación de la membrana plasmática hacia el exterior mediado por la reorganización del citoesqueleto. Se ha observado que la formación de MV se produce en microdominios de la membrana plasmática, como son las regiones ricas en balsas de lípidos “*lipid rafts*” o en caveolas (Morel et al. 2011). Los estímulos que desencadenan dicho proceso son muy diferentes dependiendo del tipo celular que las genere. Se han descrito MV procedentes de plaquetas, que fueron las primeras observadas, MV originadas por CE, de eritrocitos, células musculares, células T, neutrófilos y fibroblastos, entre otras (Burger et al. 2013). Debido a que en su proceso de formación se produce una evaginación de la membrana plasmática, podemos encontrar en las MV marcadores de superficie de la célula de origen, lo cual resulta útil para identificarlas con diferentes técnicas usando anticuerpos específicos (Lacroix et al. 2010).

En la biogénesis de MV están implicados procesos de diferenciación celular, estrés, activación celular, senescencia celular, estimulación por citoquinas, apoptosis, hipoxia y transformación maligna (Bianco et al. 2009, Parolini et al. 2009, Park et al. 2010). Por tanto, la cuantificación de MV nos puede permitir conocer qué procesos

están dándose en el momento de su producción. De este modo las MV son unos biomarcadores de gran interés que presentan grandes ventajas: se pueden obtener por procedimientos poco invasivos, nos pueden dar información de células minoritarias y de órganos y/o tejidos; e información simultánea y completa de procesos complejos en los que intervienen diferentes poblaciones celulares.

Los procesos de activación celular y apoptosis son cruciales para la liberación de MV. En los procesos de activación celular, la liberación de MV se produce como respuesta a un estímulo que incrementa la concentración del calcio intracelular, activa las quinasas e inhibe las fosfatasas. En cambio, en respuesta a un estímulo apoptótico, es determinante la activación de la Rho-quinasa (ROCK-1); que interviene en la contracción de la miosina de la membrana celular posibilitando la unión de la proteína Rho al guanósín trifosfato (GTP) (VanWijk et al. 2003).

La liberación de MV no siempre se rige por un aumento de calcio intracelular. La liberación de MV a partir de plaquetas no estimuladas depende de la integrina  $\alpha$ IIb $\beta$ 3 y de una rotación del citoesqueleto (Cauwenberghs et al. 2006).

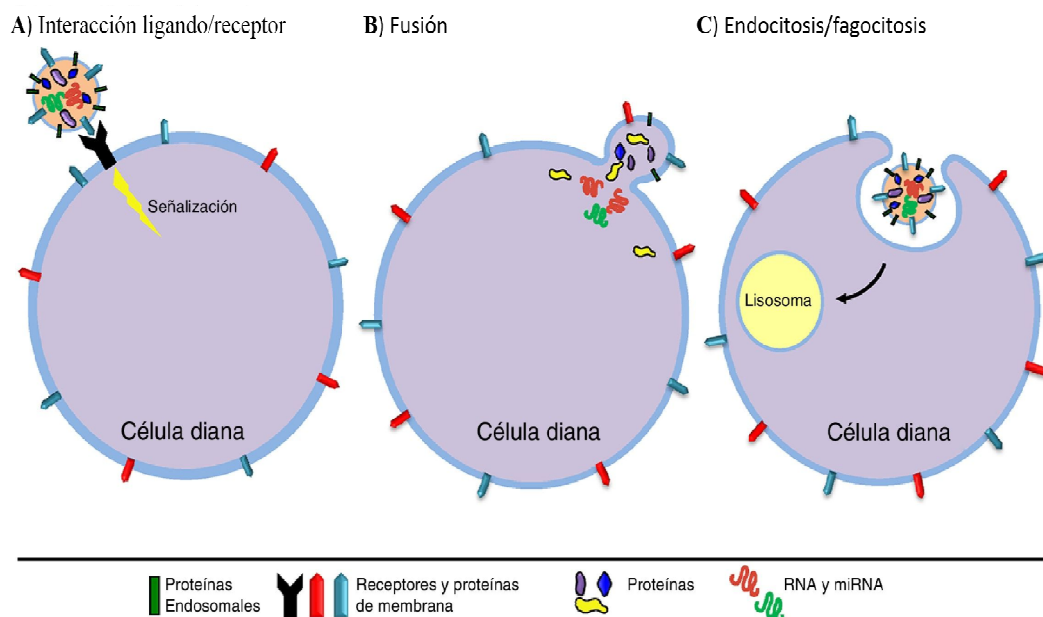
Los mecanismos por los que se eliminan MV están mucho menos estudiados. Las MV in vivo se cree son “ingeridas” por las células fagocíticas en un proceso de fagocitosis en el que la fosfatidilserina puede tener una importante implicación (Willekens et al. 2005). *In vitro*, se ha observado que las microvesículas derivadas de plaquetas (MVP) son endocitadas por CE cerebrales y por HUVEC, lo que sugiere un papel de las CE en la fagocitosis de MVP (Faille et al. 2012, Terrisse et al. 2010).

### 2.4 Microvesículas y comunicación celular

Muchos estudios han documentado el importante papel biológico de las MV como mediadores de la comunicación celular. Las MV transmiten información a las células receptoras que están presentes en el entorno extracelular circundante a través de varios mecanismos. Algunas MV pueden entregar su contenido a través de diferentes tipos de endocitosis, como la endocitosis mediada por clatrina que es dependiente o independiente de los receptores; o bien, la macropinocitosis y la endocitosis mediada por el dominio de las balsas (Cocucci, Racchetti, and Meldolesi 2009, Tian et al. 2014). Una vez absorbidos en el sistema endosomal-lisosómico, las MV pueden fusionarse con la membrana del orgánulo y “volcar” su contenido en el citoplasma o también pueden fusionarse con la membrana de la célula receptora para

## Introducción

liberar su carga intracelularmente, ya sea directamente o a través de receptores específicos (Prada and Meldolesi 2016). Además, pueden liberar su contenido en el espacio extracelular y activar una respuesta rápida en las células vecinas (Cocucci and Meldolesi 2015). Finalmente, las moléculas expresadas en la superficie de la membrana de las MV pueden desencadenar cascadas de señalización a través de interacciones receptor/ligando sin internalización (Raposo and Stoorvogel 2013, Cocucci and Meldolesi 2015, Loyer et al. 2014). Por lo tanto, las MV tienen el potencial de proporcionar información compleja a múltiples células en su entorno tisular y funcionan como sistemas dinámicos que son capaces de adaptar su contenido, y consecuentemente su función, dependiendo tanto de la fuente celular como del estímulo que engendró su biogénesis (Figura 5).



**Figura 4. Origen y composición de las vesículas extracelulares.** A) Mecanismo de interacción ligando/receptor, B) Mecanismo de fusión u C) por endocitosis/fagocitosis. Modificada de (Rovira J et al, 2017).

### 2.5 Las microvesículas como elementos transportadores de miRNA

Los miRNA son moléculas de ARN no codificantes altamente conservadas de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud que ejercen efectos post-transcripcionales sobre la expresión génica (Bartel 2004). Los miRNA se expresan de una manera específica según el tipo de tejido y de célula, y desempeñan papeles esenciales en muchos procesos fisiopatológicos incluyendo la inflamación

(Hulsmans, De Keyzer, and Holvoet 2011), las enfermedades metabólicas y las ECV (Fernández-Hernando et al. 2013, Thum and Mayr 2012). La mayoría de los miRNA están presentes dentro de la célula, aunque también pueden encontrarse fuera de ella, incluyendo algunos fluidos corporales (Hunter et al. 2008, Weber et al. 2010). Los miRNA extracelulares presentan cierta estabilidad a pesar de la actividad RNasa (Mitchell et al. 2008); por lo tanto, es probable que estos miRNA extracelulares se encuentren empaquetados dentro de las vesículas, fundamentalmente exosomas y MV, para protegerlos de su degradación (Valadi et al. 2007, Hunter et al. 2008). Aun así, se debate sobre el tipo de vesículas que participan predominantemente en el transporte de miRNA (Xu, Yang, and Ai 2013).

### 2.6 Microvesículas y su papel en patologías

Las MV se encuentran incrementadas en pacientes con diferentes tipos de patologías vasculares, metabólicas, autoinmunes, neurodegenerativas, en inflamación crónica y en cáncer (Amabile et al. 2014). La utilización de MV como marcadores para la predicción, diagnóstico, pronóstico y monitorización de terapias de enfermedades complejas resulta cada vez más atractiva, así como su potencial para identificar nuevas dianas terapéuticas (Yin, Loyer, and Boulanger 2015).

#### *Microvesículas y cáncer*

Durante los últimos años, se ha demostrado que las MV juegan un papel directo o indirecto en la patogénesis de diversas enfermedades, siendo el cáncer una de ellas (Amabile et al. 2008, Hsu and Camacho 1999). La presencia de MV en pacientes con cáncer ya se había observado desde finales de los 70 (Friend et al. 1978); y más recientemente, se han encontrado niveles elevados de MV en la sangre de pacientes con cáncer (Ginestra et al. 1998, Kim et al. 2003, Zwicker et al. 2009). Las células cancerosas insensibles a la quimioterapia expresan más genes relacionados con la producción de MV en contraposición a las células más sensibles. Curiosamente, las MV de las células insensibles contienen altos niveles de fármacos quimioterapéuticos como Doxorubicin (Shedden et al. 2003) o cis-platino (Safaei et al. 2005), lo que implica que las células cancerosas probablemente podrían expulsar el fármaco quimioterapéutico a través de la liberación de MV con el fin de escapar del fármaco; y posiblemente, estas MV podrían ser las responsables de proporcionar un mecanismo para la resistencia a múltiples fármacos. Las MV también ayudan a las

células cancerosas a evadirse del sistema inmune (Valenti et al. 2006, Hakulinen et al. 2004), pudiendo no sólo favorecer la proliferación y crecimiento de los tumores; sino que también se propaguen a otras partes del cuerpo a través de las metástasis (Graves et al. 2004).

### *Microvesículas y enfermedad renal crónica*

Los pacientes con ERC presentan niveles elevados de MVP de neutrófilos, de eritrocitos y de CE (Faure et al. 2006, Daniel et al. 2006, Ando et al. 2002, Burton et al. 2013, Amabile et al. 2005, Trappenburg et al. 2012). Además, algunos autores han mostrado que en pacientes en hemodiálisis el número de MV no disminuye, sino que, por el contrario, hay mayor cantidad de MV por lo que se piensa que las MV no se eliminan por las técnicas de diálisis (Daniel et al. 2006).

Así mismo, las MV derivadas de CE podría predecir el número de eventos cardiovasculares en pacientes urémicos (Amabile et al. 2012) (Amabile et al. 2012). Además en modelos *in vitro* de cultivo con HUVEC, se han observado que niveles elevados de p-cresol e indoxyl sulfato (dos toxinas urémicas unidas a proteínas) inducen un incremento en la liberación de MV (Faure et al. 2006).

### *Microvesículas y trastornos inflamatorios*

Las MV se encuentran elevadas en enfermedades autoinmunes (Sellam et al. 2009, Aatonen, Grönholm, and Siljander 2012) como en el lupus eritematoso sistémico (LES), en el que las MV se correlacionan con el grado de lipidemia, glomerulonefritis, y la presión arterial que presentan esos pacientes (Nielsen et al. 2011) (Nielsen CT et al, Arthritis Rheum. 2011 Oct;63(10):3067-77). En pacientes con artritis reumatoide el número de MV se correlaciona con la sintomatología de la enfermedad (Knijff-Dutmer et al. 2002).

### 2.7 Liberación de Microvesículas endoteliales, un mecanismo relacionado con el daño del endotelio

La activación o lesión del endotelio vascular da lugar a una gran variedad de desórdenes inflamatorios incluido la liberación MVE. Como hemos comentado anteriormente, las MVE son vesículas anucleadas comprendidas de tamaño entre 100-1000 nm que las CE emiten como respuesta a una activación, lesión y/o apoptosis (Burger et al. 2016, Schiro et al. 2014). Las situaciones de isquemia, hipoxia, hiperglucemia, niveles elevados de PCR y de urea también inducen la liberación de

MVE (Yong, Koh, and Shim 2013). Estos estímulos no son sólo pro-apoptóticos, sino que pueden ser pro-inflamatorios, pro-trombóticos u oxidativos (Leroy, Tedgui, and Boulanger 2008).

La presencia de MVE se ha constatado en diversos fluidos como saliva (Berckmans et al. 2011), orina (Smalley et al. 2008), líquido sinovial (Berckmans et al. 2002), plasma, sangre periférica y también en lesiones inflamatorias (Burger et al. 2013).

### *Caracterización de microvesículas endoteliales*

Las MVE se pueden definir de acuerdo con las glicoproteínas de membrana, ya que poseen antígenos que se expresan constitutivamente en CE tales como CD31. Los marcadores de superficie característicos de las MVE que son numerosos y diferentes, siendo la mayoría de ellos no específicos para las CE. Se han propuesto estrategias que utilizan una combinación de proteínas derivadas de diferentes tipos de células para identificarlas y resolver estas dificultades. Los epítomos derivados de diferentes tipos de células utilizados son los marcadores CE positivos (por ejemplo, CD31 y CD144) en combinación con la ausencia de los marcadores plaquetarios CD41 o CD42b (Trzepizur et al. 2014). Los niveles de MVE CD31+, MVE CD105+, MVE CD144+ parecen aumentar como consecuencia de un proceso apoptótico en CE (Tramontano et al. 2004, van Ierssel et al. 2010). Por el contrario, cuando el endotelio se activa funcionalmente, aumentan los niveles de MVE CD62E+, MVE CD51+ y MVE CD106+ (Tramontano et al. 2004, Tramontano et al. 2010, van Ierssel et al. 2010) (Tabla 1).

<b>CD</b>	<b>Antígeno</b>	<b>Expresión</b>
CD31	PECAM-1	Apoptosis
CD54	ICAM-1	Activación
CD62E	E-Selectina	Activación
CD105	Endoglina	Apoptosis
CD106	VCAM-1	Activación
CD144	VE-cadherina	Apoptosis

**Tabla 1. Marcadores de activación y apoptosis de microvesículas endoteliales**

### *Clasificación fenotípica de las microvesículas endoteliales*

- MVE CD31+: se concentran en las uniones endoteliales. Sin embargo, el marcador CD31 (PECAM-1) también se expresa en la superficie de plaquetas, neutrófilos y linfocitos. Por lo tanto, se utilizan marcadores específicos de plaquetas, tales como CD41 ó CD42b, para distinguir las MVE de las MVP. En definitiva, las MVE CD31+ se definen como: CD31+/CD41- o CD42b-(Newman et al. 1990). Algunas de las funciones que se les atribuyen a las MVE CD31+ están relacionadas con la biología vascular, la regulación de la función plaquetaria, la angiogénesis, activación células B y T, la permeabilidad de la CE y la trans migración a través del endotelio(Patil, Newman, and Newman 2001, Cicmil et al. 2002, Falati et al. 2006, Woodfin, Voisin, and Nourshargh 2007, Ley et al. 2007), además de reflejar la apoptosis de las CE.

- MVE CD51+: El CD51 forma un heterodímero con una cadena de integrina- $\beta$ 3, como la glicoproteína IIIa (GPIIIa) o CD61, y se une a la vitronectina, al factor de von Willebrand (vWF) y a la fibronectina (Sosnoski et al. 1988). El CD51 se encuentra en CE, linfocitos B, monocitos, macrófagos y plaquetas(Kokubo, Uchida, and Choi 2007). Las MVE CD51 + pueden desempeñar un papel importante en el posicionamiento (“*homing*”) de leucocitos y en el proceso angiogénico (Sheppard 2004, Ley et al. 2007).

- MVE CD54+: La molécula CD54 (ICAM-1) es el ligando del antígeno asociado a la función de los linfocitos tipo 1 (LFA-1) y es una proteína



## *Introducción*

---

transmembrana que se encuentra en la superficie de las CE, sobre todo en un ambiente microinflamatorio, en células epiteliales, monocitos, macrófagos, en células T y en células presentadoras de antígeno (Marlin and Springer 1987, Józwik et al. 2015, Kim et al. 2015, Xie et al. 2015).

- MVE CD62E+: la molécula CD62E (E-selectina), solo se expresa en CE y se induce rápidamente como consecuencia de la activación por un proceso inflamatorio. Las MVE CD62E+ pueden desempeñar un papel importante en el reclutamiento de leucocitos en el lugar donde existe el daño durante el proceso inflamatorio (Patil, Newman, and Newman 2001, Ley et al. 2007). *In vitro*, el TNF $\alpha$  es capaz de inducir la liberación de MVE CD62E+ por las CE (Takahashi et al. 2013, Jimenez et al. 2003). En consecuencia, los niveles de MVE CD62E+ pueden ser indicativas de la inflamación existente.

- MVE CD105+: La endoglina (CD105) es un componente de los complejos factor transformante de crecimiento beta (TGF- $\beta$ ), proteína morfogenética de hueso 9 (BMP-9), proteína morfogenética de hueso 10 (BMP-10) y es un marcador de las células madre endoteliales y mesenquimales (Smirnov et al. 2015). Se expresa durante procesos inflamatorios y en el proceso de angiogénesis tumoral, pero su expresión es baja en CE en condiciones normales (Chrisostomidis et al. 2015).

- MVE CD144+: La VE-cadherina (CD144) se expresa en CE y su función es mantener las uniones endoteliales (Ley et al. 2007), y se encuentra específicamente en las uniones de adherencia (Bardin et al. 2001). Además, cualquier anomalía en la VE-cadherina está asociada con la migración de neutrófilos y un aumento de la permeabilidad vascular (Conway and Schwartz 2012). Koga y cols. (Schwartz et al. 2002), determinaron los niveles MVE CD144+ en la circulación humana, observándose niveles más altos en aquellos pacientes con diabetes mellitus y con enfermedad de las arterias coronarias, incluyendo aterosclerosis. En consecuencia, las EMV CD144+ pueden ser un sello distintivo de la aterosclerosis a través de la disfunción de células endoteliales.

- MVE CD146+: El CD146 es una molécula de adhesión de las CE que se ubica fuera de las uniones de adherencia aunque también se expresa en otros tipos celulares como en linfocitos B y T (Lehmann, Riethmüller, and Johnson 1989), en las células natural killer en situaciones patológicas (Elshal et al. 2005) o en pericitos

(Maier et al. 2010). En este sentido, las MVE CD146+ pueden considerarse otro marcador de daño endotelial.

### *Microvesículas endoteliales como mensajeros de la necesidad de reparación vascular*

En la circulación sanguínea humana, las MVE constituyen una población pequeña de la familia de MV (5-15%). Sin embargo, se han asociado ampliamente con la patogénesis de varias ECV, principalmente aquellas que se inician por una disfunción endotelial (Faure et al. 2006, Boulanger et al. 2001, Mallat et al. 1999). Las MVE muestran un papel clave en el crecimiento, división y maduración de las EPC, células que son extraordinariamente importantes para la regeneración de los vasos sanguíneos (Hristov et al. 2004). Esto sugiere un posible papel conservador de mantenimiento de la integridad del endotelio, produciéndose en respuesta a la regeneración vascular, restauración y protección (Dignat-George and Boulanger 2011).

### *Papel de las microvesículas endoteliales en la función/disfunción endotelial.*

En ausencia de patología, las MVE intervienen en el mantenimiento de la homeostasis vascular participando en el metabolismo del entorno vascular (Gaceb, Martinez, and Andriantsitohaina 2014). Las MVE están implicadas en procesos relacionados con la vascularización patológica y juegan un papel importante en el desarrollo de la ECV. En este sentido, se han relacionado a las MVE con diversos procesos de fisiopatología vascular tales como trombosis, inflamación (Williams et al. 2014) y angiogénesis (Tual-Chalot et al. 2014), participando en numerosos procesos patológicos vasculares, desde el desarrollo de aterosclerosis hasta la rotura de la placa y la trombosis. Debido a ello las MVE se han convertido en la actualidad en un potencial marcador de riesgo cardiovascular (França et al. 2015).

Los mecanismos por los que aumentan los niveles de MVE en pacientes con ECV o disfunción endotelial parecen estar relacionados con una activación de las CE, en respuesta a factores que alteran la estabilidad del endotelio vascular como la hipertensión, vasculitis, ateromatosis, etc. Esto hace que las MVE participen en los tres procesos derivados del daño endotelial: inflamación, formación de nuevos vasos y trombogénesis (França et al. 2015).

Por tanto, se piensa que fundamentalmente las MVE y en menor medida, las MVP son marcadores de función endotelial (Heiss et al. 2008, Chironi et al. 2006). Algunos estudios han demostrado que los niveles de MVE son un factor pronóstico de ECV; y, en pacientes con fallo renal crónico, los altos niveles de MVE CD31+CD42b-, son un factor predictivo independiente de muerte o evento cardiovascular (Amabile et al. 2012).

La concentración de MVE en sangre de sujetos sanos es prácticamente irrelevante. Sin embargo, en pacientes con factores de riesgo cardiovascular y después de que se produzcan eventos cardiovasculares, la concentración de MVE aumenta de forma significativa (Noci et al. 2015, Soriano et al. 2014, Carmona et al. 2017). De hecho, se ha observado que en pacientes con ECV existe una asociación entre el número de MVE circulantes y la puntuación del riesgo de Framingham, clásicamente utilizada para predecir el riesgo de morbimortalidad cardiovascular (Amabile et al. 2014). En particular, los niveles elevados de MVE en enfermedades asociadas con la lesión vascular, parecen reflejar un proceso inflamatorio y protrombótico. Las MVE pueden participar en el desarrollo y amplificación de las ECV actuando tanto sobre células cardíacas como vasculares. Por otro lado, numerosos estudios han dilucidado el efecto de medicamentos cardioprotectores sobre la reducción de la concentración de MVE (Yin, Loyer, and Boulanger 2015).

Las funciones específicas de las MVE circulantes no están del todo establecidas, aunque se han descrito varios mecanismos por los que pueden participar:

**MVE y estrés oxidativo:** las MV procedentes de diversos orígenes como las CE, monocitos y linfocitos son capaces de promover estrés oxidativo en el endotelio a través de procesos enzimáticos (Brodsky et al. 2004), aunque existen ciertas discrepancias en cuanto a su generación. Estos resultados contradictorios pueden deberse a que las poblaciones de MV estudiadas son de diferente origen o se han producido frente a diferentes estímulos.

**MVE y coagulación:** Una de las propiedades mejor descritas de las MV es su capacidad para promover la coagulación. De hecho, las MV se encuentran elevadas en trastornos hipercoagulativos probablemente como resultado de su participación activa (Meziani, Tesse, and Andriantsitohaina 2008). No se sabe hasta qué punto

pueden contribuir a la coagulación *in vivo*; pero se han realizado varios estudios *in vitro* que muestran un papel procoagulante. Las MV en general, poseen dos características específicas que pueden ser responsables de su implicación en el proceso de coagulación, como son la externalización de la fosfatidilserina como promotor de la coagulación y la expresión de TF, que es un componente crítico en las primeras etapas de dicho proceso (Yuana, Sturk, and Nieuwland 2013). Por el contrario, las MV que presentan el factor inhibidor del TF parecen tener un papel protector frente al proceso trombogénico (Lechner and Weltermann 2008). Se ha observado que el cociente entre MV que expresan TF y las MV que expresan factor inhibidor TF pueda ser un marcador de eventos trombóticos (Campello et al. 2016)

- MVE y calcificación vascular: En los pacientes con ERC, las MVE pueden participar directamente en la patogénesis de la calcificación vascular (Soriano et al. 2014). Además en estudios *in vitro*, las MVE producidas en un entorno inflamatorio o las procedentes de pacientes con ERC promueven la calcificación de las células de músculo liso por poseer un alto contenido en calcio y en proteína morfogénica ósea 2 (BMP-2) (Buendía et al. 2015). Así mismo un envejecimiento endotelial desempeña un papel clave en el trastorno cardiovascular. Las MVE del plasma de sujetos ancianos y las MVE producidas por CE senescentes favorecen la calcificación de células de músculo liso vascular (Alique et al. 2017).

-MVE y su relación con la inflamación y la aterosclerosis: La inflamación crónica es un factor clave para el desarrollo de aterosclerosis y los efectos de MVE en procesos inflamatorios han sido objeto de numerosos estudios, ya que podrían representar tanto una causa como una consecuencia de la inflamación (Schiro et al. 2014). Las MV aisladas de placas ateroscleróticas humanas pueden transferir ICAM-1 a las células endoteliales incrementando la capacidad para reclutar células inflamatorias de una manera dependiente de fosfatidilserina, lo que podría aumentar la progresión de la placa aterosclerótica (Rautou et al. 2011). La evidencia más concluyente de un papel proinflamatorio para las MVE se encuentra en que la administración exógena de MVE a ratas se asocia con lesiones pulmonares agudas, con un aumento de los niveles sistémicos y alveolares de citoquinas proinflamatorias (IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ ), infiltración de neutrófilos en el espacio perivascular y lesión histológica (Densmore et al. 2006).

MVE y apoptosis: Además de ser un potente estímulo para la formación de MV, la apoptosis también puede ser una consecuencia de la señalización de MV (Burger et al. 2013). Las MV derivadas de monocitos, eritrocitos, CE y plaquetas contienen caspasa 3 (Böing et al. 2008, Abid Hussein et al. 2005). Se piensa que el contenido de caspasas puede ser un mecanismo dirigido al control de la apoptosis, y se sugiere que las MV liberarían la caspasa 3 en las células diana, participando en la inducción de apoptosis (Abid Hussein et al. 2005). Además de la muerte celular, la caspasa 3 está implicada en numerosos procesos celulares, por lo que la liberación de caspasa puede tener un impacto todavía mayor sobre la célula diana.

MVE y angiogénesis: Diferentes estudios han descrito el papel de las MV en la regulación de la angiogénesis (Burger et al. 2013). Las MVP fueron las primeras implicadas (Kim et al. 2004) en el proceso angiogénico puesto que contienen al menos 20 factores de regulación de dicho proceso (Radziwon-Balicka, Moncada de la Rosa, and Jurasz 2012). Además las MVP estimulan la proliferación, supervivencia, migración y formación de vasos en CE *in vitro* (Kim et al. 2004). Además, la inyección de MV derivadas de plaquetas aumenta la densidad capilar post-isquémica miocárdica en ratas (Brill et al. 2005). Estudios posteriores han revelado que las MV aisladas de las placas ateroscleróticas intervienen en la formación de nuevos vasos y en la progresión de las placas hacia su rotura (Leroyer et al. 2008). En contraste con estos estudios, también se ha informado que los MV inhiben el proceso de angiogénesis bajo ciertas condiciones (Yang et al. 2008, Yang et al. 2010).

- MV y regeneración vascular: Inicialmente, la proliferación y migración de CE adyacentes se había identificado como un factor de reparación endotelial; estudios posteriores describen un mecanismo para el mantenimiento de la estructura endotelial que se asocia con la capacidad de las células progenitoras endoteliales (EPC) para diferenciar y reparar el tejido endotelial dañado. Debido a la importancia de este mecanismo de reparación-daño endotelial en el mantenimiento de homeostasis vascular, es lógico pensar que existe una estrecha comunicación entre las CE dañadas y EPC. Las MVE podrían influir en la regeneración endotelial interactuando directamente con la CE promoviendo la regeneración vascular o a través de la activación de las EPC (Hoyer, Nickenig, and Werner 2010). Las MVE de plasma tanto en sujetos sanos como en pacientes con ERC participan sobre la actividad de las EPC (Soriano et al. 2014). En modelos *in vitro* se ha demostrado que las MVE pueden

ser elemento clave en la regeneración y mantenimiento de la homeostasis vascular actuando sobre EPC(Luna et al. 2015).

### *3. Reparación endotelial y células progenitoras endoteliales*

#### 3.1 Definición de las células progenitoras endoteliales (EPC)

Las EPC son un subtipo de células endoteliales circulantes (CEC) que fueron descritas por primera vez en 1977 por Asahara T y colaboradores(Asahara et al. 1997). Constituyen, un marcador de daño endotelial y riesgo cardiovascular. Están disminuidas en sujetos con hipercolesterolemia, hipertensión, diabetes mellitus y fumadores. Aparecen en sangre periférica como respuesta a un trauma vascular o isquemia tisular, promovidas por el efecto de citoquinas y factores de crecimiento. Las EPC desempeñan funciones de reparación endotelial y neovascularización, de tal forma que podrían llegar a ser utilizadas como una potencial vía terapéutica de reparación del endotelio(Kawamoto et al. 2001).

Clásicamente, se ha propuesto que la reparación de las zonas de daño endotelial dependen la proliferación de las células endoteliales adultas adyacentes al daño(Shi et al. 1990). Sin embargo, durante los últimos años se ha demostrado que células derivadas de la médula ósea podían incorporarse al endotelio dañado y diferenciarse hacia CE(Asahara et al. 1997). En los últimos años las EPC circulantes procedentes de la médula ósea han adquirido una gran relevancia debido al papel que podrían desempeñar en el mantenimiento de la homeostasis del endotelio. Constituyen sólo del 1 al 5% del total de la población celular de la médula ósea y menos del 0,0001-0,01% de las células mononucleares periféricas circulantes (Khan, Solomon, and McCoy 2005).

Las EPC tienen un papel clave en el mantenimiento de la integridad vascular y actúan como células reparadoras en respuesta a un daño en el endotelio(Schmid and Varner 2009) por esto se pueden considerar como marcadores del daño endotelial(Wu, Chen, and Hu 2007).

Posteriormente fueron identificadas en sangre de cordón umbilical, médula ósea e hígado fetal(Murohara et al. 2000, Reyes et al. 2002, Schwartz et al. 2002).

### 3.2 Fenotipo y características de las células progenitoras endoteliales

Las EPC comparten un antecesor común con las células madre hematopoyéticas (Murasawa 2004), y podrían enmarcarse dentro del grupo de células pluripotenciales adultas. Se caracterizan por expresar de una forma simultánea marcadores de linaje endotelial y marcadores característicos de células progenitoras.

Inicialmente las EPC fueron caracterizadas por la expresión de CD34 y del receptor tipo 2 del factor de crecimiento endotelial (VEGFR-2) (Asahara et al. 1997, Khakoo and Finkel 2005) dos antígenos presentes en las células madre hematopoyéticas, en las células progenitoras endoteliales embrionarias y en células endoteliales maduras.

La expresión del antígeno CD34 define el estado específico en el que se encuentra la célula progenitora, disminuyendo la intensidad de su expresión cuando comienza su diferenciación (Civin et al. 1987, Delia et al. 1993). El CD34 participa en la adhesión *cell-to-cell* como ligando de la E-selectina con la capacidad de regular la tensión entre las CE contiguas (Puri et al. 1995). Es bien conocido, que el antígeno de superficie CD34 además de expresarse en CE también puede presentarse en la membrana de células mesenquimales, epiteliales o células cancerígenas, por lo que su uso como único marcador de reconocimiento de EPC sería inadecuado (Hirschi, Ingram, and Yoder 2008). Es necesario encontrar un marcador adicional que sea capaz de discriminar los diferentes linajes celulares de EPC. El VEGFR-2 es un receptor tirosina quinasa que es crítico para las funciones de la CE, como la maduración y la migración (Karkkainen and Petrova 2000). Se identificó inicialmente en las células implicadas en vasculogénesis estando presente en aquellas con potencial para diferenciarse a células endoteliales maduras (Nowak et al. 2004).

Estudios posteriores demostraron que las EPC también expresan en su membrana la glicoproteína 5-dominios transmembrana CD133, un marcador pluripotente de células inmaduras. Se encuentra en el 20-60% de células de la médula ósea y la sangre que expresan CD34+, pero no en las CE maduras (Yin et al. 1997). Su función principal es la organización topológica de la membrana mediante la regulación de la composición lipídica (Wuchter et al. 2001), aunque es posible que tenga otra serie de funciones que todavía no han sido determinadas. Diferentes trabajos permitieron confirmar que la expresión de CD133 identificaba la subpoblación que era capaz de diferenciarse hacia un fenotipo endotelial adulto in

vitro(Gehling et al. 2000, Peichev et al. 2000, Salven et al. 2003), así como que la población celular que expresaba este marcador se perdía durante la diferenciación celular. La pérdida de expresión de CD133 parece coincidir con la ganancia de marcadores característicos de CE maduras (CD146, Cd105, CD106, TF)(Khakoo and Finkel 2005, Hristov, Erl, and Weber 2003).

Además de los antígenos comentados anteriormente, las EPC pueden expresar otros marcadores de CE , que también son utilizados para identificarlas, como son: el vWF(Bloom, Giddings, and Wilks 1973) que es una glicoproteína que se encuentra en plasma y está presente en megacariocitos, plaquetas, matriz subendotelial y en CE (Ruggeri 2007), CD31 (Stockinger et al. 1990) o CD144 (Sen et al. 2011).

Aunque hay cierta discrepancia, se acepta que existen dos poblaciones de EPC circulantes: precoces (CD34+, CD133+, VEGFR-2+), que contribuyen a la vasculogénesis sintetizando gran cantidad de citoquinas como VEGF, células estromales (SDF-1), MCP-1 o CD40L (CD40 ligando); y tardías (CD34+, CD144+), cuya contribución se debe a su gran capacidad de proliferación(Schatteman 2004, Krenning, van Luyn, and Harmsen 2009, Mukai et al. 2008).

### 3.3 Funciones de las células progenitoras endoteliales

La principal función fisiológica que se le atribuye a las EPC es que son capaces de llevar a cabo el proceso de neovascularización tras su proliferación y migración desde la médula ósea hacia el tejido diana donde se diferencian a células endoteliales maduras(Asahara et al. 1997, Schaper and Scholz 2003, Khakoo and Finkel 2005). Además pueden ejercer una función paracrina simultánea promoviendo la angiogénesis (Li and Asahara 2008).

Se acepta que las EPC tienen un papel central en el mantenimiento de la homeostasis vascular mediante mecanismos de reparación endotelial. Existen numerosos estudios que apoyan esta función. Se ha visto en modelos animales(Shi et al. 1998) o en pacientes(Peichev et al. 2000), donde las EPC migran y colonizan implantes aórticos. Asimismo, en modelos animales con isquemia, la vasculogénesis promovida por administración local o sistémica de EPC media la recuperación de dichos tejidos(Kamihata et al. 2002).

En adultos sanos, el porcentaje de EPC oscila entre 0.01-0.1%. Ello nos hace ver que la población de EPC es minoritaria, existiendo un mayor porcentaje en



médula ósea. El proceso de movilización que se lleva a cabo desde la médula ósea hacia tejidos periféricos es complejo y están involucrados diferentes mediadores tales como citoquinas (SDF-1, IL-8), factores de crecimiento (VEGF), moléculas que facilitan la migración (NO, eritropoyetina) moléculas de adhesión, etc. El primer paso para su movilización parece ser la activación de la metaloproteasa de matriz MMP-9, como se ha concluido en algunos estudios *in vitro* y en modelos animales (Everaert et al. 2010, Heissig et al. 2002, Bergers et al. 2000, Huang et al. 2009).

Numerosos estudios han demostrado que el VEGF es el principal mediador implicado en la movilización e incorporación de las EPC a las áreas donde existe un daño endotelial (Khakoo and Finkel 2005, Iwaguro et al. 2002)

Las EPC segregan E-selectina, P-selectina y  $\beta$ -integrinas (Chavakis et al. 2005), moléculas que resultan fundamentales en la adhesión a células endoteliales maduras activadas, y responsables del alojamiento de las EPC a los sitios donde se precise neovascularización. El incremento en el reclutamiento de las EPC a los sitios de daño vascular, acelera la reendotelización y disminuye la formación de neointima "in vivo". Una vez finalizado el estímulo, las EPC circulantes excedentes, son realojadas en la médula ósea, por un fenómeno conocido como "homing" (Du et al. 2012).

### 3.4 Movilización de células progenitoras endoteliales

Las EPC residen en el interior de la médula ósea y se movilizan al exterior ante una señal de hipoxia o daño endotelial tras la producción de factores activadores tales como VEGF (Asahara et al. 1999), eritropoyetina (Heeschen et al. 2003) o el factor inducible de hipoxia-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), SDF-1 (Stellos and Gawaz 2007, Stellos et al. 2008), factor estimulante de colonias de granulocitos (Honold et al. 2006), etc. Estos factores de activación de EPC median la movilización, proliferación y migración de EPC mediante la activación de la vía Akt/PKB (Shiojima and Walsh 2006). Además, los estrógenos movilizan EPC a través de una acción directa sobre los receptores alfa y beta de estrógenos a través de MMP-9 y un mecanismo mediado por la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). El papel de los estrógenos en la movilización de EPC ayuda a explicar las tasas más bajas de eventos CV en las mujeres pre-menopáusicas en comparación con los hombres (Strehlow et al. 2003). Por el contrario, varios estudios han demostrado que el envejecimiento tiene un

impacto negativo en la movilización de EPC en diferentes etapas(Scheubel et al. 2003, Heiss et al. 2005).

Una vez movilizadas, las EPC deben dirigirse a las zonas de daño e inducir reendotelización, neovascularización y diferenciarse (Heissig et al. 2002). Para su incorporación a estas áreas se requiere el contacto directo célula a célula mediante la expresión de moléculas de adhesión como por ejemplo, P-selectina, ICAM-1, PECAM-1 e integrinas con el fin de facilitar su unión al endotelio vascular ya existente (Heissig et al. 2002). Una vez capturadas y firmemente adheridas en el lugar del vaso donde se ha producido el daño, las EPC son capaces de secretar factores angiogénicos que facilitarán la migración de las células endoteliales.

### 3.5 Células progenitoras endoteliales y enfermedad cardiovascular

Además del papel que desempeñan en el mecanismo de reparación endotelial, ya sea incorporándose directamente a las zonas desnudas del endotelio, o bien reemplazando a CE dañadas, el estudio de las EPC también tiene su relevancia en el campo de la enfermedad y el riesgo cardiovascular.

Vasa y cols., encontraron una asociación entre EPC y riesgo cardiovascular ya que observaron una correlación negativa entre el número de factores de riesgo cardiovascular y el número de EPC circulantes(Vasa et al. 2001). Años después Hill y colaboradores establecieron un protocolo de cultivo que permite la observación del número de colonias de EPC *in vitro*, siendo el número de colonias de EPC un posible marcador indirecto de la funcionalidad de las EPC. De hecho, el número de colonias de EPC parece ser mejor predictor de la función endotelial que los factores clásicos(Hill et al. 2003). En resumen, con respecto a los estímulos fisiopatológicos, se ha demostrado que el número de EPC está inversamente relacionado con el número de factores de riesgo cardiovascular(Hill et al. 2003, Kovacic and Boehm 2009).

Numerosos estudios han proporcionado conclusiones similares en diferentes grupos de población, relacionados con factores de riesgo cardiovascular. Chen JZ y cols(Chen et al. 2004) observaron que, en pacientes con hipercolesterolemia, el número de EPC en sangre periférica disminuye, y se asocia con una migración defectuosa. Tepper OM(Tepper et al. 2002), observaron lo mismo pero en pacientes con diabetes mellitus. Resultados similares fueron obtenidos por Hoetzer GL y cols(Hoetzer, MacEneaney, et al. 2007) en adultos de edad media. Por el contrario, en

sujetos que desarrollan ejercicio físico se ha observado un incremento de la frecuencia y funcionalidad de las EPC(Hoetzer, Van Guilders, et al. 2007).

Además, en diferentes estudios longitudinales con pacientes que presentan enfermedad coronaria(George et al. 2004) o ictus(Ghani et al. 2005) se ha observado una reducción de EPC circulantes. Otros autores han demostrado una disminución del número de EPC circulantes y una funcionalidad anormal sobre el proceso de reparación de éstas en las células endoteliales maduras, contribuyendo a una elasticidad arterial reducida que es característica del envejecimiento vascular en sujetos sanos(Tso et al. 2006).

En modelos animales, se ha demostrado que la administración de terapias celulares con EPC a nivel local inhibe la formación de la placa aterosclerótica, por lo que se sugiere que éstas podrían estar implicadas directamente en la patogénesis de la aterosclerosis y la ECV(Ma et al. 2009).

En resumen, con todos estos antecedentes, parece lógico pensar que las EPC podrían ser un buen marcador de función endotelial y de riesgo cardiovascular. De este modo, los factores de riesgo cardiovascular podrían desencadenar una movilización insuficiente, migración defectuosa y un agotamiento del reservorio medular o una apoptosis de EPC circulantes. Sin embargo, los mecanismos que actúan no están del todo clarificados. Pero en general, cuanto mayor sea el número de EPC, mejor será la salud de la vasculatura.

### 3.6 Células progenitoras endoteliales e inflamación

Como ya se ha comentado, la inflamación está implicada en el inicio, progresión y complicación de las enfermedades cardiovasculares inflamatorias. Existen estudios *in vitro* y clínicos que demuestran que el proceso inflamatorio influye en el número de EPC y su capacidad funcional(Grisar et al. 2005, George et al. 2004) (Verma, Szmitko, and Yeh 2004).

Las EPC constituyen un importante sistema endógeno que mantiene la integridad endotelial y homeostasis vascular, por lo tanto, el aumento de EPC por las terapias anti-inflamatorias podría tener un beneficio potencial para los individuos con enfermedad cardiovascular inflamatoria. Una mejor comprensión del papel de la inflamación en la regulación de la movilización y función del EPC proporcionaría información adicional sobre la patogénesis de las ECV y sus complicaciones.







# HIPÓTESIS

---







## *Hipótesis*

---

Los pacientes con insuficiencia renal crónica (ERC) tienen mayor frecuencia de enfermedad cardiovascular (ECV) que la población general porque mantienen un estado inflamatorio crónico. Uno de los factores asociados con este estado inflamatorio es el incremento en sangre periférica de monocitos CD14+CD16++ que tienen características de células senescentes e inflamatorias participando in situ de los mecanismos lesivos que desencadenan procesos como la calcificación vascular (CV). Otro mecanismo para generar daño vascular, puede ser la producción de elementos de señalización y transporte de moléculas implicadas en estos procesos. Entre estos elementos están las microvesículas (MV). Las microvesículas endoteliales (MVE) expresan y vehiculan proteínas celulares, actuando como agentes reguladores en la interacción entre diferentes células del sistema cardiovascular. En consecuencia, es lógico pensar que diferentes situaciones lesivas para las células vasculares, y de forma particular para las células endoteliales como primera línea celular del sistema vascular, van a condicionar la presencia de con diferente expresión y contenido. Por tanto, caracterizar las MVE generadas en diferentes situaciones de daño endotelial nos permitirá su mejor utilización como indicadores del daño endotelial; y en consecuencia, como elementos de ayuda al diagnóstico en la ECV. Además, la caracterización de estas MVE nos ayudará a profundizar en el conocimiento de los mecanismos que regulan el daño vascular y la interacción entre los diferentes tipos celulares que participan en el sistema cardiovascular.

Además de los mecanismos anteriores, en los pacientes con ERC puede ocurrir por diferentes factores una alteración en los procesos de reparación del endotelio, bien por una disminución en el número de células reparadoras del endotelio (EPC), o por una disfunción de estas células que pueden haber perdido su capacidad reparadora.





# OBJETIVOS

---









## Objetivos

---

Las microvesículas endoteliales (MVE) se han convertido recientemente en un punto de interés en la investigación debido a su importancia en la regulación de la respuesta inmune, contribución al inicio y progresión de diversas patologías como las enfermedades cardiovasculares, enfermedad renal crónica (ERC) entre otras, así como su potencial terapéutico puesto que pueden transportar eficientemente su contenido interior.

Por tanto, el objetivo principal de la tesis ha sido caracterizar el papel de MVE producidas en respuesta a diferentes agentes lesivos para el endotelio vascular relacionados con la enfermedad renal crónica, determinando la funcionalidad de las mismas en la regulación del balance daño/reparación endotelial.

Objetivos específicos:

1.- Analizar la posible participación de las MVE y de las células progenitoras endoteliales (EPC) en la generación de CV en pacientes con ERC.

*Artículo: "Endothelial damage and vascular calcification in patients with chronic kidney diseases".*

2.- Examinar MVE, subpoblaciones de monocitos y angiopoyetinas para identificar marcadores pronósticos en pacientes con hemodiálisis con o sin diabetes mellitus (DM). Evaluar la capacidad pronóstica de las MVE sobre la mortalidad en estos pacientes.

*Artículo: "Markers of endothelial damage in patients with chronic kidney disease on hemodialysis".*

3.- Utilizando un modelo *in vitro*, valorar el efecto funcional de las MVE inducida por toxinas urémicas sobre la función regeneradora del endotelio desarrollado por EPC.

*Artículo: "Microvesicles Derived from Indoxyl Sulfate Treated Endothelial Cells Induce Endothelial Progenitor Cells Dysfunction".*







# CAPÍTULO I

---









# **I. Endothelial damage and vascular calcification in patients with chronic kidney disease.**





TRANSLATIONAL PHYSIOLOGY |

Endothelial damage and vascular calcification in patients with chronic kidney disease

Sagrario Soriano,<sup>1,2,4\*</sup> Andrés Carmona,<sup>1,2,4\*</sup> Francisco Triviño,<sup>3</sup> Mariano Rodríguez,<sup>1,2,4</sup> Marina Alvarez-Benito,<sup>3</sup> Alejandro Martín-Malo,<sup>1,2,4</sup> María-Antonia Alvarez-Lara,<sup>1,2,4</sup> Rafael Ramírez,<sup>1,4,5</sup> Pedro Aljama,<sup>1,2,4</sup> and Julia Carracedo<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba, Reina Sofía University Hospital, University of Córdoba, Córdoba, Spain; <sup>2</sup>Nephrology Unit, Reina Sofía University Hospital, Córdoba, Spain; <sup>3</sup>Radiology Unit, Reina Sofía University Hospital, Córdoba, Spain; <sup>4</sup>RETICs Red Renal (Instituto de Salud Carlos III), Madrid, Spain; and <sup>5</sup>Biología de Sistemas Department Módulo II-Planta B, Alcalá de Henares University, Madrid, Spain

Submitted 25 February 2014; accepted in final form 17 October 2014

**Soriano S, Carmona A, Triviño F, Rodríguez M, Alvarez-Benito M, Martín-Malo A, Alvarez-Lara M-A, Ramírez R, Aljama P, Carracedo J.** Endothelial damage and vascular calcification in patients with chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 307: F1302–F1311, 2014. First published October 22, 2014; doi:10.1152/ajprenal.00114.2014.—Vascular calcification (VC) is a frequent complication of chronic kidney disease (CKD) and is a predictor of cardiovascular morbidity and mortality. In the present study, we investigated the potential involvement of endothelial microparticles (MPs) and endothelial progenitor cells (EPCs) in the generation of VC in CKD patients. The number of circulating EMPs is greater in patients with VC than without VC ( $307 \pm 167$  vs.  $99 \pm 75$  EMPs/ $\mu$ l,  $P < 0.001$ ). The percentage of EPCs is significantly lower in patient with VC than in patients without VC ( $0.14 \pm 0.11\%$  vs.  $0.25 \pm 0.18\%$ ,  $P = 0.002$ ). The number of EPCs expressing osteocalcin (OCN) was higher in VC patients ( $349 \pm 63$  cells/100,000) than in non-VC patients ( $139 \pm 75$  cells/100,000,  $P < 0.01$ ). In vitro, MPs obtained from CKD patients were able to induce OCN expression in EPCs from healthy donors; the increase in OCN expression was more accentuated if MPs were obtained from CKD patients with VC. MPs from CKD patients also induced OCN expression in vascular smooth muscle cells and fibroblasts. In CKD patients, the rise in endothelial MPs associated with a decrease in the number of EPCs, suggesting an imbalance in the processes of endothelial damage and repair in CKD patients, mainly those with VC. Our results suggest that EPCs, through OCN expression, may directly participate in the process of VC.

chronic kidney disease; endothelial damage; endothelial microparticles; endothelial progenitors cells; vascular calcification

VASCULAR CALCIFICATION (VC) is a frequent problem among patients with chronic kidney disease (CKD) (27). Its prevalence increases as renal function progressively deteriorates. VC is an independent and strong predictor of cardiovascular risk (15), and its clinical diagnosis is exclusively radiological since there is no sufficiently sensitive and specific biomarker of VC (1, 6, 15, 27, 29, 32). Several radiological methods, such as

electron beam computed tomography, multislice spiral computed tomography, and plain radiographs, have been used to investigate aortic calcification. Such methods are expensive, and none of them have been accepted as the gold standard in cardiovascular risk assessment.

The integrity of the endothelium plays a key role in the pathogenic of vascular disease, including the development of VC (6, 29). Recent evidence has demonstrated that soluble factors secreted by endothelial cells regulate procalcific activity in vascular smooth muscle cells (VSMCs) (19, 35, 42). It has recently been shown that mature endothelial cells are capable of producing microparticles (MPs) in response to cellular activation or apoptosis (3, 4, 7, 25), a situation that has also been observed in uremia (12, 33).

To maintain vascular integrity, damaged endothelial cells are replaced by endothelial progenitor cells (EPCs). A function that has been ascribed to endothelial MPs (EMPs) is the ability to recruit and differentiate EPCs (5). In the clinical setting, changes in both the number and functions of EPCs have been positively related to an improved capacity for endothelial regeneration, which is inversely associated with cardiovascular risk (20, 34, 37, 38, 39, 43). EPCs can be identified not only through their angiogenic capacity but also by their expression of cell surface markers (14, 21, 30), and it has recently been reported that in patients with coronary atherosclerosis, a high proportion of EPCs may present an osteoblast-like phenotype (8, 9, 10, 28).

Our hypothesis was that in CKD patients, the cardiovascular disease includes damage of the endothelium, causing an increase in circulating EMPs and abnormalities of EPCs. Both processes may favor the development of VC in CKD. The aim of the present study was to 1) evaluate the potential association of VC in CKD with the number of MPs and with the number and function of EPCs and 2) investigate in vitro whether MPs and EPCs from CKD patients may be directly involved in the genesis of VC.

In the present study, EMPs and subpopulations of EPCs, including those with osteoblastic characteristics, were obtained from CKD patients with and without VC. Subsequently, the in vitro effect of MPs on the expression of osteogenic protein in endothelial cells, VSMCs, monocytes, and fibroblasts was investigated. EPC function was also evaluated.

\* S. Soriano and A. Carmona contributed equally to this work.

Address for reprint requests and other correspondence: J. Carracedo, Nefrología, Daño Celular en Inflamación Crónica, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba, Hospital Universitario Reina Sofía/Universidad de Córdoba, Córdoba 14004, Spain (e-mail: julia.carracedo.exts@juntadeandalucia.es).

MATERIALS AND METHODS

**Patients.** Fifty-seven patients with CKD at stages 3–5 were selected from the Reina Sofia University Hospital (Cordoba, Spain). Patients with severe cardiovascular disease, active infections, or severe secondary hyperparathyroidism [parathyroid hormone (PTH) > 500 pg/ml] were excluded. The assessment of VC was performed by an original method similar to the Kauppila index (26, 41); in our patients, the presence of calcium deposits was assessed by abdominal computed tomographic angiography (CTA) of the aortal-abdominal region, and this technique is routinely performed as part of the evaluation for renal transplantation. We wanted to prove our own method and therefore measured abdominal aortic calcification by lateral lumbar X-ray (Kauppila index) in 26 of our patients that also had CTA. The Kauppila index was obtained by two highly experienced independent examiners. A radiologist with experience in the CTA technique developed a severity scoring system. Lateral lumbar spine radiographs were acquired, and a deposit index was developed to grade the severity of calcification in the aorta at the level of the first through fourth lumbar vertebrae. A separate score was determined for the anterior and posterior aorta, and the values were added across the four vertebrae, resulting in a calcification index that ranged from 0 to 24 points. We observed that the Kauppila index correlated highly with calcification scores from CTA ( $r = 0.7$ ,  $P < 0.001$ ). We consider that the method used in our study is as accurate as the Kauppila index.

Patients were divided into two groups on the basis of their median score from the first to the third lumbar vertebra. *Group 1* (without VC) included 29 patients with scores below 8.5, whereas 28 patients were assigned to *group 2* (score > 8.5, with VC). We recorded all clinical data could be related to VC: age, sex, body mass index, previous cardiovascular disease/events, arterial hypertension, diabetes mellitus, smoking habits, and treatment with statins, recombinant human erythropoietin, paricalcitol, and calcium- or noncalcium-containing phosphate binders. Arterial hypertension was defined as blood pressure above 140/90 mmHg or requiring antihypertensive treatment. All routine laboratory measurements, including high-sensitivity CRP, were made using certified assay methods in the clinical laboratory of Reina Sofia Hospital. Intact PTH levels were measured using an immunoradiometric assay (Quest Diagnostics Nichols Institute, San Juan Capistrano, CA). Triglycerides, total cholesterol in plasma, and lipoprotein fractions were assayed by enzymatic procedures. Smoking habits were assessed according to the current smoking status. Ten healthy subjects, matched for age and sex, served as controls. The Hospital Ethics Committee approved the study, and all subjects provided written informed consent.

**Determination of CD31<sup>+</sup>/annexin V<sup>+</sup> EMPs in plasma.** Platelet-free plasma was obtained by centrifugation at 1,500 g for 10 min at room temperature followed by an additional centrifugation at 13,000 g for 20 min to separate EMPs, which were stored at -20°C until use. EMPs were then resuspended and incubated with monoclonal antibody against phycoerythrin (PE)-labeled anti-CD31 (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) followed by an incubation with FITC-annexin V kits according to the manufacturer's instructions (Bender MedSystems). The negative control was obtained using anti-isotype antibodies. An equal volume of Flow Count Calibrator beads (Beckman Coulter, Marseilles, France) was added. Fluorescence-activated cell sorter analysis was performed in a Coulter Cytomic FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, CA) using CXP software (Beckman Coulter). Each result (single value) was the average of three independent determinations of the same sample.

**Determination of EPCs in peripheral blood.** A sample of 10 ml of peripheral venous blood was drawn from patients and healthy subjects into tubes containing lithium heparin. To identify EPCs, sample blood was incubated against PE-labeled anti-CD133 antibody (AC133 PE, MACS Miltenyc Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), PE-cyanin 7-labeled anti-CD34 (no. 25-0349-42, eBioscience, San Diego, CA), and FITC-labeled anti-VEGF receptor 2 (VEGFR2; FAB357F, R&D

Systems Europe, Abingdon, UK). Immediately after blood extraction, whole blood was incubated for 30 min in the dark at 4°C with monoclonal antibodies or the corresponding isotype controls. Erythrocytes were subsequently lysed with 450 µl FACS Lysing solution (BD Biosciences) for 10 min at room temperature in darkness. Cells were then washed in PBS with 2% human serum albumin before flow cytometry analysis (Beckman Coulter). The number of EPCs was defined as events that were triple positive for CD133, CD34, and VEGFR2. Cells expressing these three molecules are the most commonly reported as "classical" EPCs (14, 43), but the differential expression of these molecules has been linked to different states of cellular differentiation as well as to the intensity of their repair capacity (14). We then evaluated three differentiation stages in EPCs in relation to the expression or absence of the molecules marked. The negative control (0 value) was the value obtained using isotype antibodies. Each result (one single value) was the average of three independent determinations of each sample.

**Determination of osteogenic-related molecules in EPCs.** At the same time as the triple labeling procedure described above, a primary antibody consisting of a mouse anti-human osteocalcin (OCN) monoclonal antibody or the corresponding control isotype was used at the manufacturer's recommended dosage. After a wash of the primary antibodies, cells were incubated with anti-isotype peridinin chlorophyll protein complex-conjugated secondary antibodies at 4°C for 60 min. All antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

**Purification and cultures of healthy EPC donors.** Peripheral blood mononuclear cells of healthy donors were isolated by density gradient centrifugation (Lymphoprep, Axis-Shield PoC, Oslo, Norway), washed with PBS (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA) + 20% FBS, and resuspended in endothelial cell basal medium (EBM)-2 (Lonza, Allendale, NJ) supplemented with Single Quots endothelial cell growth medium (EGM)-2 (VEGF, human EGF-B, recombinant IGF-1, human EGF, heparin, ascorbic acid, and GA-100, Lonza) and 15% autologous plasma. Mononuclear cells were plated on fibronectin (Biocoat, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) in coated six-well plates at a density of  $5 \times 10^6$  cells/well. We then incubated the fibronectin plates at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>; 4 days later, we removed the cells in suspension, and the fraction of cells attached was cultivated with EBM-2 complemented by 20% PBS and 15% autologous plasma. This medium recharging process was repeated every 2 days for 3–4 wk. After about 3 wk of culture, EPCs could be visualized in an optical microscope (Motic AE30, Fujian, China) in the form of colonies (colony-forming units). The EPC phenotype (CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup>) was verified, with a cellular purification of >90%.

**Cultures of EPCs from healthy donors with EMPs.** During the second week of EPC cultures, EMPs obtained from patients with or without VC were added. The concentration of EMPs had been

Table 1. Clinical data and pharmacological treatment

	VC Group	Non-VC Group	P Value
Number of patients/group	28	29	
Age, yr	67.4 ± 5.3	62.3 ± 8.7	0.06
Men/women, %	69.7/30.3	81/19	0.43
Body mass index	29.6 ± 4.9	30.2 ± 9.4	0.7
Cardiovascular history, %	42	21.6	0.04
Hypertension, %	84	75	0.07
Diabetes mellitus, %	30	21.6	0.08
Smokers, %	46.4	37.9	0.24
Statins, %	63	48	0.43
Paricalcitol, %	39.4	5.4	0.001
Phosphate binders, %			
Calcium carbonate	36.3	32.4	0.4
Lanthanum	21.2	46	0.02

VC, vascular calcification.

Translational Physiology

F1304

CALCIFICATION IN CHRONIC KIDNEY DISEASE

Table 2. Laboratory characteristics

	VC Group	Non-VC Group	P Value
Number of patients/group	28	29	
Creatinine clearance (MDRD-7)	15.6 ± 4.2	14.4 ± 3.5	0.20
Calcium, mg/dl*	9.3 ± 0.5	9.2 ± 0.7	0.41
Phosphate, mg/dl	4.5 ± 0.6	4.7 ± 0.8	0.16
25-Hydroxyvitamin D, ng/ml	23 ± 10	20 ± 8.7	0.25
Total cholesterol, mg/dl	190 ± 42	178 ± 34	0.62
High-density lipoprotein-cholesterol, mg/dl	34 ± 17	39 ± 20	0.8
Low-density lipoprotein-cholesterol, mg/dl	71 ± 39	84 ± 42	0.45
Triglycerides, mg/dl	160 ± 56	178 ± 43	0.08
Hemoglobin, g/dl	11.9 ± 0.4	12 ± 0.3	0.06
Albumin, g/dl	3.8 ± 0.4	4 ± 0.9	0.24
Intact parathyroid hormone, pg/ml	231 ± 120	156 ± 79	0.003
CRP, log(mg/l)	0.73 ± 0.4	0.45 ± 0.37	0.005

\*Corrected serum calcium (in mg/dl): serum calcium (in mg/dl) + 0.8[4-serum albumin(in g/dl)].

previously calculated to be  $5 \times 10^5$  EMPs- $\mu\text{l}^{-1}$ ·well $^{-1}$ . One well that contain EMPs from healthy subjects was used as a control. After 3 wk, colony-forming units were quantified, and cells were harvested from cultures as described above. The EPC phenotype was assessed by flow cytometry.

**Capillary-like tube formation assay.** Ninety-six-well plates (Corning Costar, Cambridge, MA) were coated with 50  $\mu\text{l}$  Matrigel (BD Biosciences) and incubated at 37°C for 30 min. EPCs were trans-

planted to 96-well plates at a density of  $1 \times 10^5$  cells/well. EMPs from 500  $\mu\text{l}$  of plasma obtained from plasma patients with no VC and VC dissolved in low-serum medium (1% FBS) were added to each well. After 4 h of incubation, tube morphology was visualized in an optical microscope (Motic AE30). Each experiment was repeated in triplicate, and the tube length was assessed by ImageJ. The analysis consisted of a segmentation of the cell areas. The meshed area could be identified by looking for empty regions of the field delimited by tubules and cell clusters, and Nb segments are the elements delimited by two junctions.

**Cell line cultures with MPs.** Human umbilical vein endothelial cells were obtained from Cell Systems (Cell Systems/Clonetics, Solingen, Germany) and cultured with standard EBM (Cambrex Bio Science, Walkersville, MD), EGM supplements (Cambrex), and 10% FBS (GIBCO). Cells were detached using trypsin-EDTA (Lonza). Cells from a human monocytic leukemia cell line (THP-1 cells) were cultured in RPMI-1640 without L-glutamine (Lonza) supplemented with 0.1% nonessential amino acids, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, and 20% FBS. Human aortic smooth muscle cells (VSMCs) were obtained from Clonetics and were cultured in DMEM supplemented with FBS (20%), Na pyruvate (1 mM), glutamine (4.5 g/l), penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 mg/ml), and HEPES (20 mM) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Cells were used after the fifth passage. Normal human dermal fibroblasts, isolated from the dermis of juvenile foreskin or adult skin, were obtained commercially (PromoCell, Heidelberg, Germany) and cultured in a Fibroblast Growth Medium kit (PromoCell). Cells were incubated in DMEM (GIBCO) supplemented with 10% FBS at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Other reagents were purchased from Sigma-Aldrich.

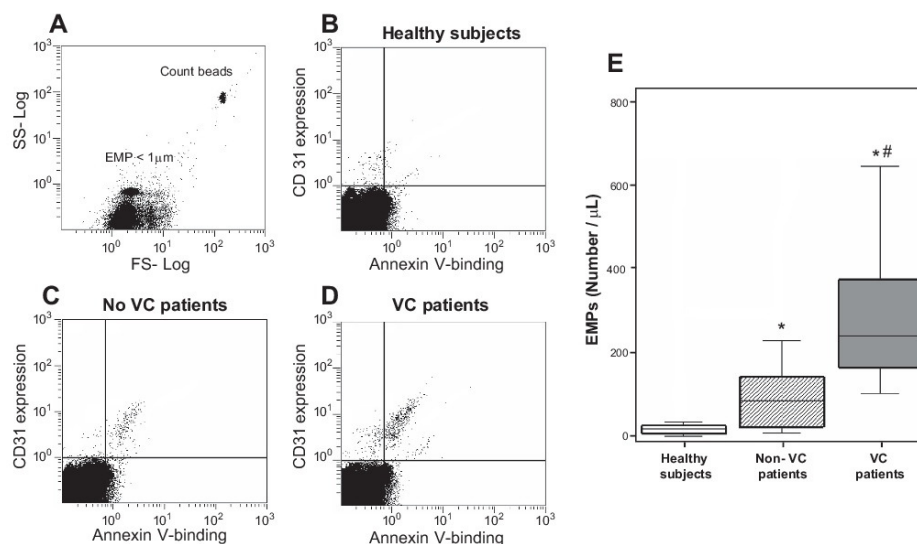


Fig. 1. Quantification of endothelial microparticles (EMPs). Representative graphs of flow cytometry analysis of EMPs in platelet-free plasma from healthy subjects, chronic kidney disease (CKD) patients without vascular calcification (non-VC), and CKD patients with vascular calcification (VC) are shown. A: EMPs were plotted using a forward scatter logarithmic (FS- log)/side scatter logarithmic (SS- log) dot-plot histogram. EMPs are defined as event numbers within a size of 0.1–1  $\mu\text{m}$  and are gated in a window. It was necessary to use bead counts (circled area) in each experiment to calculate the concentration of EMPs per unit volume of sample. B–D: size-selected events plotted as a function of their double fluorescence for specific annexin-phycoerythrin (PE) binding and CD31-FITC. E: the number of EMPs was quantified in each of the three groups (healthy subjects, non-VC patients, and VC patients) as shown in the box diagram. \* $P < 0.001$  vs. healthy subjects. # $P < 0.001$  vs. non-VC patients.

MPs obtained from patients or control subjects were added to the cell line cultures under the same conditions described above. The expression of OCN was quantified after 1 wk of culture.

**Statistical analysis.** Data normally distributed are presented as medians and interquartile ranges. Normally distributed data are shown as means  $\pm$  SD. The Wilcoxon rank-sum test was performed on continuous variables, and dichotomous variables were compared using Fisher's exact test. ANOVA was used to test differences of means among VC, non-VC, and healthy subjects. Skewed data were transformed using a log transformation. Spearman correlation coefficient was used to describe relationships between EMP and EPCs. *P* values of  $<0.05$  were considered statistically significant. The statistical package used was SPSS (version 17).

**RESULTS**

**Patient characteristics.** The relevant clinical information and patient's treatment are shown in Table 1. Patients with VC were not significantly older than non-VC patients, and there were more men in both groups. We did not observe a prevalence of any particular pathology with regard to the origin of CKD in VC subjects compared with non-VC subjects. More cardiovascular events were noted in patients with VC (42%) than in non-VC patients (22%, *P* = 0.04). Treatment with paricalcitol predominated in patients diagnosed with VC (39.3% in the VC group vs. 5.4% in the non-VC group, *P* = 0.001), and treatment with lanthanum carbonate predominated in the non-VC group (46% vs. 21% in the VC group, *P* = 0.02).

Biochemical data are shown in Table 2. There were no significant differences in any of the parameters evaluated.

Renal function (MDRD-7) and the degree of anemia were similar in both groups. Lipids and parameters of mineral metabolism were also similar in both groups except for PTH, which was higher in VC than non-VC patients. Interestingly, high-sensitivity CRP levels were higher in VC than non-VC subjects ( $0.73 \pm 0.4$  vs.  $0.45 \pm 0.37$  mg/l, *P* = 0.005).

**Evaluation of CD31<sup>+</sup>/annexin V<sup>+</sup> EMPs.** Representative graphs of flow cytometry analysis of EMPs and the number of EMPs (CD31<sup>+</sup>/annexin V<sup>+</sup>) in CKD patients are shown in Fig. 1, A–E. Samples from VC patients showed an increased number of EMPs compared with non-VC patients ( $307 \pm 167$  vs.  $99 \pm 75$  EMPs/ $\mu$ l, *P* < 0.001). In both groups of patients, the number of EMPs was greater than in healthy subjects ( $26.9 \pm 12.8$  EMPs/ $\mu$ l, *P* < 0.001).

**Quantification of EPCs.** The capacity to repair damaged endothelium is related with the amount of EPCs. The EPC phenotype was identified based on combined triple fluorescence for CD34, CD133, and VEGFR2 as analyzed by flow cytometry (Fig. 2). In VC patients, the percentage of EPCs was significantly lower than in non-VC patients ( $0.14 \pm 0.11\%$  vs.  $0.25 \pm 0.18\%$ , *P* = 0.002; Fig. 2C). It should be emphasized that both groups of CKD patients, with and without VC, had a lower proportion of EPCs than the control group ( $1.85 \pm 0.6$ , *P* < 0.001). Interestingly, in CKD patients, EMPs correlated negatively with EPCs (*r* =  $-0.37$ , *P* = 0.003).

We identified EPCs that were CD34<sup>+</sup> and CD133<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup>; these were defined as "early" and highly active EPCs. CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup> and CD34<sup>+</sup>CD133<sup>-</sup>VEGFR2<sup>+</sup> EPCs are more highly differentiated in terms of CD133 expression.

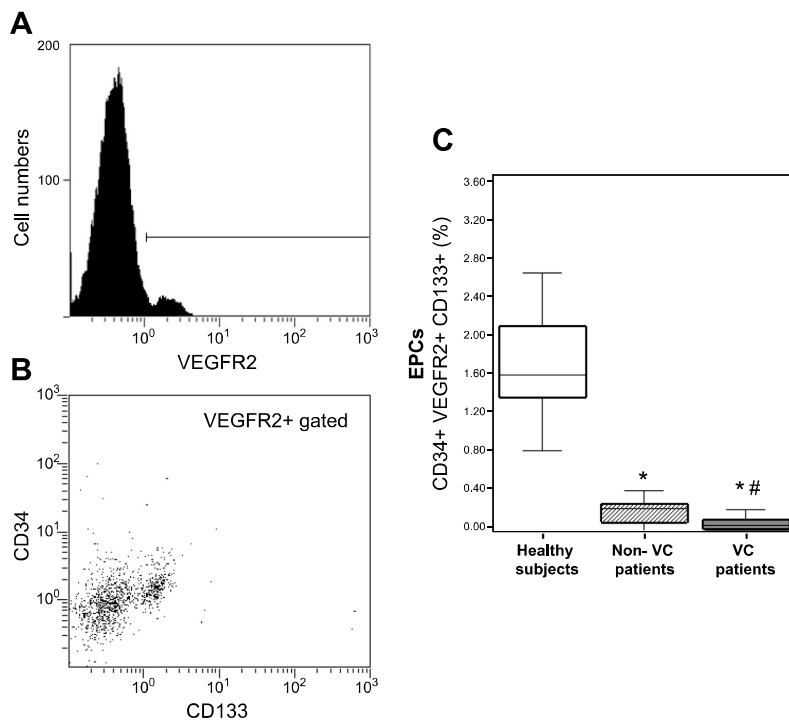


Fig. 2. Quantification of endothelial progenitor cells (EPCs). Representative graphs of cytofluorometric analyses of triple-positive EPCs [CD34<sup>+</sup>VEGF receptor 2 (VEGFR2)<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>] in the blood of healthy subjects are shown. A and B: VEGFR2<sup>+</sup> cells were selected (A) and CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup> double-positive cells were then quantified in VEGFR2<sup>+</sup> cell gate (B). quantification of EPCs in healthy subjects, non-VC patients, and VC patients. \**P* < 0.001 vs. healthy subjects; #*P* = 0.002 vs. non-VC patients.

Translational Physiology

F1306

CALCIFICATION IN CHRONIC KIDNEY DISEASE

Table 3. EPC quantification in peripheral blood from chronic kidney disease patients and OCN expression in EPC subpopulations

	CD34 <sup>-</sup> CD133 <sup>+</sup> VEGFR2 <sup>+</sup>		CD34 <sup>+</sup> CD133 <sup>+</sup> VEGFR2 <sup>+</sup>		CD34 <sup>+</sup> CD133 <sup>-</sup> VEGFR2 <sup>+</sup>	
	Total, %	OCN <sup>+</sup> cells/100,000	Total, %	OCN <sup>+</sup> cells/100,000	Total, %	OCN <sup>+</sup> cells/100,000
Healthy subjects	0.86 ± 0.2	7.9 ± 3.5	1.85 ± 0.6	15.1 ± 9.2	3.91 ± 1.7	34 ± 8.4
VC patients	0.05 ± 0.01*†	349.3 ± 63*†	0.14 ± 0.1*†	39 ± 9.3*	1.93 ± 1.2*	225.6 ± 87*
Non-VC patients	0.12 ± 0.09*	139.2 ± 75*	0.25 ± 0.18*	28 ± 12*	2.45 ± 1.1*	117 ± 44*

EPCs, endothelial progenitor cells; VEGFR2, VEGF receptor 2; OCN, osteocalcin. \**P* < 0.01 vs. controls; †*P* < 0.01 vs. non-VC patients.

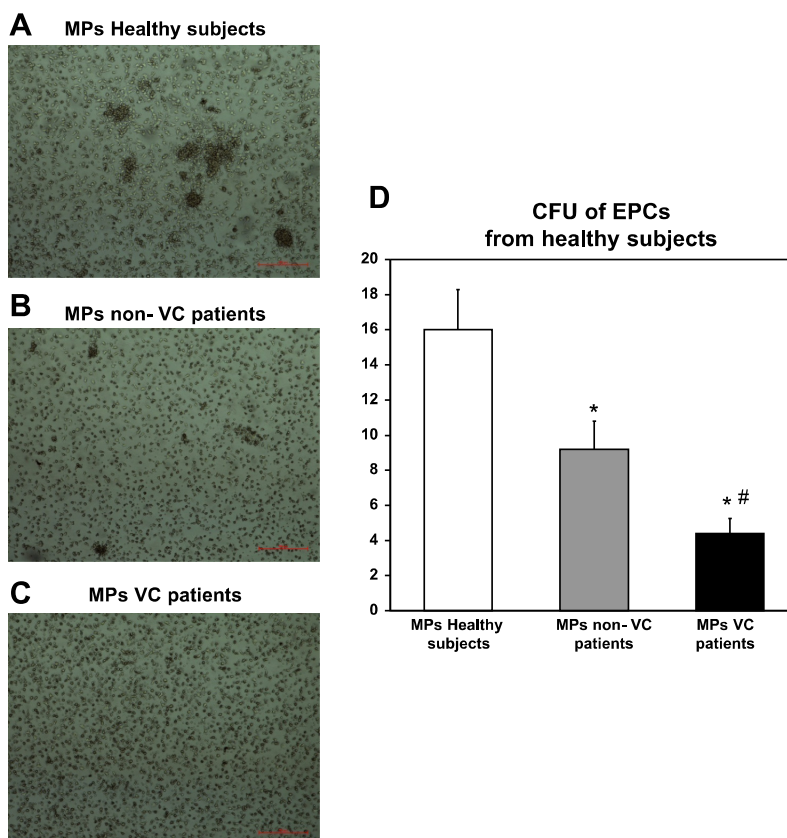
CKD patients with VC had a lower percentage of EPCs negative for CD34 than healthy subjects and non-VC patients (Table 3). We also noted a reduced number of CD34<sup>-</sup>EPCs in non-VC patients compared with healthy subjects. EPCs negative for CD133 were also quantified; the variation of these cells in CKD patients with and without VC and healthy subjects was similar to those observed in CD34<sup>-</sup>EPCs.

*Expression of OCN in circulating EPCs.* The expression of OCN in the subpopulations of EPCs was quantified. In healthy subjects, the number of EPCs that expressed OCN molecules was very low. The number of CD34<sup>-</sup>CD133<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup>EPCs that expressed OCN was higher in VC than non-VC patients, and both were significantly increased compared with

healthy subjects. Similarly, CKD patients displayed a significant increase in CD34<sup>+</sup>CD133<sup>+</sup>VEGFR2<sup>+</sup>EPCs that expressed OCN (*P* < 0.01 vs. healthy subjects), but the values for VC and non-VC patients were similar (Table 3). EPCs negative for CD133 and positive for OCN were elevated in CKD patients compared with healthy subjects.

*Effect of CKD-derived MPs on OCN expression by EPCs and angiogenesis induced by EPCs.* EPCs from healthy subjects were incubated for 1 wk with MPs from CKD patients with and without VC. MPs from VC and non-VC CKD patients inhibited the capacity of normal EPCs to form colonies (Fig. 3). Furthermore, MPs obtained from VC patients significantly reduced the number of colony-forming EPCs compared with those from non-VC patients (Fig. 3).

Fig. 3. Effect of microparticles (MPs) in EPC colony formation. EPCs obtained from healthy donors were cultured in a specific medium. A: representative images from the study of the capacity to form colonies when EPCs from healthy donors were cultivated with MPs from healthy subjects. B and C: EPCs from healthy donors were cultivated with MPs from non-VC patients (B) and from VC patients (C). D: quantification of colonies. \**P* < 0.01 vs. MPs from healthy subjects; #*P* < 0.01 vs. MPs from non-VC patients. Results represent means ± SD of six independent experiments.





The in vitro effect of MPs on angiogenesis was also analyzed. EMP-obtained EPCs from healthy subjects were cultured for 4 h with MPs from CKD patients or control subjects. MPs from healthy subjects did not interfere with the formation of the tubular structures (Fig. 4A). However, EPCs cultured with MPs from CKD patients with VC were unable to form microtubules (Fig. 4C). MPs from non-VC patients also reduced the ability of EPCs to form tubes, but the effect was not as marked as with MPs from VC patients (Fig. 4B). The numbers of meshed areas (Fig. 4D) and Nb segments (Fig. 4E) decreased with MPs from patients with VC in relation to patients without VC. These parameters decreased with MPs from patients without VC compared with healthy subjects.

Incubation with MPs from CKD patients increased the expression of OCN by EPCs from healthy donors (Fig. 5, A–C). MPs from CKD patients with VC produced a greater increase in OCN expression than MPs from CKD patients without VC ( $32 \pm 9\%$  in the VC group vs.  $16 \pm 7\%$  in the non-VC group,  $P < 0.01$ ; Fig. 5, B and C). This effect was observed in the three populations of EPCs evaluated:  $CD34^-CD133^+VEGFR2^+$ ,  $CD34^+CD133^+VEGFR2^+$ , and  $CD34^+CD133^-VEGFR2^+$  (Fig. 5, D–F). Using the same samples, the proportions of EPC subpopulations that expressed

OCN were calculated. MPs from VC patients produced an increase in the number of  $CD34^-CD133^+VEGFR2^+OCN^+$  and  $CD34^+CD133^+VEGFR2^+OCN^+$  EPCs compared with MPs of non-VC patients and healthy subjects (Fig. 5, D and E). The increase in OCN expression induced by MPs was particularly evident in  $CD34^+CD133^-VEGFR2^+$  EPCs (Fig. 5F).

It was important to evaluate whether MPs from CKD patients were capable of inducing an osteogenic phenotype in monocytes and cells integrating the vascular wall. Incubation with MPs from CKD patients did not have an effect on OCN expression by endothelial cells and monocytes. In contrast, MPs from CKD patients with VC induced a threefold increase of OCN expression in VSMCs and also increased by more than twofold OCN expression in fibroblasts (Fig. 6). MPs from CKD patients without VC were also able to induce OCN expression in VSMCs, although the effect was not as marked as that observed with MPs from CKD patients with VC.

DISCUSSION

Our study shows that VC in CKD patients may be related to an alteration in the equilibrium between damage and repair of the endothelium. We have shown that OCN, a molecule implicated in the process of osteogenesis, is expressed in EPCs

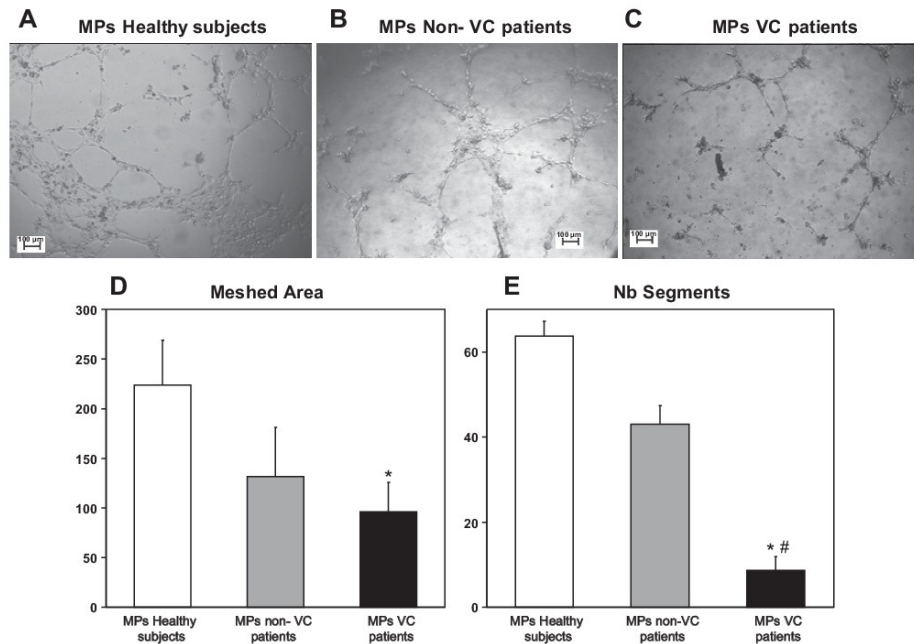


Fig. 4. Representative images of tube-like three-dimensional structures of EPCs in the presence of MPs. A: MPs from healthy subjects. B: MPs from non-VC patients. C: MPs from VC patients. In vitro angiogenesis was quantified by measuring the meshed area enclosed by segments or master segments (D) and the Nb segments or elements delimited by two junctions (E). Results represent means  $\pm$  SD of four independent experiments. \* $P < 0.01$  vs. MPs from healthy subjects; # $P < 0.01$  vs. MPs from non-VC patients.

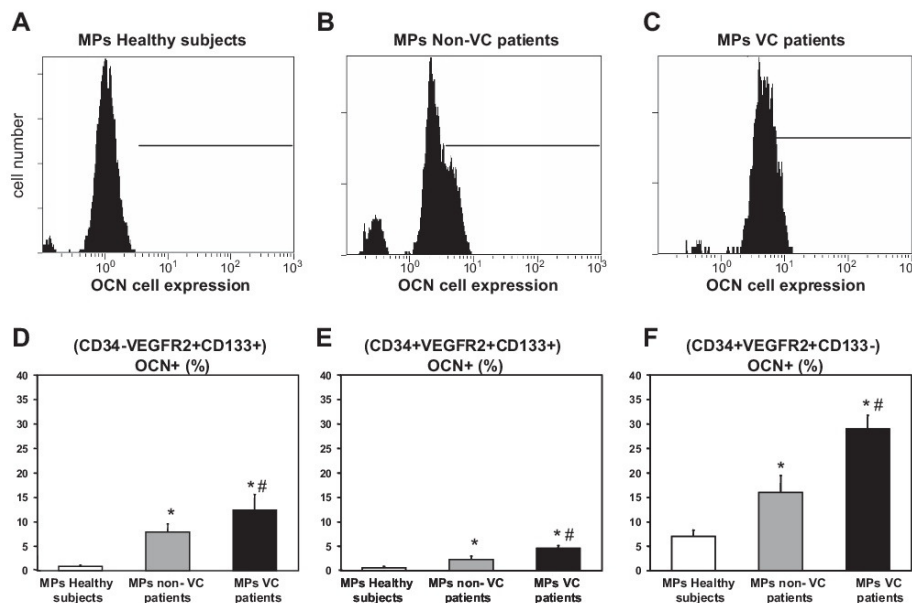


Fig. 5. Effects of MPs on osteocalcin (OCN) expression. EPCs obtained from healthy donors were cultured in a specific medium with MPs obtained from healthy subjects and VC and non-VC CKD patients. A–C: representative cytometric images of OCN expression. D and E: quantification of OCN expression in osteoblast EPCs. Results represent means  $\pm$  SD of six independent experiments. \* $P < 0.01$  vs. MPs from healthy subjects; # $P < 0.01$  vs. MPs from non-VC patients.

from CKD patients with VC. In these patients, the number of EMPs is increased, and, in vitro, MPs from CKD patients with VC are capable to induce OCN expression in EPCs from healthy donors and in other cell lines (VSMCs and fibroblasts).

Although the therapeutic strategies available are relatively few and not very effective, we do not believe that VC is inevitable. VC was previously believed to be a passive degenerative process; presently, we know that the generation of VC is active and regulated, with a number of factors implicated (39). The identification of markers that will enable us to make a diagnosis and to assess the progression of VC would be a first step in the development of preventive and therapeutic tools to deal with the problem of VC in CKD patients.

In response to a stimulus or an injury, mature endothelial cells produce EMPs, which exhibit certain characteristics, such as the expression of molecules of endothelial origin like CD31 and phosphatidylserine, which bind to annexin V. We focused our attention on MPs of endothelial origin, assuming that the vascular damage associated to calcification had a pronounced effect on the endothelium; this does not mean that other cells involved in inflammation and/or tissue reparation may participate in the genesis of VC through the production of MPs. EMPs are very heterogeneous; the phenotype and functional properties vary according to factors involved in their release (22, 25). Moreover, an elevated number of EMPs reflects cellular injury as a surrogate marker of vascular dysfunction in

cardiovascular disease (40). In our study, CKD patients with VC had a greater number of EMPs than patients without VC.

Compared with healthy subjects, CKD patients either predialysis or on regular dialysis show an increase in EMPs. The number of EMPs in CKD patients may be modulated by treatment of the renal insufficiency (2, 31, 33). However, to the best of our knowledge, the present study shows, for the first time, an association between the increase of EMPs and the presence of VC in CKD patients.

The high prevalence of vascular damage in patients with CKD may also be associated with inadequate repair of the endothelium. Our findings are in agreement with previous studies (20, 34) showing that patients with CKD had a low number of EPCs and a reduced capacity to repair the endothelium. Moreover, the capacity to repair the endothelium was less in patients with VC than non-VC.

Several authors (19, 20) have found a relationship between the number of EPCs and cardiovascular morbidity/mortality. In fact, factors that are closely related to cardiovascular disease, such as arterial hypertension and high serum cholesterol levels, have been associated with a fall in the number of EPCs and potential regenerative capacity (36). Patients with CKD suffer from severe cardiovascular disease with high morbidity and mortality. Their survival may be influenced, at least in part, by a deficiency in vascular regeneration due to a reduction in the number of EPCs and/or in their functionality (2, 18, 24, 31,

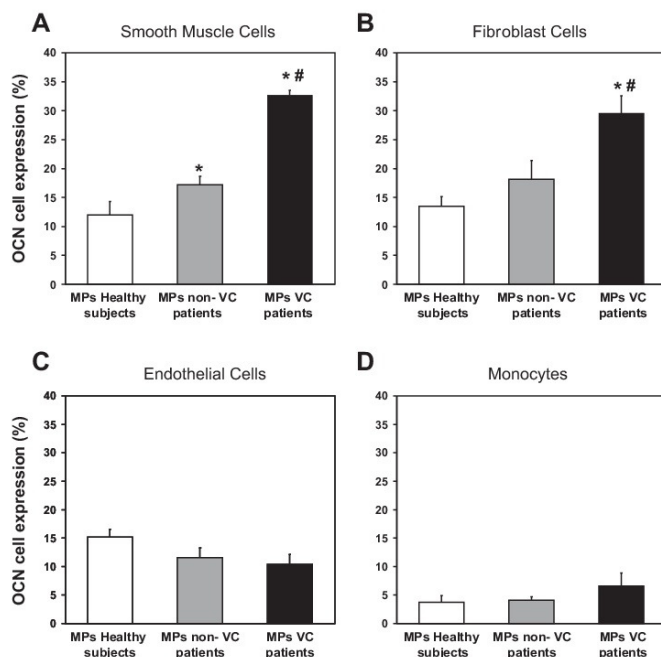


Fig. 6. Effects of MPs on OCN expression in cultured human cell lines. A: smooth muscle cells. B: fibroblast cells. C: mature endothelial cells (human umbilical vein endothelial cells). D: monocytes (THP-1 cells). \* $P < 0.01$  vs. MPs from healthy subjects; # $P < 0.01$  vs. MPs from non-VC patients. Results represent means  $\pm$  SD of four independent experiments.

33). In our study, the proportion of hypertensive subjects was similar in both VC and non-VC patients. Cardiovascular events were more prevalent in patients in the VC group (42%) than in the non-VC group (22%); however, within each group, there was no significant association between the number and functional activity of EPCs or EMPs and cardiovascular events. CKD patients have numerous factors that predispose them to cardiovascular events; one important factor is VC. With our limited number of patients, it is difficult to demonstrate a separate association of VC and cardiovascular events with the number of EMP and the number and functional activity of EPCs.

We found that EPCs obtained from patients with VC may have osteogenic potential because they express OCN, which is a marker of osteoblastic cells. Other studies (11, 23, 28) have previously described the presence of osteoprogenitor markers both in the extracellular endothelial matrix and peripheral blood, since it appears to play an essential role in the repair and regeneration of bone. In CKD, the absolute number of EPC with proosteoblastic potential may be small, but they may have a functional impact considering that a relatively large proportion of these cells express OCN.

In patients with coronary atherosclerosis, there is a rise in the expression of OCN by EPCs (13, 16). Moreover, EPCs that express OCN have been found in greater numbers in calcified aortic valve tissue (17). In our study, we also obtained OCN<sup>+</sup>

EPCs when we cultured EPCs from healthy donors with MPs derived from CKD patients, a finding that reinforces the potentially dominant role played by MPs in the development of VC. Apart from EPCs, in vitro, MPs from CKD patients with VC had a remarkable capacity to induce OCN expression in VSMCs and fibroblasts.

The presence of precursor cells (OCN<sup>+</sup> EPCs) that are common in peripheral blood may explain, at least in part, why "ossification" of the arteries may take place at any time and site. There may exist several stages in the process of endothelial repair. Endothelial damage results in the release of EMPs; these circulate in the peripheral blood and bone marrow, where they stimulate the production of EPCs required for endothelial repair. In normal subjects, physiological mechanisms between EMPs and EPCs maintain an equilibrium that is disrupted in the presence of diseases such as CKD, in which many uremic factors are involved. This repair mechanism is probably limited, and, at some point, the damage to the endothelium is much greater than the capacity of the bone marrow to produce EPCs, so alternative repair mechanisms are activated. In these circumstances, the organism use other progenitors originally designed to repair other types of tissue, such as bone, but end up repairing blood vessels, thus producing VC.

One limitation of the present study is the lack of information on the potential role of EMPs of origin other than endothelial cells, such as lymphocytes, endothelial cells, platelets, leuko-

Translational Physiology

FI310

CALCIFICATION IN CHRONIC KIDNEY DISEASE

cytes, and monocytes/macrophages. Further studies will have to be performed to define the role of other types of EMPs in the development of VC. We focused our attention on EMPs assuming that the vascular damage induced by calcification had a prevalent effect in endothelial cells. We are aware that the numbers of both EMPs and EPCs that we studied in peripheral blood were very low. To solve this technical problem, we measured a large number of events, with the aim of minimizing potential errors in the quantification. The number of patients in the study was limited. However, our results obtained from in vitro experiments were in agreement with the in vivo findings. Nevertheless, we believe that our experiments can help to understand some of the processes that taking place in the vasculature of patients with VC.

Our study has shown that in CKD patients with and without VC, there is an imbalance in the process of endothelial damage and repair, as suggested by the rise in EMPs paralleled with a decrease in the number of EPCs. The excess of MPs promotes the expression of an osteogenic phenotype in EPCs, VSMCs, and fibroblasts. We also show that EPCs may directly participate in the process of VC since some of these cells possess features of osteogenic cells. In fact, our findings can help to understand why patients with CKD frequently present VC. Our study also offers potential new clinical diagnostic tools, such as the increased number of apoptotic EMPs, low number of EPCs, and high percentage of cells with osteogenic characteristics. In conclusion, in CKD patients, the system of endothelial damage and repair may, through different mechanisms, participate in the generation of VC.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to M. J. Jimenez and R. Moyano for technical assistance.

GRANTS

This work was supported by Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III Grants PI09/00836, PI10/00960, PI11/01536, and PI12/01489, RETICs Red Renal Grant RD06/0016/0007, Junta de Andalucía Grants JA0797-2010, P08-CTS-3797, P010-CTS-6337, P11-CTS-7352, and Fundación Nefrológica. J. Carracedo was supported by a contract from Fundación de Investigaciones Biomédicas de Córdoba (Programa Nicolás Monardes).

DISCLOSURES

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the author(s).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Author contributions: S.S., F.T., M.R., M.A.-B., R.R., and J.C. conception and design of research; S.S., A.C., F.T., R.R., and J.C. analyzed data; S.S., A.C., F.T., M.R., R.R., P.A., and J.C. interpreted results of experiments; S.S., A.C., and J.C. prepared figures; S.S., A.C., F.T., A.M.-M., M.-A.A.-L., R.R., P.A., and J.C. drafted manuscript; S.S., M.R., M.A.-B., A.M.-M., M.-A.A.-L., R.R., P.A., and J.C. edited and revised manuscript; S.S., A.C., F.T., M.R., M.A.-B., A.M.-M., M.-A.A.-L., R.R., P.A., and J.C. approved final version of manuscript; A.C., F.T., and J.C. performed experiments.

REFERENCES

1. Adeney KL, Siscovick DS, Ix JH. Association of serum phosphate with vascular calcification in moderate CKD. *J Am Soc Nephrol* 20: 381–387, 2009.
2. Amabile N, Guérin AP, Tedgui A, Boulanger CM, London GM. Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study. *Nephrol Dial Transplant* 27: 1873–1880, 2012.
3. Baj-Krzyworzeka M, Majka M, Pratico D, Ratajczak J, Vilaire G, Kijowski J, Reza R, Janowska-Wieczorek A, Ratajczak MZ. Platelet-

- derived microparticles stimulate proliferation, survival, adhesion, and chemotaxis of hematopoietic cells. *Exp Hematol* 30: 450–459, 2002.
4. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 48: 180–186, 2006.
5. Chironi GN, Simon A, Boulanger CM, Dignat-George F, Hugel B, Megnien JL, Lefort M, Freyssinet JM, Tedgui A. Circulating microparticles may influence early carotid artery remodeling. *J Hypertens* 28: 789–796, 2010.
6. Demer LL, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* 117: 2938–2948, 2008.
7. Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. Cellular microparticles: new players in the field of vascular disease? *Eur J Clin Invest* 34: 392–401, 2004.
8. Eipers PG, Kale S, Taichman RS, Pipia GG, Swords NA, Mann KG, Long MW. Bone marrow accessory cells regulate human bone precursor cell development. *Exp Hematol* 28: 815–825, 2000.
9. Eghbali-Fatourehchi GZ, Lamsam J, Fraser D, Nagel DA, Riggs BL, Khosla S. Circulating osteoblast lineage cells in humans. *N Engl J Med* 352: 1959–1966, 2005.
10. Eghbali-Fatourehchi GZ, Moedder UI, Charatcharoenwithaya N, Sanayal A, Undale AH, Clowes JA, Tarara JE, Khosla S. Characterization of circulating osteoblast lineage cells in humans. *Bone*: 1370–1377, 2007.
11. Fadini GP, Rattazzi M, Matsumoto T, Asahara T, Khosla S. Emerging role of circulating calcifying cells in the bone-vascular axis. *Circulation* 125: 2772–2781, 2012.
12. Faure V, Dou L, Sabatier F, Cerini C, Sampol J, Berland Y, Brunet P, Dignat-George F. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost* 4: 566–573, 2006.
13. Flammer AJ, Gössl M, Widmer RJ, Reriani M, Lennon R, Loeffler D, Shony S, Simari RD, Lerman LO, Khosla S, Lerman A. Osteocalcin positive CD133+/CD34-/KDR+ progenitor cells as an independent marker for unstable atherosclerosis. *Eur Heart J* 33: 2963–2969, 2012.
14. Friedrich EB, Walenta K, Scharlau J, Nickenig G, Werner N. CD34-/CD133+/VEGFR-2+ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ Res* 98: e20–e25, 2006.
15. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *N Engl J Med* 351: 1296–1305, 2004.
16. Gössl M, Mödder UI, Atkinson EJ, Lerman A, Khosla S. Osteocalcin expression by circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 52: 1314–1325, 2008.
17. Gössl M, Khosla S, Zhang X, Higano N, Jordan KL, Loeffler D, Enriquez-Sarano M, Lennon RJ, Lerman LO, Lerman A. Role of circulating osteogenic progenitor cells in calcific aortic stenosis. *J Am Coll Cardiol* 60: 1945–1953, 2012.
18. Herbrig K, Pistrosch F, Foerster S, Gross P. Endothelial progenitor cells in chronic renal insufficiency. *Kidney Blood Press Res* 29: 24–31, 2006.
19. Hergenreider E, Heydt S, Tréguer K, Boettger T, Horrevoets AJ, Zeiher AM, Scheffer MP, Frangakis AS, Yin X, Mayr M, Braun T, Urbich C, Boon RA, Dimmeler S. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol* 14: 249–256, 2012.
20. Hill JM, Zalos G, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 348: 593–600, 2003.
21. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med* 8: 498–508, 2004.
22. Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Ahn YS. Endothelial microparticles as markers of endothelial dysfunction. *Front Biosci* 9: 1118–1135, 2004.
23. Ingram DA, Caplice NM, Yoder MC. Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells. *Blood* 106: 1525–1531, 2005.
24. Jie KE, Zaikova MA, Bergevoet MW, Westerweel PE, Rastmanesh M, Blankstijn PJ, Boer WH, Braam B, Verhaar MC. Progenitor cells and vascular function are impaired in patients with chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant* 25: 1875–1882, 2010.
25. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Horstman LL, Bidot CJ, Ahn YS. Endothelial microparticles (EMP) as vascular disease markers. *Adv Clin Chem* 39: 131–157, 2005.
26. Kauppila LL, Polak JK, Cupples LA, Hannan MT, Kiel DP, Wilson PW. New indices to classify location, severity and progression of calcific

- lesions in the abdominal aorta: a 25 year follow-up study. *Atherosclerosis* 132: 245–250, 1997.
27. **London GM.** Cardiovascular calcifications in uremia patients: clinical impact on cardiovascular function. *J Am Soc Nephrol* 14, Suppl 4: S305–S309, 2003.
  28. **Long MW, Robinson JA, Ashcraft EA, Mann KG.** Regulation of human bone marrow-derived osteoprogenitor cells by osteogenic growth factors. *J Clin Invest* 95: 881–887, 1995.
  29. **Mashide M, Towler D, Slatopolsky E.** Vascular calcification: the killer of patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol* 20: 1453–1464, 2009.
  30. **Medina RJ, O'Neill CL, Sweeney M, Guduric-Fuchs J, Gardiner TA, Simpson DA, Stitt AW.** Molecular analysis of endothelial progenitor cell (EPC) subtypes reveals two distinct cell populations with different identities. *BMC Med Genomics* 13: 3–18, 2010.
  31. **Merino A, Portolés J, Selgas R, Ojeda R, Buendia P, Ocaña J, Bajo MA, del Peso G, Carracedo J, Ramírez R, Martín-Malo A, Aljama P.** Effect of different dialysis modalities on microinflammatory status and endothelial damage. *Clin J Am Soc Nephrol* 5: 227–234, 2010.
  32. **Okuno S, Ishimura E, Kitatani K, Fujino Y, Kohno K, Maeno Y, Maekawa K, Yamakawa T, Imanishi Y, Inaba M, Nishizawa Y.** Presence of abdominal aortic calcification is significantly associated with all-cause and cardiovascular mortality in maintenance hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 49:417–425, 2007.
  33. **Ramírez R, Carracedo J, Merino A, Noguera S, Alvarez-Lara MA, Rodríguez M, Martín-Malo A, Tetta C, Aljama P.** Microinflammation induces endothelial damage in hemodialysis patients: the role of convective transport. *Kidney Int* 72: 108–113, 2007.
  34. **Schmidt-Lucke C, Rössig L, Fichtlscherer S, Vasa M, Britten M, Kämper U, Dimmeler S, Zeiher AM.** Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 111: 2981–2987, 2005.
  35. **Shin V, Zebboudj AF, Boström K.** Endothelial cells modulate osteogenesis in calcifying vascular cells. *J Vasc Res* 41: 193–201, 2004.
  36. **Staude H, Jeske S, Schmitz K, Warncke G, Fischer DC.** Cardiovascular risk and mineral bone disorder in patients with chronic kidney disease. *Kidney Blood Press Res* 37: 68–83, 2013.
  37. **Urbich C, Dimmeler S.** Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res* 95: 343–353, 2004.
  38. **Vasa M, Fichtlscherer S, Aicher A, Adler K, Urbich C, Martin H, Zeiher AM, Dimmeler S.** Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease. *Circ Res* 89: E1–7, 2007.
  39. **Werner N, Kosiol S, Schiegl T, Ahlers P, Walenta K, Link A, Böhm M, Nickenig G.** Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes. *N Engl J Med* 353: 999–1007, 2005.
  40. **Werner N, Wassmann S, Ahlers P, Kosiol S, Nickenig G.** Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 112–116, 2006.
  41. **Wilson PWF, Kauppila LI, O'Donnell CJ, Kiel DP, Hannan M, Polak JM, Cupples LA.** Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality. *Circulation* 103: 1529–1534, 2001.
  42. **Yao Y, Jumabay M, Ly A, Radparvar M, Cubberly MR, Boström K.** A role for the endothelium in vascular calcification. *Circ Res* 113: 495–504, 2013.
  43. **Zampetaki A, Kirton JP, Xu Q.** Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc Res* 78: 413–421, 2008.







# CAPÍTULO II

---



## **II. Markers of endothelial damage in patients with chronic kidney disease on hemodialysis.**





## RESEARCH ARTICLE | *Inflammation and Inflammatory Mediators in Kidney Disease*

### Markers of endothelial damage in patients with chronic kidney disease on hemodialysis

Andrés Carmona,<sup>1,4</sup> María L. Agüera,<sup>1,2,4</sup> Carlos Luna-Ruiz,<sup>1,4</sup> Paula Buendía,<sup>1,4</sup> Laura Calleros,<sup>4,5,6</sup> Andrea García-Jerez,<sup>4,5,6</sup> Manuel Rodríguez-Puyol,<sup>4,5,6</sup> Manuel Arias,<sup>4,7</sup> Marta Arias-Guillen,<sup>4,8</sup> Gabriel de Arriba,<sup>4,9,10</sup> Jose Ballarin,<sup>4,11</sup> Carmen Bernis,<sup>4,12</sup> Elvira Fernández,<sup>4,13</sup> Sagrario García-Rebollo,<sup>4,14</sup> Javier Mancha,<sup>4,15</sup> Gloria del Peso,<sup>4,16</sup> Estefanía Pérez,<sup>4,14</sup> Esteban Poch,<sup>4,8</sup> Jose M. Portolés,<sup>4,17</sup> Diego Rodríguez-Puyol,<sup>4,15</sup> Rafael Sánchez-Villanueva,<sup>4,16</sup> Felipe Sarro,<sup>4,13</sup> Armando Torres,<sup>4,14</sup> Alejandro Martín-Malo,<sup>1,2,3,4</sup> Pedro Aljama,<sup>1,2,3,4</sup> Rafael Ramírez,<sup>4,5\*</sup> and Julia Carracedo<sup>1,2,4,18\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Córdoba, Spain; <sup>2</sup>Unidad de Gestión Clínica Nefrología, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba, Spain; <sup>3</sup>Departamento de Medicina (Medicina, Dermatología y Otorrinolaringología), Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain; <sup>4</sup>Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud—Red Española de Investigación Renal, RD16/0009, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; <sup>5</sup>Biología de Sistemas Department, Alcalá de Henares University, Madrid, Spain; <sup>6</sup>Biobanco Redes Temáticas de Investigación Cooperativa en Salud Red Renal, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; <sup>7</sup>Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Spain; <sup>8</sup>Departamento de Nefrología y Trasplante Renal, Hospital Clínic de Barcelona, Institut D'Investigacions Biomediques August Pi I Sunyer, Universidad de Barcelona, Barcelona, Spain; <sup>9</sup>Hospital Universitario de Guadalajara, Guadalajara, Spain; <sup>10</sup>Departamento de Medicina y Especialidades Médicas, Alcalá de Henares University, Madrid, Spain; <sup>11</sup>Fundació Puigvert, Barcelona, Spain; <sup>12</sup>Hospital Universitario La Princesa Madrid, Madrid, Spain; <sup>13</sup>Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida, Lleida, Spain; <sup>14</sup>Servicio de Nefrología, Hospital Universitario de Canarias, Improving Biomedical Research and Innovation in the Canary Islands—Centro de Investigación Biomédica de Canarias, Universidad de La Laguna, La Laguna, Spain; <sup>15</sup>Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid, Spain; <sup>16</sup>Hospital Universitario La Paz, Madrid, Spain; <sup>17</sup>Hospital Puerta de Hierro, Madrid, Spain; and <sup>18</sup>Departament of Animal Physiology II, Faculty Biology, Complutense University, Madrid, Spain

Submitted 7 January 2016; accepted in final form 9 January 2017

Carmona A, Agüera ML, Luna-Ruiz C, Buendía P, Calleros L, García-Jerez A, Rodríguez-Puyol M, Arias M, Arias-Guillen M, de Arriba G, Ballarin J, Bernis C, Fernández E, García-Rebollo S, Mancha J, del Peso G, Pérez E, Poch E, Portolés JM, Rodríguez-Puyol D, Sánchez-Villanueva R, Sarro F, Torres A, Martín-Malo A, Aljama P, Ramírez R, Carracedo J. Markers of endothelial damage in patients with chronic kidney disease on hemodialysis. *Am J Physiol Renal Physiol* 312: F673–F681, 2017. First published January 11, 2017; doi:10.1152/ajprenal.00013.2016.—Patients with Stage 5 chronic kidney disease who are on hemodialysis (HD) remain in a chronic inflammatory state, characterized by the accumulation of uremic toxins that induce endothelial damage and cardiovascular disease (CVD). Our aim was to examine microvesicles (MVs), monocyte subpopulations, and angiopoietins (Ang) to identify prognostic markers in HD patients with or without diabetes mellitus (DM). A total of 160 prevalent HD patients from 10 centers across Spain were obtained from the Biobank of the Nephrology Renal Network (Madrid, Spain): 80 patients with DM and 80 patients without DM who were matched for clinical and demographic criteria. MVs from plasma and several monocyte subpopulations (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup>) were analyzed by flow cytometry, and the plasma concentrations of Ang1 and Ang2 were quantified by ELISA. Data on CVD

were gathered over the 5.5 yr after these samples were obtained. MV level, monocyte subpopulations (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup> and CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>+</sup>), and Ang2-to-Ang1 ratios increased in HD patients with DM compared with non-DM patients. Moreover, MV level above the median (264 MVs/ $\mu$ l) was associated independently with greater mortality. MVs, monocyte subpopulations, and Ang2-to-Ang1 ratio can be used as predictors for CVD. In addition, MV level has a potential predictive value in the prevention of CVD in HD patients. These parameters undergo more extensive changes in patients with DM.

chronic kidney disease; cardiovascular disease; diabetes mellitus; microvesicles; inflammation, hemodialysis

PATIENTS WITH CHRONIC KIDNEY DISEASE (CKD) eliminate toxic compounds from their body less efficiently, resulting in the accumulation of uremic toxins (8, 14, 52, 54) and maintenance of a chronic inflammatory state (18, 20, 21, 27, 39). These events affect endothelial activation and are associated with a higher frequency of cardiovascular disease (CVD), which is one of the main causes of the high morbidity and mortality in these patients (29, 42).

Furthermore, in CKD patients, renal failure is related frequently with other diseases, such as diabetes, which also induce inflammation and endothelial damage (20, 24, 44, 48); the endothelial damage due to diabetes might be another risk factor for CVD in CKD patients (19, 56). Some studies have

\* R. Ramírez and J. Carracedo contributed equally to this work as last authors.

Address for reprint requests and other correspondence: J. Carracedo, IMIBIC/FIBICO, Reina Sofía Univ. Hospital, Córdoba 14004, Spain (e-mail: julia.carracedo.exts@juntadeandalucia.es).

examined (1) whether inflammation and endothelial damage in CKD patients with diabetes differ from endothelial disease in patients without diabetes and have identified markers of inflammation and endothelial damage in CKD.

The inflammatory state is associated with the activation and apoptosis of endothelial cells (ECs), leading to the release of recently identified circulating biomarkers that are related to endothelial dysfunction, called CD31<sup>+</sup>Annexin V<sup>+</sup> microvesicles (MVs) (5, 43), which have been proposed to be markers of endothelial damage and dysfunction in several pathologies (15, 17, 26).

Extracellular vesicles (EVs), including exosomes (<100 nm) and MVs (100–1,000 nm), are small, secreted, membrane-enclosed entities that are involved in various biological, physiological, and pathological phenomena. In our study, we will use the term MVs, as our EV detection method allows detection of mostly larger EVs (>400 nm). EVs protect a wide range of biomolecules that originate from secreting cells, and their molecular cargo changes in diseases and other physiological states (25, 34, 49, 58). In conventional flow cytometry, the range of detection of MVs is 400–1,000 nm (38). During inflammation, the number of EVs increases (22, 53). The effects of EVs might be mediated by their support of cell-to-cell crosstalk, because EVs transport microRNA, active molecules, hormones, peptides, and regulator proteins (6, 16, 35), the levels of which rise in patients with CVD, CKD, and type II diabetes mellitus (T2DM) (23, 50). Furthermore, proinflammatory monocytes (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup>) (3, 10, 36, 60, 61) and monocytes that predict cardiovascular risk (CD14<sup>2+</sup>/CD16<sup>+</sup>) (22, 47, 60, 61) are elevated in the peripheral blood of patients with CVD. These data have been confirmed in CKD patients, and we have reported that the amounts of these proinflammatory cells correlate with various markers of endothelial damage, including MVs (36, 43).

Angiotensin II (AngII) stabilizes the endothelium by inhibiting EC apoptosis and activation and decreasing inflammation. In contrast, Ang2 is proinflammatory and promotes EC and epithelial cell apoptosis, increases neutrophil adhesion, and induces cytoskeletal changes to widen interendothelial gaps. The ratio of Ang2 to AngI might be a useful prognostic biomarker of endothelial activation (40).

Based on the frequency of cardiovascular complications in patients with Stage 5 CKD who are on hemodialysis (HD), we must improve our understanding of the development of endothelial damage to identify markers that can predict the progression of CVD and establish appropriate targets that might delay disease progression. Therefore, our goal was to measure MV level, monocyte subpopulations, and other soluble markers of endothelial damage, such as Ang, in patients with and without diabetes to determine whether these markers identify CVD patients with HD, whether diabetes modifies their expression profiles in HD, and whether they are prognostic markers in HD patients with and without diabetes.

#### MATERIALS AND METHODS

**Research participants.** Samples from 160 patients on HD were obtained from the Biobank of the Nephrology Renal Network (Madrid, Spain) from a total population of 400 HD patients from whom samples had been collected. The patients underwent HD in various dialysis units throughout Spain. Blood samples were obtained just before the HD session began. The bacterial and endotoxin contami-

nation levels were below the detection limit in all premixed dialysate samples (<1 bacterial colony-forming unit/ml and <0.03 endotoxin unit).

Data were also gathered on parameters that were related to severe CVD, defined as a cardiovascular event: acute myocardial infarction, cerebrovascular accident, or transient ischemic attack, until completion of the study (5.5 yr).

The study was approved by the Biobank Ethics Committee, and all subjects provided written, informed consent before collection of the samples and their storage in the Biobank.

**Characteristics of the study population.** The algorithm that we used to select patients is shown in Fig. 1. Of the 118 HD patients with DM, we chose 80 HD patients (18 HD T1DM patients and 62 HD T2DM patients) who had undergone at least 6 mo of HD and did not have a history of cardiovascular events. Then we selected 80 HD patients without DM who were matched for center (rate 1:1) and demographics (similar percentage of men and those aged older than 50 yr). The mean age of the study population ( $n = 160$ ) was  $64.23 \pm 3.88$  yr, and the study sample comprised 95 men and 65 women (Table 1). No differences in C-reactive protein levels were observed. Fifteen healthy subjects (50% men, 25% smoking, no hypertension, no hyperlipidemia) were included as controls. Blood samples were drawn from the arterial line before the start of HD or by venipuncture in healthy individuals. For this, a 21-gauge needle was used (57).

**Isolation and determination of MVs in plasma.** Platelet-free plasma was obtained by centrifugation at 1,500 g for 20 min at room temperature. Next, the supernatant was recovered and centrifuged at 13,000 g for 2 min to separate MVs. The supernatant was discarded, and the pellets were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use (28, 31, 46, 57). MVs were then resuspended and incubated with 5  $\mu\text{l}$  phycoerythrin (PE)-labeled monoclonal anti-CD31 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) using FITC-conjugated Annexin V kits, per the manufacturer's instructions (Bender MedSystems, Vienna, Austria). CD31 is an adhesion molecule that identifies EVs that are derived from ECs, platelets, and leukocytes. MVs that expressed phosphatidylserine were labeled using fluorescein-conjugated Annexin V solution in the presence of  $\text{CaCl}_2$  (5 mM), per the supplier. As a control for the Annexin V labeling, a sample with fluorescein-conjugated Annexin V, using a  $\text{CaCl}_2$ -free solution, was established. Isotype controls were included as negative controls for the CD31 labeling. An equal volume of Flow-Count calibration beads (Beckman Coulter, Brea, CA) was added to measure the number of events per microliter. Fluorescence-

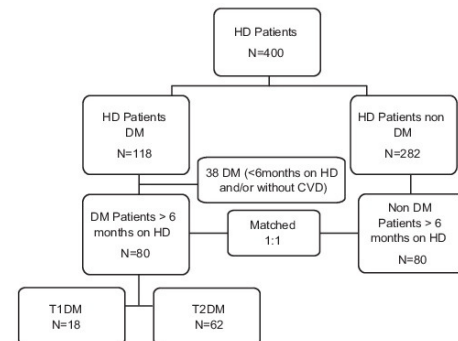


Fig. 1. Patient flowchart for selection of study population, with inclusion and exclusion criteria. HD, hemodialysis; DM, diabetes mellitus; CVD, cardiovascular disease; T1DM, Type 1 diabetes mellitus; T2DM, Type 2 diabetes mellitus.

Table 1. Clinical characteristics of HD patients

	Healthy Subjects	Non-DM	T1DM	T2DM	P
n	15	80	18	62	
Men, n, %	8 (53.3)	50 (62.5)	9 (50.0)	45 (56.2)	0.8
eKt/V, means ± SD		1.6 ± 0.3	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.3	0.8
C-Reactive protein, median (Q1, Q3), mg/dl		2.9 (1, 9)	4.1 (1.3, 8.9)	4 (1.1, 10.7)	0.6
Smoking					0.9
Yes, n, %	4 (26.6)	33 (41.2)	6 (33.4)	25 (40.4)	
No, n, %	11 (73.4)	47 (58.8)	12 (66.6)	37 (59.6)	
Hypertension, n, %	0	47 (58.8)	13 (72.3)	45 (72.5)	0.2
Hyperlipidemia, n, %	0	41 (51.2)	11 (61.5)	43 (69.3)	0.1
HD modality, % online hemodiafiltration	0	12.5	10.5	16	0.9
HD modality, % low-flux hemodialysis	0	40	55.5	35	0.6
HD modality, % high-flux hemodialysis	0	47.5	30	49	0.65
Unknown HD modality, %		0	4	0	
CVD					0.04
Yes, n (%)	0	21 (26.2)	7 (38.9)	29 (46.7)	
No, n (%)	0 (100)	59 (73.7)	11 (61.1)	33 (53.3)	

eKt/V, equilibrated optimal dialysis dose; T1DM, type 1 diabetes mellitus; HD, hemodialysis.

activated cell sorter analysis was performed on a Cytomics FC 500 flow cytometer (Beckman Coulter) using CXP (Beckman Coulter).

Before the sample acquisition, the samples were subjected to a separate and combined labeling reaction using all reagents (MAB, Annexin V, and the appropriate negative controls) to compensate for the fluorescence using compensation tools on the flow cytometer. An MV's gates were established on the FC 500 in preliminary standardization experiments using a blend of size-calibrated beads (Beckman Coulter) with diameters of 0.3, 0.5, and 1.0 μm. The upper and outer limits of the MV's gate were established just above the size distribution of the 1-μm beads in the forward- and side-scatter area (FSC-A and SSC-A, respectively) settings (log scale). The lower limit was the noise threshold of the instrument (SSC-A), limiting high background noise. The absolute number of MVs was calculated as the following: (MVs counted × standard beads/liter)/standard beads counted (Flow-Count; Beckman Coulter). Each result (single value) was the average of three independent measurements of the same sample.

**Monocyte subpopulations.** A 10-ml sample of peripheral blood was drawn from HD patients and healthy subjects into tubes that contained EDTA and deposited into the Biobank. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by Ficoll density-gradient centrifugation (Lymphoprep; Axis-Shield, Oslo, Norway), washed with PBS (Thermo Fisher Scientific), and supplied with 20% FBS (Thermo Fisher Scientific). After separation, PBMCs were frozen in FBS with 10% DMSO at -80°C for 24 h and transferred to liquid nitrogen until the day of processing. The suitability of the samples for processing and labeling was verified using parallel, unfrozen control blood. Cell viability was tested by mixing cell suspensions with Trypan blue solution (25900048R; Corning cellgro; Thermo Fisher Scientific).

To identify CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup> and CD14<sup>2+</sup>/CD16<sup>+</sup> monocytes, PBMCs were incubated with peridinin chlorophyll protein-conjugated monoclonal anti-CD14 (M5E2) and FITC-conjugated anti-CD16 (3G8). Both antibodies and the appropriate isotype controls were purchased from BD Biosciences (San Jose, CA). Flow cytometry was performed on a FACSCalibur (BD Biosciences) using CellQuest. The percentage of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup> and CD14<sup>2+</sup>/CD16<sup>+</sup> monocytes was calculated by subtracting nonspecifically stained cells, as identified in the isotype control histogram.

**Angiogenic factors.** The soluble angiogenic factors Ang1 and Ang2 were quantified by ELISA (R&D Systems, Minneapolis, MN), per the manufacturer's instructions.

**Statistical analysis.** Continuous data were expressed as means ± SD and as the median [quartile 1 (Q1), Q3] for normal and skewed distributions, respectively. Comparisons between means of healthy subjects vs. HD non-DM, HD T1DM, and HD T2DM were analyzed by ANOVA, followed by Duncan test; χ<sup>2</sup> test was used for categorical

data, which were expressed as percentages. Survival of HD non-DM and HD DM patients was analyzed by the Kaplan-Meier method, and differences in survival between two or more groups were examined by log-rank test, from the collection of blood samples to the start of the follow-up. The influence of MVs on patient survival after stratification by DM or non-DM was analyzed as a categorical variable—divided in two groups (above or below the median value)—and adjusted using traditional cardiovascular risk factors (smoking, hypertension, and hyperlipidemia) by multivariable Cox regression.

Correlation analysis was performed among the study variables (CD14<sup>2+</sup>/CD16<sup>+</sup>, CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup>, and MVs) in each group (HD non-DM, HD DM), separately by Pearson or Spearman test where appropriate. All statistical analyses were performed with SPSS 15.0 (IBM, Armonk, NY). Two-sided P < 0.05 was considered to be statistically significant.

RESULTS

**Quantification of MV level (MVs per microliter) in HD patients.** Representative graphs of the flow cytometry analysis of EVs and the number of MVs in HD patients are shown in Fig. 2, A and B. Size-selected events are plotted as a function of their double fluorescence for specific Annexin-PE binding and CD31-FITC for negative control (Fig. 2C) and HD patients (Fig. 2D). We observed that HD non-DM patients experienced a significant increase in MV level (236.4 ± 20.8 MVs/μl) in relation to healthy subjects (26.9 ± 4.1 MVs/μl; P < 0.001). Similarly, HD patients with T1DM had a significantly higher MV level (259.0 ± 34.3) vs. healthy subjects (26.9 ± 4.1 MVs/μl; P < 0.001). HD patients with T2DM had significantly more MVs (321.9 ± 33.5 MVs/μl) compared with healthy subjects (26.9 ± 4.1 MVs/μl; P < 0.001). Moreover, T2DM subjects had a higher MV level than HD patients without DM (321.9 ± 33.5 MVs/μl vs. 236.4 ± 20.8 MVs/μl; P = 0.014; Fig. 2E).

**Monocyte subpopulations in HD patients.** The percentage of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup> monocytes defines the extent of inflammation, which we calculated by flow cytometry (Fig. 3, A-C). The percentage of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup> monocytes was higher in HD non-DM (8.4 ± 3.5%) and T1DM patients (11.6 ± 3.4%) than in healthy subjects (2.8 ± 0.9%; P < 0.001). Furthermore, the percentage of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup> monocytes was elevated in T1DM patients (11.6 ± 3.4%) compared with HD non-DM

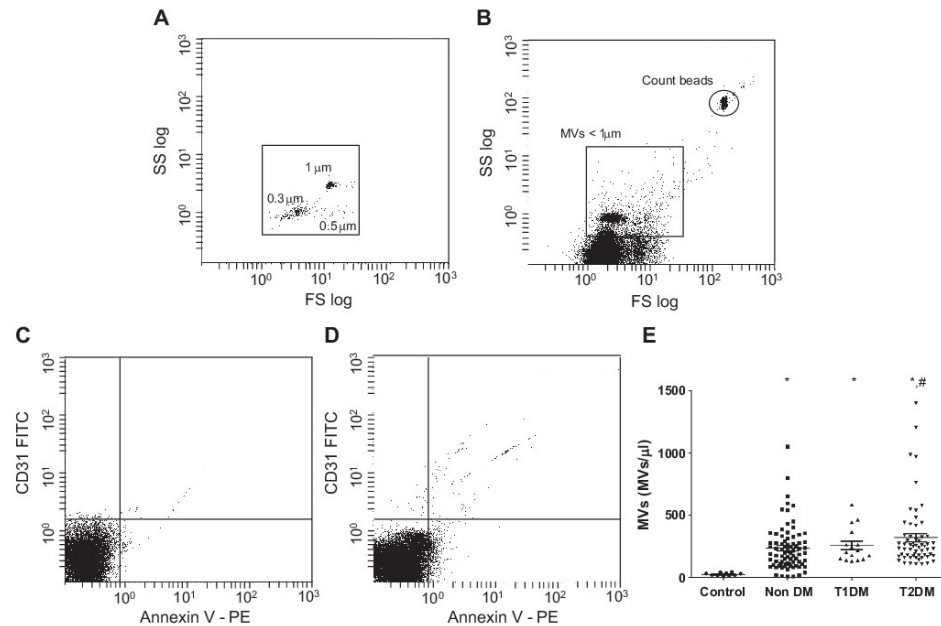


Fig. 2. Quantification of microvesicles (MVs) in plasma of HD patients. Fluorescence-gated beads of various sizes for determining gates between 0.4 and 1  $\mu\text{m}$  (A). Representative graphs of flow cytometry analysis of extracellular vesicles (EVs) in platelet-free plasma. EVs were plotted using an FSC logarithmic (FS log)/SSC logarithmic (SS log) dot-plot histogram. MVs are defined as event numbers with a size of 0.4–1  $\mu\text{m}$  and are gated in a window. It was necessary to use bead counts in each experiment to calculate the concentration of MVs per unit volume of the sample (B). Size-selected events are plotted as a function of their double fluorescence for specific Annexin-PE binding and CD31-FITC for negative control (C) and HD patients (D). Number of MVs per microliter in healthy patients with HD patients non-DM, T1DM, and T2DM (E). \* $P < 0.001$  vs. control; # $P = 0.014$  vs. non-DM (ANOVA, followed by Duncan test).

( $8.4 \pm 3.5\%$ ;  $P = 0.001$ ) and T2DM subjects ( $5.8 \pm 1.8\%$ ;  $P < 0.001$ ; Fig. 3D).

The percentage of  $\text{CD}14^{2+}/\text{CD}16^{+}$  monocytes was associated with higher rates of cardiovascular events. Furthermore, this percentage was significantly higher in T1DM vs. healthy ( $5.1 \pm 1.1\%$  vs.  $3.1 \pm 0.8\%$ ;  $P = 0.009$ ) and HD without DM patients ( $4.3 \pm 2.3\%$ ;  $P = 0.043$ ; Fig. 3E).

**Ang2-to-Ang1 ratio in HD patients.** The Ang2-to-Ang1 ratio (Ang2/Ang1) was calculated in plasma samples from healthy subjects and patients with HD. HD patients without DM had an Ang2/Ang1 of  $8.2 \pm 4.5$ , which was significantly higher than in healthy subjects ( $0.5 \pm 0.1$ ;  $P < 0.001$ ). HD patients with T1DM had significantly higher Ang2/Ang1 ( $2.9 \pm 2.5$ ) than healthy subjects ( $0.5 \pm 0.1$ ;  $P < 0.001$ ). Moreover, HD patients with T2DM had significantly higher Ang2/Ang1 ( $9.3 \pm 5.4$ ) compared with healthy subjects ( $0.5 \pm 0.1$ ;  $P < 0.001$ ; Fig. 4).

**Correlation between inflammation and endothelial damage.** In HD patients, we observed a positive correlation between the percentages of  $\text{CD}14^{2+}/\text{CD}16^{+}$  and  $\text{CD}14^{+}/\text{CD}16^{2+}$  monocytes (rho correlation Spearman = 0.544;  $P < 0.001$  Fig. 5A), which also existed in HD patients with DM and in those without DM (rho correlation Spearman = 0.428,  $P = 0.05$  for

patients with DM; rho correlation Spearman = 0.599,  $P < 0.001$  in patients without DM).

MV level and the percentage of  $\text{CD}14^{+}/\text{CD}16^{2+}$  monocytes correlated in HD patients (Spearman rho correlation = 0.348;  $P = 0.017$ ; Fig. 5B and Table 2).

**Mortality in HD patients with and without DM vs. MV level.** We analyzed the relationship between MV level and mortality in HD patients with and without DM after a median of 5.5 yr of follow-up by the Kaplan-Meier method. The patients were divided into two groups, defined by the median level of MVs. HD patients with MV level  $\leq 264$  MVs/ $\mu\text{l}$  had improved survival vs. those with levels that were above the median (log-rank  $< 0.001$ ; Fig. 6A). HD patients without DM with MV level  $\leq 264$  MVs/ $\mu\text{l}$  had greater survival than those with higher-than-median levels (log-rank  $< 0.001$ ; Fig. 6B). HD patients with DM and MV level  $\leq 264$  MVs/ $\mu\text{l}$  also survived longer than patients with MV level that exceeded the median (log-rank = 0.023; Fig. 6C).

Ang2/Ang1 and the  $\text{CD}14^{+}/\text{CD}16^{2+}$  and  $\text{CD}14^{2+}/\text{CD}16^{+}$  subpopulation percentages were not associated with mortality.

**Cox regression analysis.** The hazard ratio for death in HD patients after adjustments by DM and non-DM increased significantly among patients with higher levels of MVs

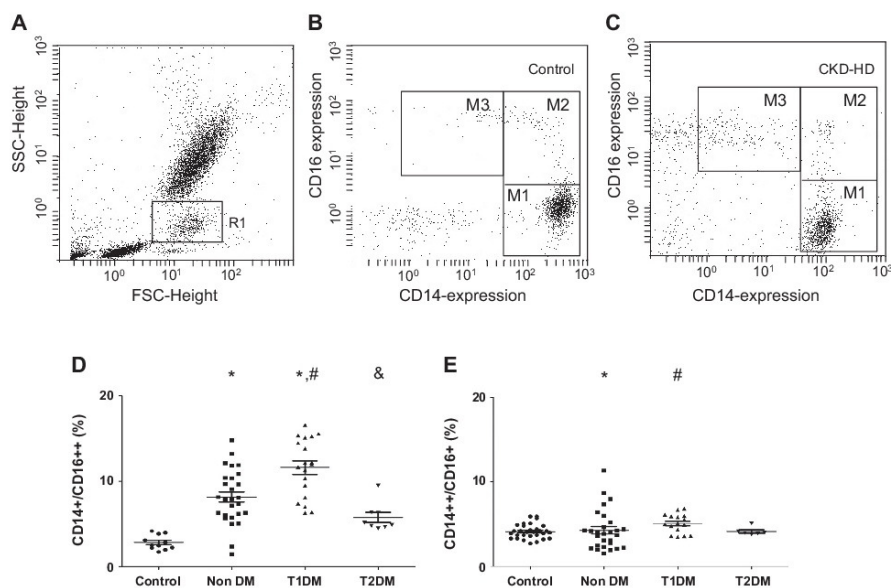


Fig. 3. Representative flow cytometry of monocyte subsets. Backgated (R1 monocyte gate) within the FSC-height/SSC-height (A). Monocyte subsets (M1: CD14<sup>2+</sup>/CD16<sup>-</sup>; M2: CD14<sup>2+</sup>/CD16<sup>+</sup>; M3: CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup>) within the population were assessed using anti-CD16-FITC/anti-CD14-peridinin chlorophyll protein dot-plot control (B) and HD patients (C). Percentage of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup> monocytes in healthy subsets and non-DM, T1DM, and T2DM patients. \**P* < 0.001 vs. control; #*P* = 0.001 vs. non-DM; and &*P* < 0.001 vs. T1DM (D). Percentage of CD14<sup>2+</sup>/CD16<sup>+</sup> monocytes in healthy subsets and non-DM, T1DM, and T2DM patients. \**P* = 0.009 vs. control; #*P* = 0.043 vs. T1DM (ANOVA, followed by Duncan test; E).

(MVs >264, 2.364; 95% confidence interval, 1.395–4.008; *P* = 0.001). The hazard ratio remained significantly higher after adjustments for traditional cardiovascular risk factors (smoking, hypertension, and hyperlipidemia).

DISCUSSION

In this study, we analyzed factors that are related to endothelial damage in patients with HD. Plasma from these patients contained more MVs and had higher Ang2/Ang1 compared with healthy subjects. The extent of endothelial damage was worse in diabetic patients. In contrast to healthy subjects, HD patients experienced an increase in the percentage of proinflammatory (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup>) and high cardiovascular-risk (CD14<sup>2+</sup>/CD16<sup>+</sup>) monocyte subsets.

Parameters of morbidity and mortality were recorded for up to 5.5 yr. MV levels were associated with mortality in HD patients with and without DM. The rise in CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup> cells was proportional to the CD14<sup>2+</sup>/CD16<sup>+</sup> monocyte percentage and MV level.

As described (37), patients on HD harbor more MVs than healthy subjects. MV levels are also higher in other disease states, such as hypertension, DM, and coronary artery disease (9). Consistent with previous results, we noted that patients with HD and DM had higher MV levels than non-DM HD patients, and these levels affected T1DM as much as they did T2DM (39, 41). MV levels have potential value in the diagnosis and therapeutic management of CVD and might indicate worse endothelial damage in HD DM. In patients with coronary heart disease, the number of MVs that bind to Annexin V

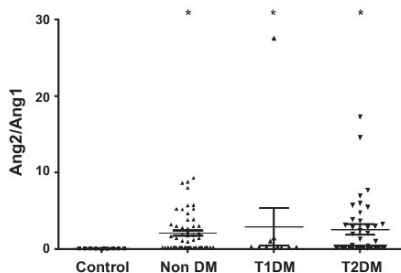


Fig. 4. Ang2-to-Ang1 ratio (Ang2/Ang1) in HD patients. Ang2/Ang1 of healthy patients with HD, patients without DM, and with T1DM and T2DM. \**P* = 0.001 vs. control (ANOVA, followed by Duncan test). Ang1 and Ang2 were quantified by ELISA in plasma (picograms/milliliter).



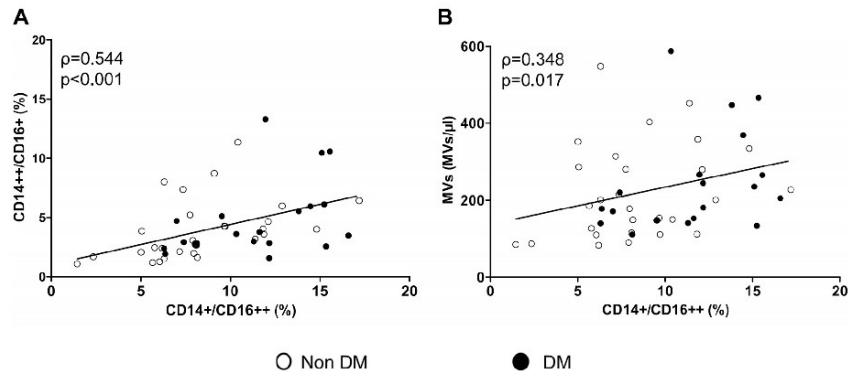


Fig. 5. Correlation between CD14<sup>2+</sup>/CD16<sup>+</sup> and CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup> monocytes in HD patients (A). Correlation between MVs and CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup> monocytes in HD patients (B).

predicts myocardial infarction and mortality (33). In this regard, we have found an association between the number of MVs and mortality in HD patients. In addition, we have observed that patients with and without DM with an MV level  $\leq 264$  MVs/ $\mu$ l experience greater survival than those with an MV level  $>264$  MVs/ $\mu$ l.

In earlier studies, we reported that HD patients have a high percentage of proinflammatory CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup> monocytes (35, 43, 45). These cells have been postulated to mediate the ongoing inflammation in such patients, secreting more proinflammatory cytokines than CD14<sup>2+</sup>/CD16<sup>+</sup> cells (45). Furthermore, CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup> monocytes are associated with chronic inflammatory conditions and have significant function in the development of DM (41). In our study, patients with HD had a higher percentage of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup> monocytes than healthy subjects. There is evidence that circulating monocytes in patients with T1DM can be induced to secrete proinflammatory cytokines (7). We also observed an increase in these proinflammatory monocytes in HD patients with DM, the percentage of which depends on whether the diabetes is T1 or T2. Patients with T1DM had a higher percentage of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup> monocytes than those with T2DM.

HD patients had a higher percentage of monocytes that predict cardiovascular risk (CD14<sup>2+</sup>/CD16<sup>+</sup>) compared with healthy subjects. These monocyte populations are elevated in

patients with HD (32, 51). We found that patients with HD and DM also had a greater percentage of CD14<sup>2+</sup>/CD16<sup>+</sup> than HD patients without DM, indicating that patients with DM have an increased risk of developing CVD.

The imbalance in AngI and Ang2 levels is related to diabetes, CVD, and tumorigenesis (2, 13, 30), and the Ang2/AngI might be an early marker of endothelial dysfunction (12, 55). In our study, patients with HD experienced an imbalance in the levels of Ang. Furthermore, the Ang2/AngI increased in patients with DM compared with healthy subjects. However, these values had no predictive value with regard to mortality.

Our study showed that the levels of CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup> and CD14<sup>2+</sup>/CD16<sup>+</sup> monocytes rose significantly in HD patients. Both subsets correlated positively, and it is possible that both have important functions in inflammation and CVD. Nevertheless, this association was not significant in HD DM patients, although it appeared to have a relative tendency. We cannot explain this disparate correlation between monocyte subsets in HD-DM compared with HD patients. Thus future studies should establish the events that occur in DM that might be implicated in the changes in monocyte subpopulations. Consequently, the rise in the number of these cells in CKD patients might mediate the development of vascular disease, even though the mechanisms should be examined. Moreover, our studies showed an association between MVs and CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>2+</sup> monocytes in HD patients, which explains the chronic inflammatory status of these patients.

The major limitation of our study is that patients with HD, some of whom could have been lost during the study period, had a high risk of mortality due to CVD. Furthermore, despite being a multicenter study, it was performed in a small sample of patients, necessitating larger prospective studies.

The prevalence of CVD is higher in HD patients with DM and elderly patients ( $>50$  yr), which has significant clinical relevance but is another limitation of our study. We would also be interested in studying younger patients and patients in a less advanced stage of CKD to identify early markers of the disease. Moreover, we cannot exclude that the differences between T1DM and T2DM are attributed to disparities in

Table 2. Correlation analysis

	Non-DM		DM		HD	
	Correlation	P	Correlation	P	Correlation	P
MVs vs. Ang2/Ang1	-0.110	0.4	-0.005	0.9	-0.082	0.4
MVs vs. CD14 <sup>+</sup> /CD16 <sup>2+</sup>	0.238	0.1	0.428	0.07	0.348	0.02
MVs vs. CD14 <sup>2+</sup> /CD16 <sup>+</sup>	0.091	0.6	0.211	0.4	0.258	0.08
Ang2/Ang1 vs. CD14 <sup>+</sup> /CD16 <sup>2+</sup>	-0.172	0.4	0.107	0.7	-0.165	0.3
Ang2/Ang1 vs. CD14 <sup>2+</sup> /CD16 <sup>+</sup>	-0.227	0.3	0.307	0.2	0.018	0.9
CD14 <sup>+</sup> /CD16 <sup>2+</sup> vs. CD14 <sup>2+</sup> /CD16 <sup>+</sup>	0.599	<0.001	0.428	0.05	0.544	<0.001

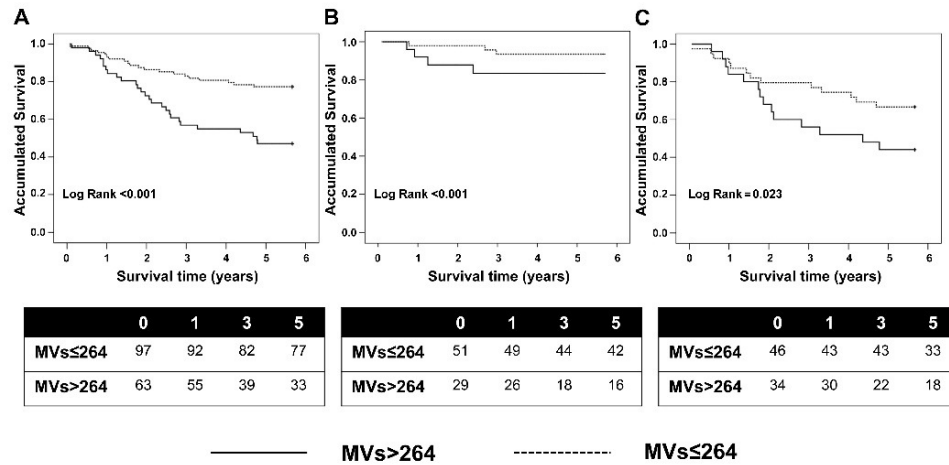


Fig. 6. Kaplan-Meier survival curves with regard to MV level (median) over 5.5 yr. HD patients (A). HD patients without DM (B). HD patients with DM (C).

glycemic control, which would have an impact on the parameter that is assessed.

The size-detection limits of standard flow cytometry are well known, causing smaller MVs to be overlooked. An upper-size limit of EV detection is likely  $>1 \mu\text{m}$ , as a  $0.5\text{-}\mu\text{m}$  polystyrene bead is already reflecting an EV  $\sim 1 \mu\text{m}$  (11). Consequently, an absolute MV count might be under represented. Isolation, purification, identification, and conservation protocols for EVs have advanced significantly. We also believe that MV population might be contaminated with EVs from other origins, such as platelets. Moreover, Annexin V binding by MVs is a calcium-dependent process, and this marker has limited value in assessing apoptotic MVs. However, Annexin V<sup>+</sup> MVs remain a well-studied marker of apoptosis-derived MVs from peripheral blood in healthy individuals and HD patients (4).

The results of our study have significant multidisciplinary implications for a wide range of areas in biomedicine, examining a problem that is a component of many chronic conditions. The resulting increase in our understanding of MVs, monocyte subpopulations, and angiogenic factors in CVD can guide the diagnosis and prognosis of the disease and the design of novel drug therapies. In addition, MVs from platelets and leukocytes might also be involved in inflammation, prompting future studies.

There is no consensus on how to detect and preserve MVs. In addition, no single method can characterize these vesicles completely (phenotype, size, count, and image). MVs abound in body fluids, and the detection of MVs in suspension by flow cytometry has attracted strong clinical and scientific interest, but their detection is difficult, because many MVs are small ( $<400 \text{ nm}$ )—below the limit of resolution of most flow cytometers—causing valuable information on their characteristics to be lost. Other methods (nanoparticle tracking analysis, electron microscopy, resistive pulse sensing) are thus being

used to complement flow cytometry (53, 59). Currently, the major challenge for flow cytometry is the identification of single vesicles with a diameter that is less than the present limit of detection.

In conclusion, our findings confirm that patients with HD remain in an inflammatory state and undergo endothelial alterations that can be tracked using early quantifiable markers in peripheral blood. Notably, MVs, measuring  $400\text{--}1,000 \text{ nm}$ , have potential predictive value in the prevention of CVD in patients with HD. In addition, DM alters these inflammatory and endothelial damage factors.

**ACKNOWLEDGMENTS**

The authors are grateful to M. J. Jimenez and R. Moyano for technical assistance.

**GRANTS**

Support for this work was provided by Plan Nacional de I+D+i Proyectos de Investigación en Salud of Instituto de Salud Carlos III (ISCIII)—Subdirección General de Evaluación, Fondos de desarrollo regional (FEDER); P111/01536, P112/01489, P114/00806, P115/01785; Junta de Andalucía grants (P010-CTS-6337, P11-CTS-7352); and Fundación Nefrológica. P. Buendía, A. Carmona, and C. Luna-Ruiz are fellows from Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa, Junta de Andalucía.

**DISCLOSURES**

No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

**AUTHOR CONTRIBUTIONS**

A.C., R.R., and J.C. conceived and designed research; A.C., R.R., and J.C. performed experiments; A.C., M.L.A., C.L.R., P.B., A.M.-M., P.A., R.R., and J.C. analyzed data; A.C., M.L.A., C.L.R., P.B., A.M.-M., P.A., R.R., and J.C. interpreted results of experiments; A.C., M.L.A., R.R., and J.C. prepared figures; A.C., M.L.A., C.L.R., P.B., L.C., A.G.-J., M.R.-P., M.A., M.A.-G., G.d.A., J.B., C.B., E.F., S.G.-R., J.M., G.d.P., E. Perez, E. Poch, J.M.P., D.R.-P., R.S.-V., F.S., A.T., A.M.-M., P.A., R.R., and J.C. drafted manuscript; A.C., M.L.A., C.L.R., P.B., L.C., A.G.-J., M.R.-P., M.A., M.A.-G., G.d.A.,

J.B., C.B., E.F., S.G.-R., J.M., G.d.P., E. Perez, E. Poch, J.M.P., D.R.-P., R.S.-V., F.S., A.T., A.M.-M., P.A., R.R., and J.C. edited and revised manuscript; A.C., M.L.A., C.L.R., P.B., L.C., A.G.-J., M.R.-P., M.A., M.A.-G., G.d.A., J.B., C.B., E.F., S.G.-R., J.M., G.d.P., E. Perez, E. Poch, J.M.P., D.R.-P., R.S.-V., F.S., A.T., A.M.-M., P.A., R.R., and J.C. approved final version of manuscript.

## REFERENCES

- Amabile N, Guérin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, London GM, Tedgui A, Boulanger CM. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol* 16: 3381–3388, 2005. doi:10.1681/ASN.2005050535.
- Augustin HG, Koh GY, Thurston G, Alitalo K. Control of vascular morphogenesis and homeostasis through the angiotensin-Tie system. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 165–177, 2009. doi:10.1038/nrm2639.
- Belge KU, Dayyani F, Horelt A, Siedlar M, Frankenberger M, Frankenberger B, Espevik T, Ziegler-Heitbrock L. The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF. *J Immunol* 168: 3536–3542, 2002. doi:10.4049/jimmunol.168.7.3536.
- Berezin AE, Kremzer AA, Martovitskaya YV, Berezina TA, Gromenko EA. Pattern of endothelial progenitor cells and apoptotic endothelial cell-derived microparticles in chronic heart failure patients with preserved and reduced left ventricular ejection fraction. *EBioMedicine* 4: 86–94, 2016. doi:10.1016/j.ebiom.2016.01.018.
- Berezin AE, Kremzer AA, Martovitskaya YV, Samura TA, Berezina TA. Pattern of circulating endothelial-derived microparticles among chronic heart failure patients with dysmetabolic comorbidities: the impact of subclinical hypothyroidism. *Diabetes Metab Syndr* 10: 29–36, 2016. doi:10.1016/j.dsx.2015.08.001.
- Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 48: 180–186, 2006. doi:10.1161/01.HYP.0000231507.00962.b5.
- Bradshaw EM, Raddassi K, Elyaman W, Orban T, Gottlieb PA, Kent SC, Hafler DA. Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *J Immunol* 183: 4432–4439, 2009. doi:10.4049/jimmunol.0900576.
- Brocca A, Virzi GM, de Cal M, Cantaluppi V, Ronco C. Cytotoxic effects of p-cresol in renal epithelial tubular cells. *Blood Purif* 36: 219–225, 2013. doi:10.1159/000356370.
- Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H1910–H1915, 2004. doi:10.1152/ajpheart.01172.2003.
- Carracedo J, Merino A, Noguerras S, Carretero D, Berdud I, Ramirez R, Tetta C, Rodriguez M, Martín-Malo A, Aljama P. On-line hemodiafiltration reduces the proinflammatory CD14+CD16+ monocyte-derived dendritic cells: a prospective, crossover study. *J Am Soc Nephrol* 17: 2315–2321, 2006. doi:10.1681/ASN.2006020105.
- Chandler WL, Yeung W, Tait JF. A new microparticle size calibration standard for use in measuring smaller microparticles using a new flow cytometer. *J Thromb Haemost* 9: 1216–1224, 2011. doi:10.1111/j.1538-7836.2011.04283.x.
- Choi JS, Kwak KA, Park MJ, Kim YH, Gil HW, Song HY, Hong SY. Ratio of angiotensin-2 to angiotensin-1 predicts mortality in acute lung injury induced by paraquat. *Med Sci Monit* 19: 28–33, 2013. doi:10.12659/MSM.883730.
- Dane MJ, Khairoun M, Lee DH, van den Berg BM, Eskens BJ, Boels MG, van Teeffelen JW, Rops AL, van der Vlag J, van Zonneveld AJ, Reinders ME, Vink H, Rabelink TJ. Association of kidney function with changes in the endothelial surface layer. *Clin J Am Soc Nephrol* 9: 698–704, 2014. doi:10.2215/CJN.08160813.
- Desjardins L, Liabeuf S, Lenglet A, Lemke HD, Vanholder R, Choukroun G, Massy ZA; European Uremic Toxin (EUTox) Work Group. Association between free light chain levels, and disease progression and mortality in chronic kidney disease. *Toxins (Basel)* 5: 2058–2073, 2013. doi:10.3390/toxins5112058.
- Diamant M, Nieuwland R, Pablo RF, Sturk A, Smit JW, Radder JK. Elevated numbers of tissue-factor exposing microparticles correlate with components of the metabolic syndrome in uncomplicated type 2 diabetes mellitus. *Circulation* 106: 2442–2447, 2002. doi:10.1161/01.CIR.0000036596.59665.C6.
- Diamant M, Tushuizen ME, Sturk A, Nieuwland R. [Cellular microparticles and blood-vessel damage. II. Functional characteristics and clinical significance]. *Ned Tijdschr Geneesk* 148: 1380–1384, 2004.
- Feng B, Chen Y, Luo Y, Chen M, Li X, Ni Y. Circulating level of microparticles and their correlation with arterial elasticity and endothelium-dependent dilation in patients with type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis* 208: 264–269, 2010. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.06.037.
- Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* 340: 448–454, 1999. doi:10.1056/NEJM199902113400607.
- Garcia MJ, McNamara PM, Gordon T, Kannel WB. Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. Sixteen year follow-up study. *Diabetes* 23: 105–111, 1974. doi:10.2337/diab.23.2.105.
- Girndt M, Seibert E. Premature cardiovascular disease in chronic renal failure (CRF): a model for an advanced ageing process. *Exp Gerontol* 45: 797–800, 2010. doi:10.1016/j.exger.2010.04.003.
- Gupta J, Mitra N, Kanetsky PA, Devaney J, Wing MR, Reilly M, Shah VO, Balakrishnan VS, Guzman NJ, Girndt M, Periera BG, Feldman HI, Kusek JW, Joffe MM, Raj DS; CRIC Study Investigators. Association between albuminuria, kidney function, and inflammatory biomarker profile in CKD in CRIC. *Clin J Am Soc Nephrol* 7: 1938–1946, 2012. doi:10.2215/CJN.03500412.
- Heine GH, Ulrich C, Seibert E, Seiler S, Marell J, Reichart B, Krause M, Schlitt A, Köhler H, Girndt M. CD14(++)CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients. *Kidney Int* 73: 622–629, 2008. doi:10.1038/sj.ki.5002744.
- Horstman LL, Jy W, Jimenez JJ, Bidot C, Ahn YS. New horizons in the analysis of circulating cell-derived microparticles. *Keio J Med* 53: 210–230, 2004. doi:10.2302/kjm.53.210.
- Ioannidis I. Diabetes treatment in patients with renal disease: is the landscape clear enough? *World J Diabetes* 5: 651–658, 2014. doi:10.4239/wjdv5.i5.651.
- Key NS, Chantrathammachart P, Moody PW, Chang JY. Membrane microparticles in VTE and cancer. *Thromb Res* 125, Suppl 2: S80–S83, 2010. doi:10.1016/S0049-3848(10)70020-7.
- Kim SJ, Moon GJ, Cho YH, Kang HY, Hyung NK, Kim D, Lee JH, Nam JY, Bang OY. Circulating mesenchymal stem cells microparticles in patients with cerebrovascular disease. *PLoS One* 7: e37036, 2012. doi:10.1371/journal.pone.0037036.
- Koc M, Toprak A, Arkan H, Odabasi Z, Elbir Y, Tulunay A, Asioglu E, Eksioğlu-Demiralp E, Glorieux G, Vanholder R, Akoglu E. Toll-like receptor expression in monocytes in chronic kidney disease and haemodialysis: relation with inflammation. *Nephrol Dial Transplant* 26: 955–963, 2011. doi:10.1093/ndt/gfq500.
- Lawson C, Vicencio JM, Yellon DM, Davidson SM. Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease. *J Endocrinol* 228: R57–R71, 2016. doi:10.1530/JOE-15-0201.
- Levin A, Djurdjev O, Barrett B, Burgess E, Carlisle E, Ethier J, Jindal K, Mendelssohn D, Tobe S, Singer J, Thompson C. Cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease: getting to the heart of the matter. *Am J Kidney Dis* 38: 1398–1407, 2001. doi:10.1053/ajkd.2001.29275.
- Lim HS, Lip GY, Blann AD. Angiotensin-1 and angiotensin-2 in diabetes mellitus: relationship to VEGF, glycaemic control, endothelial damage/dysfunction and atherosclerosis. *Atherosclerosis* 180: 113–118, 2005. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2004.11.004.
- Lobb RJ, Becker M, Wen SW, Wong CS, Wiegmanns AP, Leimgruber A, Müller A. Optimized exosome isolation protocol for cell culture supernatant and human plasma. *J Extracell Vesicles* 4: 27031, 2015. doi:10.3402/jev.v4.27031.
- Maiwald S, Zwetsloot PP, Sivapalaratnam S, Dallinga-Thie GM. Monocyte gene expression and coronary artery disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16: 411–417, 2013.
- Mallat Z, Benamer H, Hugel B, Benessiano J, Steg PG, Freyssinet JM, Tedgui A. Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 101: 841–843, 2000. doi:10.1161/01.CIR.101.8.841.
- McKiernan J, Donovan MJ, O'Neill V, Bentink S, Noerholm M, Belzer S, Skog J, Kattan MW, Partin A, Andriole G, Brown G, Wei JT, Thompson IM Jr, Carroll P. A novel urine exosome gene expression assay to predict high-grade prostate cancer at initial biopsy. *JAMA Oncol* 2: 882–889, 2016. doi:10.1001/jamaoncol.2016.0097.

35. Meijers BK, Van Kerckhoven S, Verbeke K, Dehaen W, Vanrenterghem Y, Hoylaerts MF, Evenepoel P. The uremic retention solute p-cresyl sulfate and markers of endothelial damage. *Am J Kidney Dis* 54: 891–901, 2009. doi:10.1053/j.ajkd.2009.04.022.
36. Merino A, Portolés J, Selgas R, Ojeda R, Buendía P, Ocaña J, Bajo MA, del Peso G, Carracedo J, Ramírez R, Martín-Malo A, Aljama P. Effect of different dialysis modalities on microinflammatory status and endothelial damage. *Clin J Am Soc Nephrol* 5: 227–234, 2010. doi:10.2215/CJN.03260509.
37. Mohandas R, Segal MS. Endothelial progenitor cells and endothelial vesicles—what is the significance for patients with chronic kidney disease? *Blood Purif* 29: 158–162, 2010. doi:10.1159/000245643.
38. Moldovan L, Batte K, Wang Y, Wisler J, Piper M. Analyzing the circulating microRNAs in exosomes/extracellular vesicles from serum or plasma by qRT-PCR. *Methods Mol Biol* 1024: 129–145, 2013. doi:10.1007/978-1-62703-453-1\_10.
39. Morris ST, Jardine AG. The vascular endothelium in chronic renal failure. *J Nephrol* 13: 96–105, 2000.
40. Ong T, McClintock DE, Kallet RH, Ware LB, Matthey MA, Liu KD. Ratio of angiotensin-2 to angiotensin-1 as a predictor of mortality in acute lung injury patients. *Crit Care Med* 38: 1845–1851, 2010. doi:10.1097/CCM.0b013e3181eaa5bf.
41. Patiño R, Ibarra J, Rodríguez A, Yagüe MR, Pintor E, Fernandez-Cruz A, Figueredo A. Circulating monocytes in patients with diabetes mellitus, arterial disease, and increased CD14 expression. *Am J Cardiol* 85: 1288–1291, 2000. doi:10.1016/S0002-9149(00)00757-8.
42. Pawlak K, Mysliwiec M, Pawlak D. Endocan—the new endothelial activation marker independently associated with soluble endothelial adhesion molecules in uremic patients with cardiovascular disease. *Clin Biochem* 48: 425–430, 2015. doi:10.1016/j.clinbiochem.2015.01.006.
43. Ramírez R, Carracedo J, Merino A, Noguerras S, Alvarez-Lara MA, Rodríguez M, Martín-Malo A, Tetta C, Aljama P. Microinflammation induces endothelial damage in hemodialysis patients: the role of convective transport. *Kidney Int* 72: 108–113, 2007. doi:10.1038/sj.ki.5002250.
44. Ramírez R, Carracedo J, Noguerras S, Buendía P, Merino A, Cañadillas S, Rodríguez M, Tetta C, Martín-Malo A, Aljama P. Carbamylated darbepoetin derivative prevents endothelial progenitor cell damage with no effect on angiogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 47: 781–788, 2009. doi:10.1016/j.yjmcc.2009.09.005.
45. Ramírez R, Carracedo J, Soriano S, Jiménez R, Martín-Malo A, Rodríguez M, Blasco M, Aljama P. Stress-induced premature senescence in mononuclear cells from patients on long-term hemodialysis. *Am J Kidney Dis* 45: 353–359, 2005. doi:10.1053/j.ajkd.2004.10.022.
46. Robert S, Poncet P, Lacroix R, Arnaud L, Girardo L, Hanchard A, Sampol J, Dignat-George F. Standardization of platelet-derived micro-particle counting using calibrated beads and a Cytomics FCS00 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost* 7: 190–197, 2009. doi:10.1111/j.1538-7836.2008.03200.x.
47. Rogacev KS, Seiler S, Zawada AM, Reichart B, Herath E, Roth D, Ulrich C, Fliser D, Heine GH. CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease. *Eur Heart J* 32: 84–92, 2011. doi:10.1093/eurheartj/ehq371.
48. Soriano S, Carmona A, Triviño F, Rodríguez M, Alvarez-Benito M, Martín-Malo A, Alvarez-Lara MA, Ramírez R, Aljama P, Carracedo J. Endothelial damage and vascular calcification in patients with chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol* 307: F1302–F1311, 2014. doi:10.1152/ajprenal.00114.2014.
49. Souza AC, Yuen PS, Star RA. Microparticles: markers and mediators of sepsis-induced microvascular dysfunction, immunosuppression, and AKI. *Kidney Int* 87: 1100–1108, 2015. doi:10.1038/ki.2015.26.
50. Stępień E, Kablak-Ziembicka A, Czyż J, Przewlocki T, Małecki M. Microparticles, not only markers but also a therapeutic target in the early stage of diabetic retinopathy and vascular aging. *Expert Opin Ther Targets* 16: 677–688, 2012. doi:10.1517/14728222.2012.691471.
51. Ulrich C, Seibert E, Heine GH, Fliser D, Girndt M. Monocyte angiotensin converting enzyme expression may be associated with atherosclerosis rather than arteriosclerosis in hemodialysis patients. *Clin J Am Soc Nephrol* 6: 505–511, 2011. doi:10.2215/CJN.06870810.
52. Van Biesen W, De Bacquer D, Verbeke F, Delanghe J, Lameire N, Vanholder R. The glomerular filtration rate in an apparently healthy population and its relation with cardiovascular mortality during 10 years. *Eur Heart J* 28: 478–483, 2007. doi:10.1093/eurheartj/ehl455.
53. van der Pol E, Coumans F, Varga Z, Krumrey M, Nieuwland R. Innovation in detection of microparticles and exosomes. *J Thromb Haemost* 11, Suppl 1: 36–45, 2013. doi:10.1111/jth.12254.
54. Vanholder R, Massy Z, Argiles A, Spasovski G, Verbeke F, Lameire N; European Uremic Toxin Work Group. Chronic kidney disease as cause of cardiovascular morbidity and mortality. *Nephrol Dial Transplant* 20: 1048–1056, 2005. doi:10.1093/ndt/gfh813.
55. Wada T, Jesmin S, Gando S, Yanagida Y, Mizugaki A, Sultana SN, Zaedi S, Yokota H. Angiogenic factors and their soluble receptors predict organ dysfunction and mortality in post-cardiac arrest syndrome. *Crit Care* 16: R171, 2012. doi:10.1186/cc11648.
56. Wang Y, Beck W, Deppisch R, Marshall SM, Hoenich NA, Thompson MG. Differential effects of dialysis and ultrafiltrate from individuals with CKD, with or without diabetes, on platelet phosphatidylserine externalization. *Am J Physiol Renal Physiol* 294: F220–F228, 2008. doi:10.1152/ajprenal.00279.2007.
57. Wlter KW, Buzás EI, Bemis LT, Bora A, Lässer C, Lötvall J, Nolte-t Hoen EN, Piper MG, Sivaraman S, Skog J, Théry C, Wauben MH, Hochberg F. Standardization of sample collection, isolation and analysis methods in extracellular vesicle research. *J Extracell Vesicles* 2: 2, 2013. doi:10.3402/jev.v2i0.20360.
58. Yáñez-Mó M, Siljander PR, Andreu Z, Zavec AB, Borrás FE, Buzas EI, Buzas K, Casal E, Cappello F, Carvalho J, Colás E, Cordeiro-da Silva A, Fais S, Falcon-Perez JM, Ghorbali IM, Giebel B, Gimona M, Graner M, Gursel I, Gursel M, Heegaard NH, Hendrix A, Kierulff P, Kokubun K, Kosanovic M, Kralj-Iglic V, Krämer-Albers EM, Laitinen S, Lässer C, Lener T, Ligeti E, Liné A, Lippis G, Llorente A, Lötvall J, Manček-Keber M, Marcella A, Mittelbrunn M, Nazarenko I, Nolte-t Hoen EN, Nyman TA, O'Driscoll L, Oliván M, Oliveira C, Pällinger É, Del Portillo HA, Reventós J, Rigau M, Rohde E, Sammar M, Sánchez-Madrid F, Santarém N, Schallmoser K, Ostenfeld MS, Stoorvogel W, Stukelj R, Van der Grein SG, Vasconcelos MH, Wauben MH, De Wever O. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* 4: 27066, 2015. doi:10.3402/jev.v4.27066.
59. Yuana Y, Böing AN, Grootemaat AE, van der Pol E, Hau CM, Cizmar P, Buhr E, Sturk A, Nieuwland R. Handling and storage of human body fluids for analysis of extracellular vesicles. *J Extracell Vesicles* 4: 29260, 2015. doi:10.3402/jev.v4.29260.
60. Zawada AM, Rogacev KS, Rotter B, Winter P, Marell RR, Fliser D, Heine GH. SuperSAGE evidence for CD14++CD16+ monocytes as a third monocyte subset. *Blood* 118: e50–e61, 2011. doi:10.1182/blood-2011-01-326827.
61. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V, Hart DN, Leenen PJ, Liu YJ, MacPherson G, Randolph GJ, Scherberich J, Schmitz J, Shortman K, Sizzano S, Strobl H, Zembala M, Austyn JM, Lutz MB. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116: e74–e80, 2010. doi:10.1182/blood-2010-02-258558.

Downloaded from http://ajprenal.physiology.org/ by 10.220.32.246 on May 9, 2017







# CAPÍTULO III

---



### **III. Microvesicles Derived from Indoxyl Sulfate Treated Endothelial Cells Induce Endothelial Progenitor Cells Dysfunction.**





## Microvesicles Derived from Indoxyl Sulfate Treated Endothelial Cells Induce Endothelial Progenitor Cells Dysfunction

Andres Carmona<sup>1†</sup>, Fatima Guerrero<sup>1†\*</sup>, Paula Buendia<sup>1</sup>, Teresa Obrero<sup>1</sup>, Pedro Aljama<sup>1,2,3</sup> and Julia Carracedo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Maimonides Institute of Biomedical Research of Cordoba, Cordoba, Spain, <sup>2</sup>Department of Nephrology, Nephrology Service, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain, <sup>3</sup>RETICS Red Renal, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain, <sup>4</sup>Department of Animal Physiology II, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

John D. Imig,  
Medical College of Wisconsin,  
United States

#### Reviewed by:

Jane Fridmold,  
University of Louisville, United States  
Xueying Zhao,  
Morehouse School of Medicine,  
United States

#### \*Correspondence:

Fatima Guerrero  
fatima.guerrero@imibic.org

<sup>†</sup> These authors have contributed  
equally to this work.

#### Specialty section:

This article was submitted to  
Vascular Physiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

Received: 16 June 2017

Accepted: 22 August 2017

Published: 08 September 2017

#### Citation:

Carmona A, Guerrero F, Buendia P,  
Obrero T, Aljama P and Carracedo J  
(2017) Microvesicles Derived from  
Indoxyl Sulfate Treated Endothelial  
Cells Induce Endothelial Progenitor  
Cells Dysfunction.  
Front. Physiol. 8:666.  
doi: 10.3389/fphys.2017.00666

Cardiovascular disease is a major cause of mortality in chronic kidney disease patients. Indoxyl sulfate (IS) is a typical protein-bound uremic toxin that cannot be effectively cleared by conventional dialysis. Increased IS is associated with the progression of chronic kidney disease and development of cardiovascular disease. After endothelial activation by IS, cells release endothelial microvesicles (EMV) that can induce endothelial dysfunction. We developed an *in vitro* model of endothelial damage mediated by IS to evaluate the functional effect of EMV on the endothelial repair process developed by endothelial progenitor cells (EPCs). EMV derived from IS-treated endothelial cells were isolated by ultracentrifugation and characterized for miRNAs content. The effects of EMV on healthy EPCs in culture were studied. We observed that IS activates endothelial cells and the generated microvesicles (IsEMV) can modulate the classic endothelial roles of progenitor cells as colony forming units and form new vessels *in vitro*. Moreover, 23 miRNAs were contained in IsEMV including four (miR-181a-5p, miR-4454, miR-150-5p, and hsa-let-7i-5p) that were upregulated in IsEMV compared with control endothelial microvesicles. Other authors have found that miR-181a-5p, miR-4454, and miR-150-5p are involved in promoting inflammation, apoptosis, and cellular senescence. Interestingly, we observed an increase in NFκB and p53, and a decrease in IκBα in EPCs treated with IsEMV. Our data suggest that IS is capable of inducing endothelial vesiculation with different membrane characteristics, miRNAs and other molecules, which makes maintaining of vascular homeostasis of EPCs not fully functional. These specific characteristics of EMV could be used as novel biomarkers for diagnosis and prognosis of vascular disease.

**Keywords:** indoxyl sulfate, endothelial microvesicles, endothelial progenitor cells, endothelial dysfunction, miRNAs

## INTRODUCTION

Patients with chronic kidney disease (CKD) have a high incidence of cardiovascular disease (CVD). In fact, the mortality from CVD is very high in CKD patients even from the early stages of the disease when the patient does not present with symptoms (Foley et al., 1998; Wanner et al., 2016). Many uremic toxins are metabolites that bind to proteins (Ellis et al., 2016); in particular, indoxyl sulfate (IS), a protein-bound uremic toxin, is very difficult to remove by hemodialysis. Increased IS

has been associated with the progression of CKD and the development of CVD (Niwa et al., 1997; Adijiang et al., 2008).

High levels of IS affect endothelial cells (EC), increasing the expression of adhesion molecules (Tumur et al., 2010) and oxidative stress that leads to endothelial damage *in vitro* (Tumur and Niwa, 2009) and *in vivo* (Yu et al., 2011). In fact, endothelial damage is considered a determinant stage for the development of CVD (Yu et al., 2011). Thus, the detection of morphological or functional alterations of EC is essential for the early diagnosis and prophylactic intervention of vascular complications in patients with CKD. However, it is difficult to check the endothelium status because of its inaccessibility. In the last few years, it was shown that EC release microvesicles (EMV), with characteristics that reflect the state of the cell they originated from (Faure et al., 2006; Gaceb et al., 2014). EMV are a subtype of extracellular vesicles produced by EC whose essential role is to serve as a signaling system for the function and homeostasis of the vessel (Meziani et al., 2008). EMV are involved in physiological and pathological processes on target cells by binding to ligands, surface receptors, and/or membrane associated enzymes, releasing their contents directly into the cytoplasm (Colombo et al., 2014). To maintain vascular homeostasis, damaged EC are replaced by endothelial progenitors cells (EPCs), which circulate in a low percentage in peripheral blood (Urbich and Dimmeler, 2004). This repair mechanism requires an exquisitely regulated intracellular signaling network that maintains an efficient balance between endothelial damage and the release of EPCs. Previous studies showed, in both animal and human endothelial injury models (Ramirez et al., 2007; Noguera et al., 2008; Noci et al., 2015), a correlation between plasma levels of EMV and the activity of EPCs. We showed the development of severe vascular disease is associated with an increase in EMV that parallels the decrease in EPCs in patients with CKD (Soriano et al., 2014). Nevertheless, the factors involved are not known, and it is necessary to identify if uremic toxins, such as IS, could be involved in endothelial damage, releasing EMV that modulate endothelium repair.

Microvesicles (MV) can transfer proteins, cytokines, mRNAs, or miRNAs to target cells and influence their biological behavior (Hulsmans and Holvoet, 2013). miRNAs are highly conserved non-coding RNA molecules approximately 22 nucleotides long that exert post-transcriptional effects on gene expression. Importantly, MV represent major transport vehicles for miRNAs and their effects depend on the expression of the MV they are contained in (Cantaluppi et al., 2012; Diehl et al., 2012). miRNAs are highly expressed in EC, and recent data suggest that they regulate important aspects of vascular function. The objective of this study was to analyze, in an *in vitro* model, the effect of EMV derived from IS-treated human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) on the endothelial repair process developed by EPCs.

## MATERIALS AND METHODS

### Human Umbilical Vein Endothelial Cells Culture

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were obtained from Cell Systems (Clonetics, Solingen, Germany) and

cultured at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere in EC basal medium (EBM) plus endothelial cell-growth medium supplements (EGM, Cambrex Bioscience, Walkersville, MD) and 10% fetal bovine serum (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). HUVECs were used for experiments between passages four and nine. HUVECs at 80% confluence were incubated with or without indoxyl sulfate (IS) at 256 µg/ml for 24 h. After the incubation period, cells were characterized for flow cytometry and culture supernatants were used for isolation of EMV. We first established the experimental model using a concentration- and time-response curve.

### Expression of Endothelial Adhesion Molecules

Expression of ICAM-1, PECAM-1, VE-cadherin, and VCAM-1 were measured in HUVECs after 24 h of treatment with IS (256 µg/ml). Next, VE-cadherin (FITC rabbit anti human CD144, AbD Serotec, UK), PECAM-1 (PE-labeled monoclonal anti-CD31, Caltag Laboratories, Burlingame, CA, USA), ICAM-1 (PE mouse anti human CD54, Invitrogen), and VCAM-1 (PE Mouse Anti-Human CD106, BD Pharmingen) antibodies were used to assess the expression in the experimental conditions. HUVECs were incubated with the antibodies for 20 min in darkness at room temperature. Then, cells were washed with PBS and fixed with BD CellFIX (BD). HUVECs without antibody were used as a reference (negative control). Mean fluorescence intensity (MFI) of different antibodies was used to analyze the cytometer data.

### Endothelial Microvesicles Isolation

EMV from the culture medium of IS-treated and untreated HUVECs were isolated by ultracentrifugation. The media was centrifuged (Heraeus Labofuge 400R) at 409 g for 5 min at 4°C to remove any intact cells, followed by centrifugation at 789 g for 10 min at 4°C to remove cell debris. The media was then transferred to ultracentrifuge 25 × 89 mm polypropylene tubes (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) and centrifuged at 18,000 g for 90 min at 10°C in an Optima XPN-100 ultracentrifuge with 70Ti rotor (Beckman Coulter). The EMV were sedimented owing to relative centrifugal forces. The supernatant containing EMV-free media was removed and the pellets containing EMV were resuspended in PBS and quantified by flow cytometry (FC500 Series, Beckman Coulter). Absolute values of MV were calculated using the following formula: (MV counted × standard beads/ L)/ standard beads counted (FlowCount, Beckman Coulter). Results were expressed as the number of MV per microliter of culture medium. MV derived from IS-treated HUVECs were defined as indoxyl sulfate EMV (IsEMV).

### Endothelial Microvesicles Analysis by Flow Cytometry

After 24 h incubation with or without IS (256 µg/ml), culture supernatants were collected. EMV were isolated as previously described. The pellet was resuspended in PBS and 10 µl aliquots were incubated with annexin V, ICAM-1, PECAM-1, VE-cadherin, or VCAM-1 for 20 min with gentle regular shaking at room temperature. EMV were quantified by flow cytometry (FC 500 Series). Prior to the sample acquisition, the samples were subjected to a separate and combined labeling reaction using all reactive (monoclonal antibodies, Annexin V,

and the appropriate negative controls) to compensate for the fluorescence using compensation tools on the flow cytometer. In a previous study, we established a MV gate on the FC 500 cytometer using a blend of size-calibrated beads with diameters of 0.3, 0.5, and 1.0  $\mu\text{m}$  (Carmona et al., 2017). The upper and outer limits of the MV gate were established just above the size distribution of the 1- $\mu\text{m}$  beads in the forward (FSC-A) and side scatter (SSC-A) settings (log scale). The lower limit was the noise threshold of the instrument (SSC-A), limiting high background noise. The absolute number of MV was calculated as: (MV counted  $\times$  standard beads/L)/standard beads counted (FlowCount, Beckman Coulter). Each result (single value) was the average of five independent measurements of the same sample.

### Isolation of miRNAs and the Nanostring nCounter Assay

miRNAs from EMV were extracted using the ISOLATE II miRNA kit Phenol free (Bioline, London, UK) according to the manufacturer's protocol. The NanoString nCounter<sup>®</sup> platform was used to screen the expression levels of 800 miRNAs using pools with miRNAs purified from controls and IsEMV. A total of 100 ng miRNAs (or 3  $\mu\text{l}$ ) was used per sample and conditions were set according to the manufacturer's recommended protocol (NanoString Technologies; Seattle, WA, USA). The nSolver 2.6 software was used to analyze and normalize the raw data using the top 100 most abundant miRNAs in all samples.

### Endothelial Progenitor Cells Culture

All procedures performed were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee and conformed to the standards set by the latest revision of the *Declaration of Helsinki*. Informed consent was obtained from all individual participants included in the study. EPCs were obtained from human peripheral blood mononuclear cells from healthy donors by density gradient centrifugation (Lymphoprep, Axis-Shield PoC, Oslo, Norway) and grown in EC basal medium-2 supplemented with growth factors (EGM-2 Bullekit, Lonza, Allendale, NJ, USA) and 15% autologous plasma. Mononuclear cells were plated onto fibronectin (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) in coated, six-well plates at a density of  $5 \times 10^6$  cells/well and then incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 3 weeks. Four days later, cells in suspension were removed and fraction of attached cells was cultivated with EBM-2 supplemented with 15% autologous plasma. On 7th day of EPCs culture, 10<sup>4</sup> EMV or IsEMV (MV/ml) were added (Mezentsev et al., 2005). The medium and the two different stimuli were renewed every 2 days for 14 days. EPCs phenotype CD34+CD133+VEGFR2+ was verified with a cellular purity of >90%.

### Detection of Hydroethidine

Hydroethidine (HE) (Invitrogen) is oxidized by ROS to become ethidium, which emits red color, and was used to measure superoxide anion. HUVECs and EPCs were exposed to HE (2  $\mu\text{M}$ ) for 15 min at 37°C. Quantitative analysis was performed on a flow cytometer (FACSCalibur, BD).

### Apoptosis Quantification

The percentage apoptosis was measured by annexin V staining. HUVECs and EPCs were obtained by mechanical disruption and washed once with annexin V binding buffer (FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit I, BD). Cells were then resuspended in annexin V binding buffer and annexin V was added following the manufacturer's protocol. Negative tube controls contained annexin V binding buffer. Quantitative analysis was performed on a flow cytometer (FACSCalibur, BD).

### Angiogenesis Assay in Matrigel

To evaluate the effect of MV on EPCs, *in vitro* angiogenesis was evaluated using the Endothelial Tube Formation Assay Kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA). After of treatment with EMV or IsEMV, EPCs were obtained by mechanical disruption and seeded on semi-natural Matrigel. Briefly, 50  $\mu\text{l}$  of thawed gel solution was added to each well of a pre-chilled 96 well sterile plate. For the angiogenesis assay, a total of 2,500 cells/well were plated, of which 50% were EPCs obtained from MV treated cultures, and the remaining 50% were mature endothelial cells at low passage stages (3–4). Vascular endothelial growth factor (50 ng/ml) was administered in parallel as an internal positive control. After 4 h, photographs were taken with an optical inverted microscope (OPTIKA Microscopes, Ponteranica, BG, Italy), and an automated analysis was performed with the ImageJ software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Four parameters were taken for the quantification experiments (Total length, NB segments, Nb branches and Nb master junctions). Results were expressed as previously described by Izuta et al. (2009).

### EPCs Proliferation Activity

After of treatment with EMV or IsEMV, the number of EPCs colony forming units (CFUs), characterized by a cluster of cells surrounded by elongated spindled-shaped cells, were counted manually by visual inspection using an optical inverted microscope (OPTIKA Microscopes, Italy) in a minimum of 10 random high-power fields.

### Protein Expression Analysis by Western-Blot

Cellular extracts from EPCs were prepared according to standard protocols (Andrews and Faller, 1991). Protein concentration was determined by the Bradford method (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Cytoplasmic extracts (50  $\mu\text{g}$ ) or nuclear extracts (50  $\mu\text{g}$ ) were separated in a 4–20% Ready Gel Tris-HCl gel (Bio-Rad Laboratories), transferred onto nitrocellulose membranes in a semi-dry transfer system. The membrane was immediately placed into blocking buffer containing 5% nonfat milk and sequentially blotted against monoclonal primary antibodies (NF $\kappa$ B p65, I $\kappa$ B $\alpha$ , p53, and  $\beta$ -actin). All antibodies were from Cell Signaling (Boston, MA, USA) except  $\beta$ -actin (Santa Cruz, Dallas, TX, USA). Protein levels were quantified using the image analysis software Quantity One 4.4.0 (Bio-Rad Laboratories), using  $\beta$ -actin as a loading control.

**Statistical Analysis**

Data represent the mean ± SEM, and the analysis of variance (ANOVA) with a Bonferroni *post-hoc* correction was applied. Comparisons between paired or unpaired data were made by Student's *t*-test. If the normality or equal variance test was violated, a comparison was made using the non-parametric Mann-Whitney *U*-test. *P*-values of < 0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed with SPSS 18.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

**RESULTS**

**IS Activates EC**

We evaluated whether IS mediates oxidative stress in EC, analyzing its effect on reactive oxygen species (ROS) production by flow cytometry. After 24 h of treatment, we observed a significant increase in the MFI of HE in IS-treated HUVECs compared with controls (474.0 ± 1.6 vs. 445.3 ± 2.3; *p* = 0.004) (Figure 1A). Furthermore, we quantified the binding of EC with annexin V and observed a significant increase in IS-treated HUVECs compared with controls (382.3 ± 1.4 vs. 348.6 ± 4.3; *p* = 0.045) (Figure 1B).

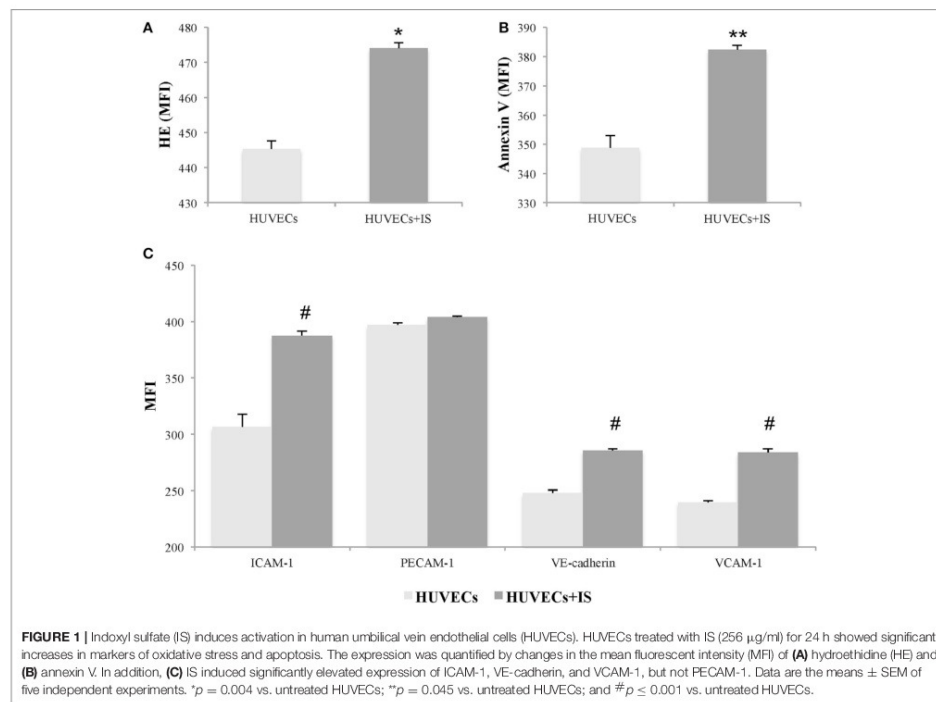
Moreover, we quantified the expression of adhesion molecules, indicative of endothelial activation, such as VCAM-1, ICAM-1, PECAM-1, and VE-cadherin. As shown in Figure 1C, IS induced increases in ICAM-1 (*p* < 0.001), VCAM-1 (*p* < 0.001), and VE-cadherin (*p* = 0.001) in HUVECs at 24 h. However, at 24 h of treatment with IS at 256 µg/ml, no changes were observed in the MFI of PECAM-1 compared with controls.

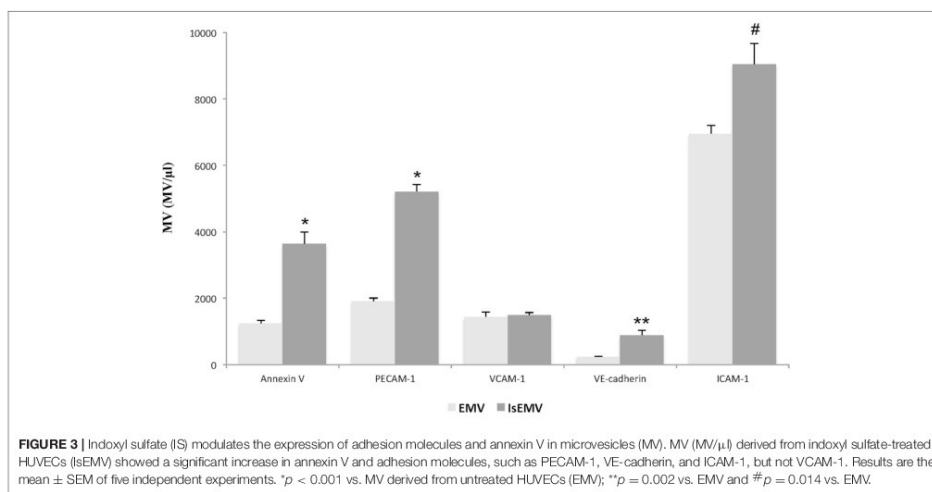
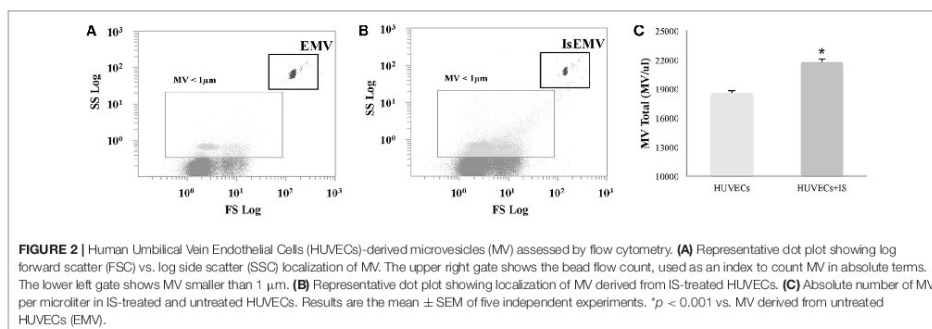
**Characterization of EMV Release by IS**

EMV release was related to endothelial activation. We observed elevated EMV release in IS-treated HUVECs (EMV/µl) compared with controls (21,741 ± 318 vs. 18,552 ± 285; *p* < 0.001) (Figures 2A–C). IS generated microvesicles (IsEMV) presented “endothelial-specific epitopes” such as ICAM-1, VCAM-1, PECAM-1, VE-cadherin, and annexin V. As shown in Figure 3, IsEMV induced increased levels of ICAM-1 (*p* = 0.014), PECAM-1 (*p* < 0.001), VE-cadherin (*p* = 0.002), and annexin V (*p* < 0.001). Although, VCAM-1 expression did not increase in IsEMV.

**Hierarchical Cluster Analysis of miRNAs**

The nCounter profiling identified 23 miRNAs with differential expression in IsEMV relative to EMV (Table 1). Specifically, four





overexpressed miRNAs (hsa-miR-4454+7975, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-181a-5p, and hsa-let-7i-5p) and 19 downregulated miRNAs (hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-1255b-5p, hsa-miR-379-5p, hsa-miR-1224-5p, hsa-miR-16-5p, hsa-miR-630, hsa-let-7b-5p, hsa-miR-1915-3p, hsa-miR-601, hsa-miR-4488, hsa-miR-126-3p, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-23a-3p, hsa-miR-575, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-100-5p, hsa-let-7g-5p, and hsa-miR-191-5p) were identified in IsEMV. Hierarchic clustering was performed based on the 23 differentially expressed miRNAs and displayed as a heat map (Figure 4).

### Effects of EMV on EPCs

After 14 days of treatment with EMV or IsEMV, oxidative stress and apoptosis were quantified in EPCs. As shown in Figures 5A–C, we observed a significant increase in

the MFI for HE in IsEMV-treated EPCs compared with controls ( $567.3 \pm 3.7$  vs.  $598.3 \pm 3.7$ ;  $p = 0.004$ ). Likewise, IsEMV induced a significant increase in the percentage of annexin V+ EPCs ( $37.3 \pm 3.7$  vs.  $42.1 \pm 1.4$ ;  $p = 0.045$ ) (Figures 5D–F).

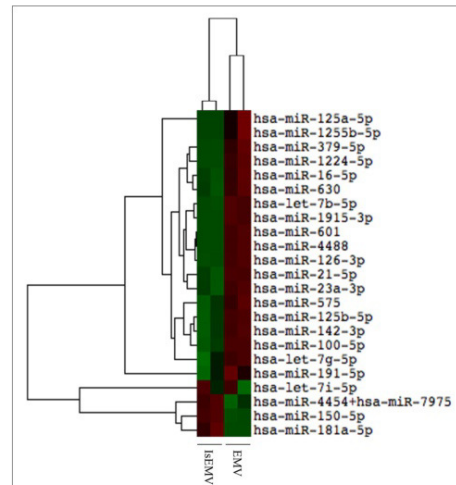
### IsEMV Modulate the *in vitro* Progression of EPCs Cultures

We observed that IsEMV are able to modulate the differentiation of EPCs *in vitro*. Mononuclear cells from healthy donors were seeded onto fibronectin-coated plates. After 7 days in culture, the cells in suspension were removed and the fraction of attached cells was treated with EMV or IsEMV at  $10^4$   $\text{MV}/\mu\text{l}$  for 14 days. As shown in Figures 6A,B the treatment with IsEMV significantly decreased the number of colony forming units

**TABLE 1 |** Differential expression of screened miRNAs in microvesicles.

Gene name	Fold change (IsEMV vs. EMV)	p-value	Regulation
hsa-miR-125a-5p	-1.17	0.21	Down
hsa-miR-1255b-5p	-1.17	0.21	Down
hsa-miR-379-5p	-1.51	0.11	Down
hsa-miR-1224-5p	-14.58	0.07	Down
hsa-miR-16-5p	-2.19	0.06	Down
hsa-miR-630	-1.61	0.03	Down
hsa-let-7b-5p	-2.15	0.002	Down
hsa-miR-1915-3p	-59.54	0.02	Down
hsa-miR-601	-43.98	0.03	Down
hsa-miR-4488	-27.15	0.03	Down
hsa-miR-126-3p	-2.81	0.02	Down
hsa-miR-21-5p	-7.51	0.05	Down
hsa-miR-23a-3p	-1.16	0.02	Down
hsa-miR-575	-15.07	0.03	Down
hsa-miR-125b-5p	-4.53	0.07	Down
hsa-miR-142-3p	-1.29	0.06	Down
hsa-miR-100-5p	-3.29	0.06	Down
hsa-let-7g-5p	-2.09	0.18	Down
hsa-miR-191-5p	-1.23	0.13	Down
hsa-let-7i-5p	1.16	0.71	Up
hsa-miR-4454+7975	2.39	0.07	Up
hsa-miR-150-5p	1.81	0.008	Up
hsa-miR-181a-5p	1.17	0.10	Up

Four miRNAs were overexpressed and 19 downregulated in microvesicles derived from IS-treated HUVECs (IsEMV) compared with microvesicles derived from untreated HUVECs (EMV). Each sample (n = 2) constitutes pooled cultured HUVECs cultures. miRNAs showing a fold change of at least 1.5 between IsEMV and EMV are represented. p < 0.05 indicates significant differences vs. EMV.



**FIGURE 4 |** Hierarchical cluster analysis of miRNAs in microvesicles (MV). Heat map of differentially expressed miRNAs in MV derived from IS-treated HUVECs (IsEMV) and from untreated HUVECs (EMV). Each sample (n = 2) constitutes pooled cultured HUVECs. Red indicates upregulated miRNA expression and green indicates downregulated miRNA expression.

(CFUs) in EPCs compared with controls (34.3 ± 2 vs. 22.3 ± 2.1 CFUs/field; p < 0.001).

**Anti-Angiogenic Effect of IsEMV on EPCs**

The ability of EMV to induce angiogenesis in EPCs was determined. As shown in Figure 6B, we observed that EPCs treated with IsEMV have a loss of angiogenesis; thus, EPCs developed a significantly lower number of vascular vessels in the 3D matrix. Values of different angiogenic parameters are shown in Table 2. Vascular endothelial growth factor (50 ng/ml) was used as an internal positive control (Data Supplementary Figure 1).

**IsEMV Modulated p53, NFκB, and IκBα in EPCs**

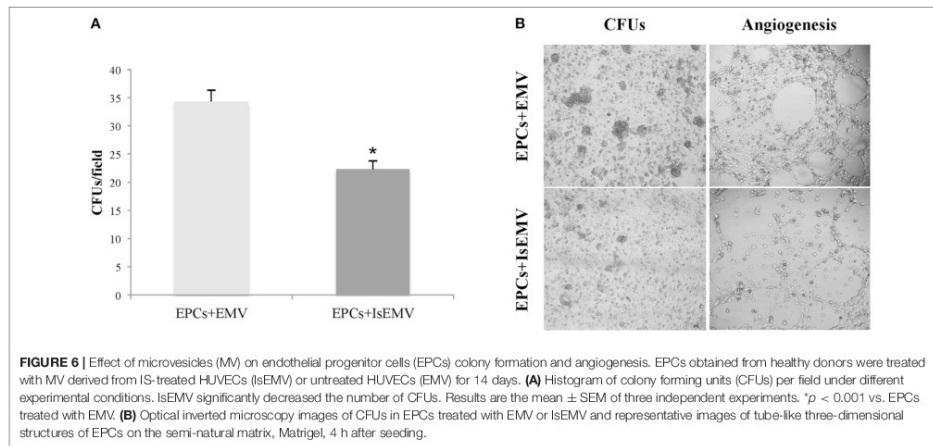
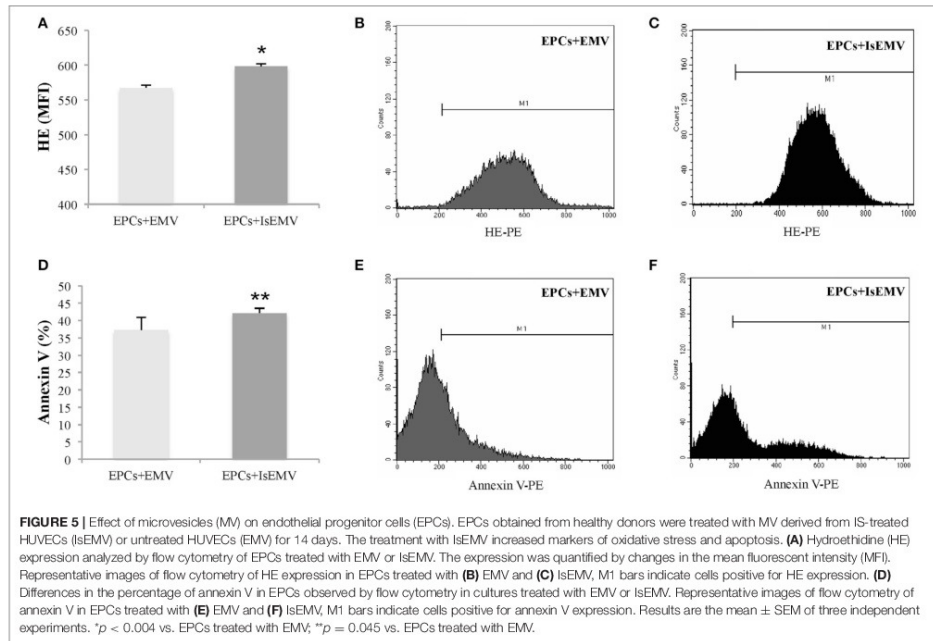
Immunoblot analysis of the expression of p53 protein, which regulates the cell cycle and apoptosis, is shown in Figure 7A. Protein expression of p53 in IsEMV-treated EPCs was significantly increased in comparison with the control group (p = 0.033). Control and EMV-treated EPCs showed normal expression of this protein. We also examined whether IsEMV treatment activated the NFκB pathway. Activation of

the NFκB pathway is usually marked by the phosphorylation and degradation of the NFκB inhibitory protein, IκBα, releasing NFκB and allowing its migration to the nucleus (Hinz and Scheidereit, 2014). We observed that after IsEMV treatment, IκBα levels decreased in the cytosolic fraction (p = 0.044) and NFκB levels increased in nuclear fraction (p = 0.022) when compared with EMV-treated EPCs (Figures 7B,C).

**DISCUSSION**

Indoxyl sulfate is a uremic toxin associated with CVD during the progression of CKD (Niwa, 2013; Dou et al., 2015). In our study, we have established a model of endothelial damage using doses of IS to induce an increase in EMV release (Data Supplementary Figure 2). We demonstrated that EMV are involved in altering the repair process of endothelium in patients with CKD. In culture, HUVECs can be activated by IS, serving as an effective model to study the mechanisms involved in the pathophysiology of endothelial damage associated with CKD. Different studies have shown that EC have increased oxidative stress in response to progressive concentrations of IS (Vanholder et al., 2003; Dou et al., 2004; Peng et al., 2012; Lee et al., 2015). In agreement with previous studies, we found, in response to IS, EC have increased release of ROS after 24 h in culture. Other authors observed, at concentrations of IS similar to those found in CKD, an increase in ROS at shorter incubation times than we used (Dou





et al., 2007; Tumur and Niwa, 2009). The increase in oxidative stress induced by IS and the associated release of ROS are related to activation of the EC. We observed an increase in membrane

proteins, such as VCAM-1, ICAM-1, and VE-cadherin, as a result of activation and cell adhesion. Similarly, others have described a modulation of adhesion molecules on EC by IS in CKD (Lee

**TABLE 2 |** Angiogenic parameters.

	Total length	Nb segments	Nb branches	Nb master junction
EPCs + EMV	15,607.5 ± 1,672.7	252 ± 43.6	66.7 ± 3.6	74.2 ± 10.7
EPCs + IsEMV	9,541 ± 541	101 ± 7.2	50 ± 4.1	26.5 ± 2.9
<i>p</i> -value	0.007	0.027	0.012	0.002

Tube formation was evaluated by measurement of total length, Nb segments, Nb branches, and Nb master junctions after treatment with microvesicles derived from untreated HUVECs (EMV) or microvesicles derived from IS-treated HUVECs (IsEMV). All analyzed angiogenic parameters had significant changes ( $p < 0.05$ ) vs. EPCs treated with EMV.

et al., 2012) and CVD (Tumur et al., 2010). Further, we found an increase in apoptosis in IS-treated HUVECs, indicating that IS has a direct deleterious effect on EC. These results are consistent with prior studies in HUVECs (Tumur and Niwa, 2009; Lee et al., 2012), and mesangial cells (Wang et al., 2014).

In response to endothelial activation by IS, cells are capable of releasing a higher number of EMV into the medium. Increased levels of circulating EMV have been observed in pathologies associated with endothelial dysfunction, such as antiphospholipid syndrome (Dignat-George et al., 2004) and CVD (Mallat et al., 2000; Boulanger et al., 2006). This is also reported in patients with CKD and hemodialysis (Faure et al., 2006), suggesting that an excessive endothelial vesiculation may be indicative of endothelial dysfunction in uremia. Moreover, there is evidence that uremic toxins are capable of producing vesiculation of EC in culture and may induce endothelial dysfunction *in vitro* (Faure et al., 2006; Meijers et al., 2009; Gao et al., 2015). We characterized IsEMV and found their membranes, not only share molecules with the cells they originated from, but their expression can be modulated in different ways in response to activation. In this regard, we observed an increase in markers of endothelial adhesion and annexin V-binding in both IS-treated HUVECs and IsEMV. However, VCAM-1 increased in EC in response to IS, but not to IsEMV. On the contrary, IsEMV had a greater increase in expression of PECAM-1 than IS-treated HUVECs. We believe that this differential expression of molecules in the membranes of EMV is not random, and may be associated with their functionality.

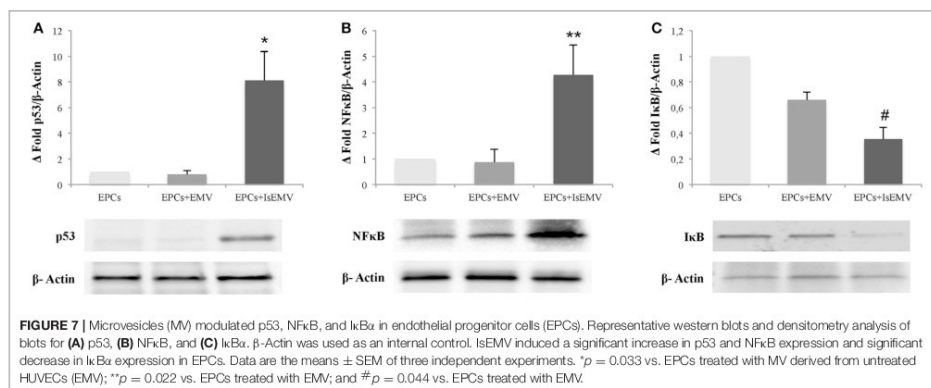
It is known that MV plays an important role as messengers for signaling and cell communication (Burger et al., 2013; Erdbrügger and Le, 2016). Therefore, they may carry activation and apoptosis signals from HUVECs and exert specific effects on them or on other cells (Schock et al., 2014). A function that has been ascribed to EMV is the ability to recruit and differentiate EPCs (Chironi et al., 2010). EPCs are bone marrow-derived precursors placed as crucial mediators of the endothelial repair. In previous studies, we established the EPCs phenotype as events that were triple positive for CD133, CD34 and VEGFR2 (Soriano et al., 2014; Luna et al., 2015). Cells expressing these three molecules are the most commonly reported as “classical” EPCs (Friedrich et al., 2006; Zampetaki et al., 2008), but the differential expression of these molecules has been linked to

different states of cellular differentiation as well as to the intensity of their repair capacity (Lanuti et al., 2016; Medina et al., 2017). Several studies reported that EPCs amount and functionality were decreased in patients with CKD reflecting a reduced capacity to repair the endothelium (Hill et al., 2003; Choi et al., 2004; Schmidt-Lucke et al., 2005; Soriano et al., 2014). Our study determined the functional changes on healthy EPCs in culture treated with EMV. Thus, we have shown that EPCs treated with IsEMV lose their angiogenic capacity, which is manifested by a decrease in vessel formation *in vitro*. Others have postulated that CKD patients with elevated IS levels may have altered angiogenesis (Hung et al., 2016). In the presence of IsEMV, EPCs reduced the formation of CFUs in a matrix of fibronectin after 21 days of culture. This led us to believe that IsEMV actively interfere in the endothelial repair process.

Furthermore, we observed an increase in NFκB and p53 expression in EPCs treated with IsEMV. It has been described that IS upregulated NFκB and p53 in cells of the proximal convoluted tubule, and NFκB acts by binding to the promoter region of p53 to regulate expression (Shimizu et al., 2010, 2011). This led us to think that IsEMV could act in a similar way. In addition, activation of the NFκB pathway is usually marked by the phosphorylation and degradation of the NFκB inhibitory protein, IκBα, releasing NFκB and allowing its migration to the nucleus (Hinz and Scheidereit, 2014). Accordingly, we observed that increased expression of NFκB is linked with a decrease in the expression of IκBα in EPCs treated with IsEMV.

This effect could be explained by analyzing the miRNAs content of EMV. Our results revealed there are 23 miRNAs in IsEMV and four (miR-181a-5p, miR-4454, miR-150-5p, and hsa-let-7i-5p) were upregulated in IsEMV compared with control EMV. A recent study reported links between miR-181a-5p, miR-4454, and NFκB signaling in cartilage degeneration associated with osteoarthritis (Nakamura et al., 2016). Moreover, 19 miRNAs were downregulated in IsEMV, such as miR-126-3p. This miR-126-3p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis (Schober et al., 2014); thus, its reduction could explain the limited functional capacity of EPCs (Massy et al., 2017). Moreover, previous studies described that miR-126-3p modulates the expression of NFκB in activated dendritic cells (Agudo et al., 2014) and p53 expression in a murine model of acute lymphoblastic leukemia (Nucera et al., 2016). To date, no study has identified the miRNAs in IsEMV. Our results suggest that miRNAs deregulation probably partly explains the effects of IsEMV on EPCs. Thus, miRNAs, such as miR-4454, miR-181a-5p, and miR-126-3p, could be involved in the increased expression of p53 and NFκB activation by inhibition of IκB. Further studies are required to identify and validate the miRNAs associated with endothelial dysfunction in uremia.

Our study has some limitations related to the instrumentation and protocols used for identifying and obtaining the EMV. The size detection limits of standard flow cytometry are well known, causing smaller MV to be overlooked. The upper size limit of MV detection is likely  $>1 \mu\text{m}$ , as a  $0.5 \mu\text{m}$  polystyrene bead reflects an MV around  $1 \mu\text{m}$  (Chandler et al., 2011; Carmona



et al., 2017). Consequently, the absolute MV count might be underrepresented. The detection of MV in suspension by flow cytometry has attracted strong clinical and scientific interest, but their detection is difficult because many MV are small (<400 nm), below the limit of resolution of most flow cytometers.

In conclusion, our results show for the first time that IS, a difficult to remove uremic toxin in patients with CKD, is capable of inducing endothelial vesiculation with different characteristics that makes MV potential candidates for studying novel biomarkers being a very useful as diagnostic and prognostic tools for vascular diseases. IsEMV have membrane characteristics, miRNAs, and other molecules that reduce the ability of EPCs to regenerate and participate in the signaling pathways involved in apoptosis and oxidative stress. These specific mechanisms may constitute therapeutic targets in patients with CKD.

#### AUTHOR CONTRIBUTIONS

AC, FG, PA, and JC participated in the conception and design of research; AC, FG, PB, and TO performed the experiments, acquired and analyzed data of work; AC, FG, PA, and JC performed interpretation of data; all authors drafted, edited and approved the final version of the manuscript. All authors agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved.

#### REFERENCES

Adijiang, A., Goto, S., Uramoto, S., Nishijima, F., and Niwa, T. (2008). Indoxyl sulphate promotes aortic calcification with expression of osteoblast-specific proteins in hypertensive rats. *Nephrol. Dial. Transplant.* 23, 1892–1901. doi: 10.1093/ndt/gfn861

Agudo, J., Ruza, A., Tung, N., Salmon, H., Leboeuf, M., Hashimoto, D., et al. (2014). The miR-126-VEGFR2 axis controls the innate response to pathogen-associated nucleic acids. *Nat. Immunol.* 15, 54–62. doi: 10.1038/ni.2767

#### FUNDING

This work was supported by Plan Nacional de I+D+i Proyectos de Investigación en Salud of Instituto de Salud Carlos III (ISCIII), Subdirección General de Evaluación, Fondos de desarrollo regional (FEDER, PI12/01489, PI15/01785); Junta de Andalucía grants (P11-CTS-7352).

#### ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to M. J. Jimenez for technical assistance.

#### SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2017.00666/full#supplementary-material>

**Data Supplementary Figure 1 |** Representative images of the formation of vessels in the *in vitro* angiogenesis assay on the semi-natural matrix, Matrigel, 4 h after seeding. (A) EPCs treated with EMV or (B) IsEMV, (C) Vascular endothelial growth factor (50 ng/ml) used as a positive control, and (D) Endothelial basal medium (EBM) without fetal bovine serum (FBS) used as a negative control.

**Data Supplementary Figure 2 |** Effect of various concentrations of IS (μg/ml) at different incubation times. Absolute number of MV per microliter in IS-treated and untreated HUVECs. (A) 6 h (B) 12 h, and (C) 24 h of incubation. Results are the mean ± SEM of five independent experiments. \**p* < 0.001 vs. untreated HUVECs; #*p* = 0.002 vs. HUVECs+IS [256].

Andrews, N. C., and Faller, D. V. (1991). A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 19:2499. doi: 10.1093/nar/19.9.2499

Boulanger, C. M., Amabile, N., and Tedgui, A. (2006). Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension* 48, 180–186. doi: 10.1161/01.HYP.0000231507.00962.b5

Burger, D., Schock, S., Thompson, C. S., Montezano, A. C., Hakim, A. M., and Touyz, R. M. (2013). Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin. Sci.* 124, 423–441. doi: 10.1042/CS20120309

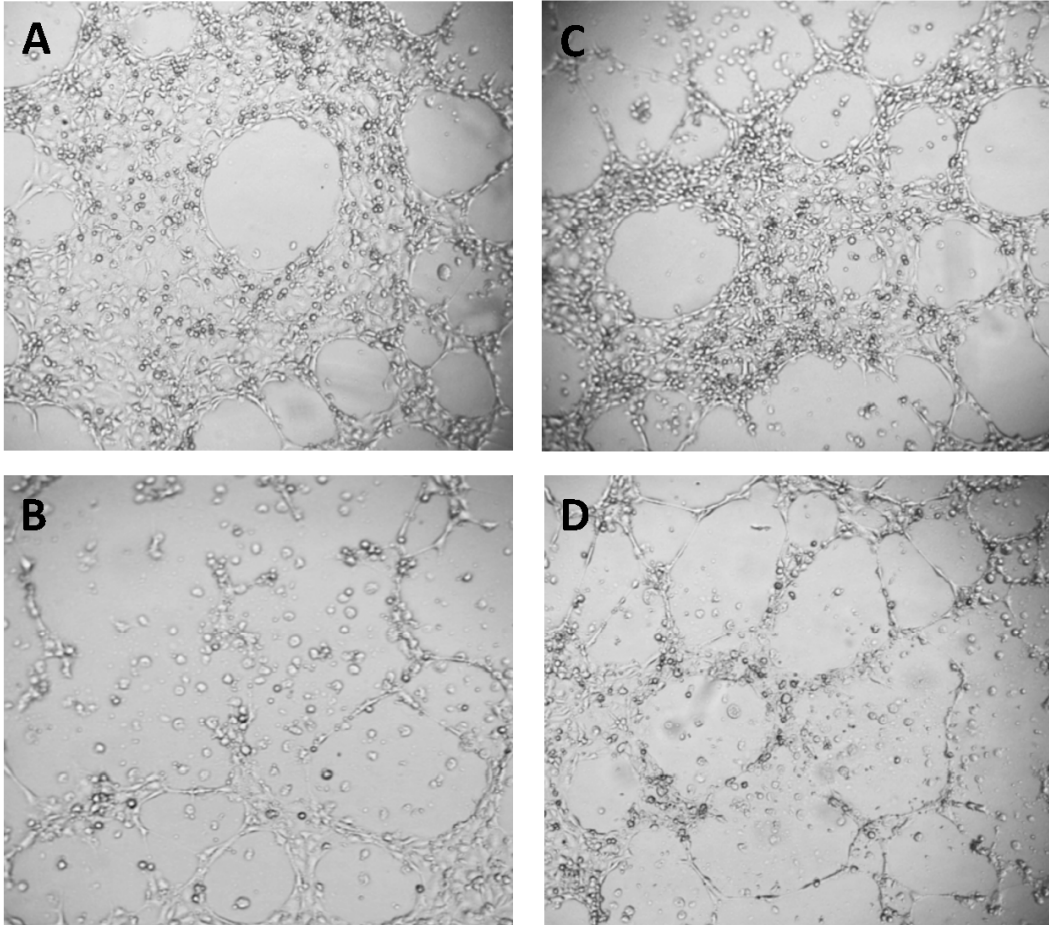
- Cantaluppi, V., Gatti, S., Medica, D., Figliolini, F., Bruno, S., Deregiibus, M., et al. (2012). Microvesicles derived from endothelial progenitor cells protect the kidney from ischemia-reperfusion injury by microRNA-dependent reprogramming of resident renal cells. *Kidney Int.* 82, 412–427. doi: 10.1038/ki.2012.105
- Carmona, A., Agüera, M. L., Luna-Ruiz, C., Buendia, P., Calleros, L., García-Jerez, A., et al. (2017). Markers of endothelial damage in patients with chronic kidney disease on hemodialysis. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 312, F673–F681. doi: 10.1152/ajprenal.00013.2016
- Chandler, W. L., Yeung, W., and Tait, J. F. (2011). A new microparticle size calibration standard for use in measuring smaller microparticles using a new flow cytometer. *J. Thromb. Haemost.* 9, 1216–1224. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04283.x
- Chironi, G. N., Simon, A., Boulanger, C. M., Dignat-George, F., Hugel, B., Megnien, J. L., et al. (2010). Circulating microparticles may influence early carotid artery remodeling. *J. Hypertens.* 28:789–796. doi: 10.1097/HJH.0b013e328335d0a8
- Choi, J. H., Kim, K. L., Huh, W., Kim, B., Byun, J., Suh, W., et al. (2004). Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 24:1246–1252. doi: 10.1161/01.ATV.0000133488.56221.4a
- Colombo, M., Raposo, G., and Théry, C. (2014). Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 30, 255–289. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326
- Diehl, P., Fricke, A., Sander, L., Stamm, J., Bassler, N., Htun, N., et al. (2012). Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovasc. Res.* 93, 633–644. doi: 10.1093/cvr/cvq007
- Dignat-George, F., Camoin-Jau, L., Sabatier, F., Arnoux, D., Anfosso, F., Bardin, N., et al. (2004). Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome. *Thromb. Haemost.* 91, 667–673. doi: 10.1160/TH03-07-0487
- Dou, L., Bertrand, E., Cerini, C., Faure, V., Sampol, J., Vanholder, R., et al. (2004). The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. *Kidney Int.* 65, 442–451. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00399.x
- Dou, L., Jourde-Chiche, N., Faure, V., Cerini, C., Berland, Y., Dignat-George, F., et al. (2007). The uremic solute indoxyl sulfate induces oxidative stress in endothelial cells. *J. Thromb. Haemost.* 5, 1302–1308. doi: 10.1111/j.1538-7836.2007.02540.x
- Dou, L., Sallée, M., Cerini, C., Poitevin, S., Gondouin, B., Jourde-Chiche, N., et al. (2015). The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid. *J. Am. Soc. Nephrol.* 26, 876–887. doi: 10.1681/ASN.2013121283
- Ellis, R. J., Small, D. M., Vesey, D. A., Johnson, D. W., Francis, R., Vitetta, L., et al. (2016). Indoxyl sulphate and kidney disease: causes, consequences and interventions. *Nephrology* 21, 170–177. doi: 10.1111/nep.12580
- Erdbrügger, U., and Le, T. H. (2016). Extracellular vesicles in renal diseases: more than novel biomarkers? *J. Am. Soc. Nephrol.* 27, 12–26. doi: 10.1681/ASN.2015010074
- Faure, V., Dou, L., Sabatier, F., Cerini, C., Sampol, J., Berland, Y., et al. (2006). Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J. Thromb. Haemost.* 4, 566–573. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01780.x
- Foley, R. N., Parfrey, P. S., and Sarnak, M. J. (1998). Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am. J. Kidney Dis.* 32(Suppl. 3), S112–S119. doi: 10.1053/ajkd.1998.v32.pm9820470
- Friedrich, E. B., Walenta, K., Scharlau, J., Nickenig, G., and Werner, N. (2006). CD34<sup>+</sup>/CD133<sup>+</sup>/VEGFR-2<sup>+</sup> endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities. *Circ. Res.* 98, e20–e25. doi: 10.1161/01.RES.0000205765.28940.93
- Gáceb, A., Martínez, M. C., and Andriantsitohaina, R. (2014). Extracellular vesicles: new players in cardiovascular diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 50, 24–28. doi: 10.1016/j.biocel.2014.01.018
- Gao, C., Ji, S., Dong, W., Qi, Y., Song, W., Cui, D., et al. (2015). Indolic uremic solutes enhance procoagulant activity of red blood cells through phosphatidylserine exposure and microparticle release. *Toxins* 7, 4390–4403. doi: 10.3390/toxins7114390
- Hill, J. M., Zalos, G., Halcox, J. P., Schenke, W. H., Waclawiw, M. A., Quyyumi, A. A., et al. (2003). Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N. Engl. J. Med.* 348, 593–600. doi: 10.1056/NEJMoa022287
- Hinz, M., and Scheidereit, C. (2014). The IκB kinase complex in NF-κB regulation and beyond. *EMBO Rep.* 15, 46–61. doi: 10.1002/embr.201337983
- Hulsmans, M., and Holvoet, P. (2013). “MicroRNA-containing microvesicles regulating inflammation in association with atherosclerotic disease.” *Cardiovasc. Res.* 100, 7–18. doi: 10.1093/cvr/cvt161
- Hung, S. C., Kuo, K. L., Huang, H. L., Lin, C. C., Tsai, T. H., Wang, C. H., et al. (2016). Indoxyl sulfate suppresses endothelial progenitor cell-mediated neovascularization. *Kidney Int.* 89, 574–585. doi: 10.1016/j.kint.2015.11.020
- Izuta, H., Shimazawa, M., Tsuruma, K., Araki, Y., Mishima, S., and Hara, H. (2009). Bee products prevent VEGF-induced angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. *BMC Complement. Altern. Med.* 9:45. doi: 10.1186/1472-6882-9-45
- Lanuti, P., Rotta, G., Almici, C., Avvisati, G., Budillon, A., Doretto, P., et al. (2016). Endothelial progenitor cells, defined by the simultaneous surface expression of VEGFR2 and CD133, are not detectable in healthy peripheral and cord blood. *Cytometry A* 89, 259–270. doi: 10.1002/cyto.a.22730
- Lee, C. T., Lee, Y. T., Ng, H. Y., Chiou, T. T., Cheng, C. I., Kuo, C. C., et al. (2012). Lack of modulatory effect of simvastatin on indoxyl sulfate-induced activation of cultured endothelial cells. *Life Sci.* 90, 47–53. doi: 10.1016/j.lfs.2011.10.014
- Lee, W. C., Li, L. C., Chen, J. B., and Chang, H. W. (2015). Indoxyl sulfate-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impaired biogenesis are partly protected by vitamin C and N-acetylcysteine. *Sci. World J.* 2015:620826. doi: 10.1155/2015/620826
- Luna, C., Carmona, A., Alique, M., Carracedo, J., and Ramirez, R. (2015). TNFα-Damaged-HUVECs microparticles modify endothelial progenitor cell functional activity. *Front. Physiol.* 6:395. doi: 10.3389/fphys.2015.00395
- Mallat, Z., Benamer, H., Hugel, B., Benessiano, J., Steg, P. G., Freyssinet, J. M., et al. (2000). Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes. *Circulation* 101, 841–843. doi: 10.1161/01.CIR.101.8.841
- Massy, Z. A. V., Metzinger-Le Meuth, V., and Metzinger, L. (2017). MicroRNAs are associated with uremic toxicity, cardiovascular calcification, and disease. *Contrib. Nephrol.* 189, 160–168. doi: 10.1159/000450774
- Medina, R. J., Barber, C. L., Sabatier, F., Dignat-George, F., Melero-Martin, J. M., Khosrotehrani, K., et al. (2017). Endothelial progenitors: a consensus statement on nomenclature. *Stem Cells Transl. Med.* 6, 1316–1320. doi: 10.1002/sctm.16-0360
- Meijers, B. K., Van Kerckhoven, S., Verbeke, K., Dehaen, W., Vanrenterghem, Y., Hoylaerts, M., et al. (2009). The uremic retention solute p-cresyl sulfate and markers of endothelial damage. *Am. J. Kidney Dis.* 54, 891–901. doi: 10.1053/ajkd.2009.04.022
- Mezentsev, A., Merks, R. M., O'Riordan, E., Chen, J., Mendeleev, N., Goligorsky, M. S., et al. (2005). Endothelial microparticles affect angiogenesis *in vitro*: role of oxidative stress. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289, H1106–H1114. doi: 10.1152/ajpheart.00265.2005
- Meziani, F., Tesse, A., and Andriantsitohaina, R. (2008). Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases. *Pharmacol. Rep.* 60, 75–84.
- Nakamura, A., Rampersaud, Y. R., Sharma, A., Lewis, S. J., Wu, B., Datta, P., et al. (2016). Identification of microRNA-181a-5p and microRNA-4454 as mediators of facet cartilage degeneration. *JCI Insight* 1:e86820. doi: 10.1172/jci.insight.86820
- Niwa, T. (2013). Removal of protein-bound uremic toxins by haemodialysis. *Blood Purif.* 35(Suppl. 2), 20–25. doi: 10.1159/000350843
- Niwa, T., Nomura, T., Sugiyama, S., Miyazaki, T., Tsukushi, S., and Tsutsui, S. (1997). The protein metabolite hypothesis, a model for the progression of renal failure: the oral adsorbent lowers indoxyl sulfate levels in predialyzed uremic patients. *Kidney Int. Suppl.* 62, S23–S28.
- Noci, M. V., Ramirez, R., Lluch, M., Rodriguez, M., and Carracedo, J. (2015). Changes in endothelial microparticles and endothelial progenitor cells in obese patients in response to surgical stress. *J. Bone Joint Surg. Am.* 97, 353–358. doi: 10.2106/JBJS.N.00570
- Nogueras, S., Merino, A., Ojeda, R., Carracedo, J., Rodriguez, M., Martin-Malo, A., et al. (2008). Coupling of endothelial injury and repair: an analysis using an *in*

- in vivo experimental model. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 294, H708–H713. doi: 10.1152/ajpheart.00466.2007
- Nucera, S., Giustacchini, A., Boccalatte, F., Calabria, A., Fanciullo, C., Plati, T., et al. (2016). miRNA-126 orchestrates an oncogenic program in B cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* 29, 905–921. doi: 10.1016/j.ccell.2016.05.007
- Peng, Y. S., Lin, Y. T., Chen, Y., Hung, K. Y., and Wang, S. M. (2012). Effects of indoxyl sulfate on adherens junctions of endothelial cells and the underlying signaling mechanism. *J. Cell. Biochem.* 113, 1034–1043. doi: 10.1002/jcb.23435
- Ramirez, R., Carracedo, J., Merino, A., Nogueras, S., Alvarez-Lara, M., A., Rodriguez, M., et al. (2007). Microinflammation induces endothelial damage in hemodialysis patients: the role of convective transport. *Kidney Int.* 72, 108–113. doi: 10.1038/sj.ki.5002250
- Schmidt-Lucke, C., Rössig, L., Lichtschner, S., Vasa, M., Britten, M., Kämper, U., et al. (2005). Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair. *Circulation* 111, 2981–2987. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.504340
- Schober, A., Nazari-Jahanigh, M., Wei, Y., Bidzhekov, K., Gremse, F., Grommes, J., et al. (2014). MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1. *Nat. Med.* 20, 368–376. doi: 10.1038/nm.3487
- Schock, S. C., Edrissi, H., Burger, D., Cadonic, R., Hakim, A., and Thompson, C. (2014). Microparticles generated during chronic cerebral ischemia deliver proapoptotic signals to cultured endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 450, 912–917. doi: 10.1016/j.bbrc.2014.06.096
- Shimizu, H., Bolati, D., Adijiang, A., Enomoto, A., Nishijima, F., Dateki, M., et al. (2010). Senescence and dysfunction of proximal tubular cells are associated with activated p53 expression by indoxyl sulfate. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 299, C1110–C1117. doi: 10.1152/ajpcell.00217.2010
- Shimizu, H., Bolati, D., Adijiang, A., Muteliefu, G., Enomoto, A., Nishijima, F., et al. (2011). NF- $\kappa$ B plays an important role in indoxyl sulfate-induced cellular senescence, fibrotic gene expression, and inhibition of proliferation in proximal tubular cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 301, C1201–C1212. doi: 10.1152/ajpcell.00471.2010
- Soriano, S., Carmona, A., Triviño, F., Rodríguez, M., Alvarez-Benito, M., Martín-Malo, A., et al. (2014). Endothelial damage and vascular calcification in patients with chronic kidney disease. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 307, F1302–F1311. doi: 10.1152/ajprenal.00114.2014
- Tumur, Z., and Niwa, T. (2009). Indoxyl sulfate inhibits nitric oxide production and cell viability by inducing oxidative stress in vascular endothelial cells. *Am. J. Nephrol.* 29, 551–557. doi: 10.1159/000191468
- Tumur, Z., Shimizu, H., Enomoto, A., Miyazaki, H., and Niwa, T. (2010). Indoxyl sulfate upregulates expression of ICAM-1 and MCP-1 by oxidative stress-induced NF- $\kappa$ B activation. *Am. J. Nephrol.* 31, 435–441. doi: 10.1159/000299798
- Urbich, C., and Dimmeler, S. (2004). Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ. Res.* 95, 343–353. doi: 10.1161/01.RES.0000137877.89448.78
- Vanholder, R., De Smet, R., Glorieux, G., Argilés, A., Baurmeister, U., Brunet, P., et al. (2003). Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability. *Kidney Int.* 63, 1934–1943. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00924.x
- Wang, W. J., Cheng, M. H., Sun, M. F., Hsu, S. F., and Weng, C. S. (2014). Indoxyl sulfate induces renin release and apoptosis of kidney mesangial cells. *J. Toxicol. Sci.* 39, 637–643. doi: 10.2131/jts.39.637
- Wanner, C., Amann, K., and Shoji, T. (2016). The heart and vascular system in dialysis. *Lancet* 388, 276–284. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30508-6
- Yu, M., Kim, Y. J., and Kang, D. H. (2011). Indoxyl sulfate-induced endothelial dysfunction in patients with chronic kidney disease via an induction of oxidative stress. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 6, 30–39. doi: 10.2215/CJN.05340610
- Zampetaki, A., Kirton, J. P., and Xu, Q. (2008). Vascular repair by endothelial progenitor cells. *Cardiovasc. Res.* 78, 413–421. doi: 10.1093/cvr/cvn081
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

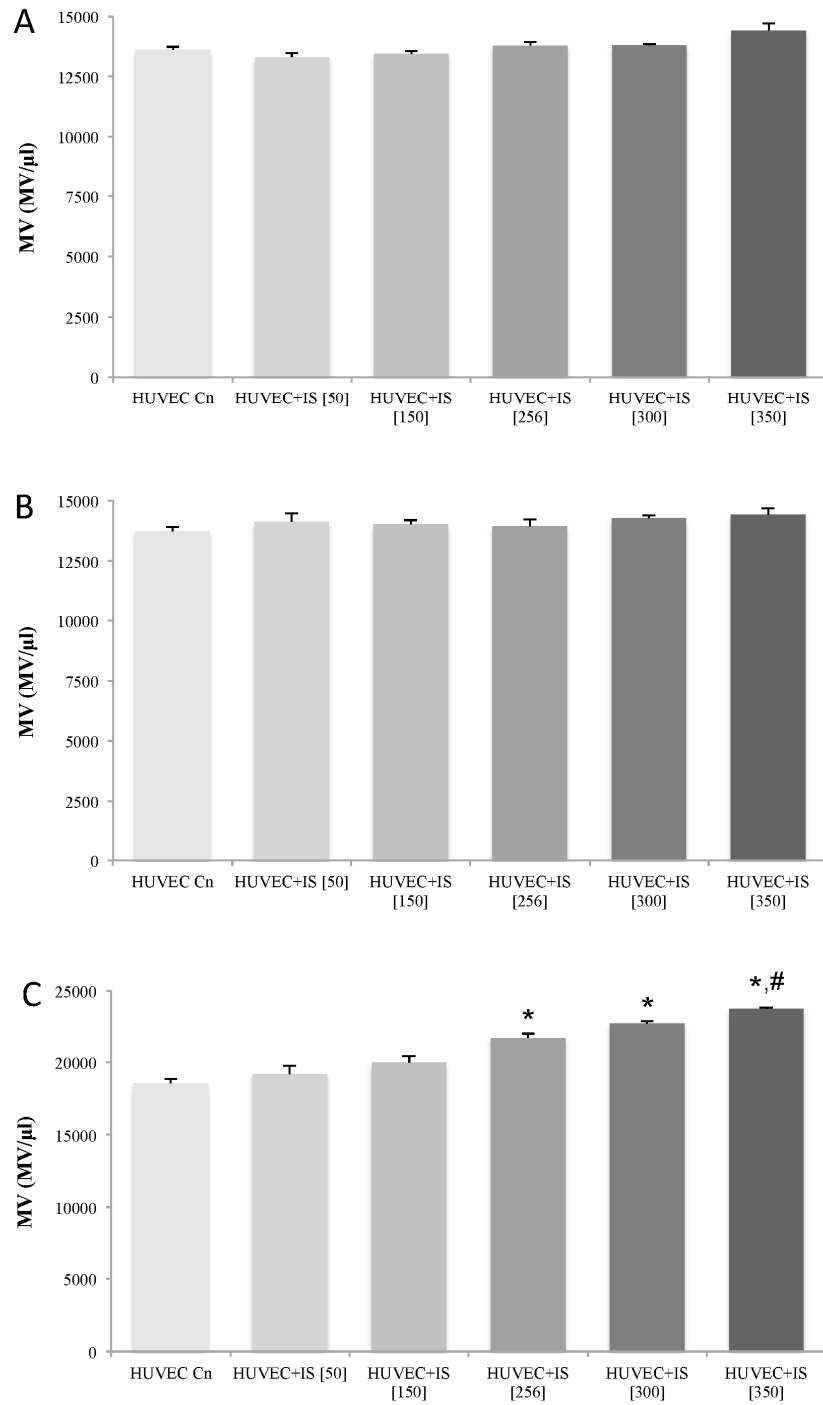
Copyright © 2017 Carmona, Guerrero, Buendia, Obrero, Aljama and Carracedo. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Supplementary Figure 1

**Angiogenesis *in vitro* assay**



Supplementary Figure 2















# DISCUSIÓN

---





### 1. Daño endotelial y calcificación vascular en pacientes con enfermedad renal crónica

La calcificación vascular (CV) es común en pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) y se ha relacionado con la morbilidad y mortalidad cardiovascular en la población general. Los estudios clínicos y traslacionales recientes demuestran que la CV también se asocia con morbilidad cardiovascular en el contexto de la ERC, y que una vez establecida, puede persistir incluso cuando se restablece la función renal. Así mismo, los pacientes con ERC tienen un número reducido y una función alterada de las células progenitoras endoteliales (EPC) y estas anomalías empeoran con el avance de la enfermedad. En nuestro estudio hemos observado que podría estar relacionado con un desbalance homeostático entre el daño y la reparación del endotelio vascular.

Hemos observado que la osteocalcina (OCN), una proteína procalcificante implicada en el proceso de osteogénesis, se expresa en EPC de pacientes con ERC que presentan CV. Además, en estos pacientes, los niveles de micropartículas endoteliales (MVE) aumentan. En estudios *in vitro*, las MVE derivadas de pacientes con ERC con CV tienen la capacidad de inducir la expresión de OCN en EPC de sujetos sanos y en líneas celulares derivadas de fibroblastos y células de músculo liso vascular.

Actualmente no existe ninguna terapia específica para tratar la CV, aunque hay muchos estudios encaminados a dilucidar los mecanismos implicados en este proceso (Shigematsu et al. 2017, Manivannan et al. 2016). La identificación de marcadores que nos permitan hacer un diagnóstico y evaluar la progresión de la CV sería un primer paso en el desarrollo de herramientas preventivas y terapéuticas para tratar el problema de la CV en pacientes con ERC.

Estudios previos han reportado que las MVE se encuentran elevadas en pacientes con ERC (Lu et al. 2015, Green et al. 2017, Faure et al. 2006)) y que poseen moléculas de membrana características de la célula endotelial tales como CD31 y fosfatidilserina, que se une a Anexina V. Además, estudios recientes muestran que las MVE de sujetos de edad avanzada pueden inducir CV (Alique et al. 2017). En este sentido, las MVE tienen actividad procoagulante, promueven la generación de trombina y median la progresión de la aterosclerosis (Horn et al. 2016).



Esto no significa que además, puedan existir otras microvesículas de otro origen celular que puedan estar involucradas en el proceso de CV. Otros autores han observado que un número elevado de MVE CD31+Anexina V+ refleja la lesión celular como un marcador que refleja la disfunción vascular en la enfermedad cardiovascular (Werner et al. 2006). En nuestro estudio, los pacientes con ERC con CV mostraron un mayor número de MVE que los pacientes sin CV.

Se han encontrado niveles más elevados de MVE circulantes en pacientes en hemodiálisis en comparación con pacientes que se encuentran en prediálisis, diálisis peritoneal o sujetos sanos (Green et al. 2017). El número de MVE en pacientes con ERC se puede modular mediante el tratamiento de la ERC (Merino et al. 2010). Sin embargo, hasta donde sabemos, el presente estudio ha mostrado por primera vez, una asociación entre el aumento de MVE y la presencia de CV en pacientes con ERC.

Los pacientes con ERC tienen un número reducido y una función alterada de las EPC circulantes en comparación con la población general, y esta anomalía empeora con el avance de la enfermedad (Krieter et al. 2010). Al igual que otros autores (Hill et al. 2003, Schmidt-Lucke et al. 2005), en nuestro estudio hemos observado un número reducido de EPC en pacientes con ERC y este se relaciona con una menor capacidad de regeneración vascular. Así mismo, esta alteración en la capacidad regeneradora de endotelio fue más acentuada en pacientes que presentaban mayor CV.

Existe una relación estrecha entre los niveles de EPC y la morbimortalidad por enfermedad cardiovascular (ECV) y estas células podrían ser útiles como nuevos biomarcadores para la predicción de eventos cardiovasculares (Bakogiannis et al. 2012, Hill et al. 2003). De hecho, los factores que están estrechamente relacionados con las enfermedades cardiovasculares, como la hipertensión arterial, diabetes mellitus y los niveles elevados de colesterol sérico, se han asociado con una disminución en el número de EPC y una menor capacidad regenerativa (Fadini, Agostini, and Avogaro 2005, Staude et al. 2013). Los pacientes con ERC presentan ECV graves que se asocia con una elevada morbimortalidad por una deficiencia en la capacidad de regeneración vascular debido a la reducción en el número de EPC y/o alteraciones en su funcionalidad (Herbrig et al. 2006, Ramirez et al. 2007, Morrone et al. 2017). En nuestro estudio, la proporción de sujetos hipertensos fue similar tanto en

pacientes con CV como en pacientes sin CV. Los eventos cardiovasculares fueron más prevalentes en los pacientes del grupo CV (42%) que en el grupo no CV (22%); sin embargo, dentro de cada grupo, no hubo asociación significativa entre el número y la actividad funcional de EPC o MVE y el número de eventos cardiovasculares. Por tanto, deducimos que en la ERC el riesgo aumentado de muerte por causa cardiovascular se relaciona con la aparición de CV. Con nuestro número limitado de pacientes, es difícil demostrar una asociación independiente de CV y eventos cardiovasculares con el número de MVE y el número y la actividad funcional de EPC. Aunque en estudios *in vitro*, otros autores han observado que las MVE producidas en un entorno inflamatorio o procedentes de pacientes con ERC promueven calcificación de células de músculo liso vascular (Buendía et al. 2015). Además, en otros estudios se ha descrito el papel de las microvesículas en la mineralización de las células del músculo liso vascular (Kapustin et al. 2011, Kapustin and Shanahan 2016)

Cada vez hay más pruebas que implican una conexión entre la remodelación vascular y los mecanismos del metabolismo óseo (Yang et al. 2017). Nosotros hemos observado que las EPC obtenidas de pacientes con CV pueden tener potencial osteogénico, ya que expresan OCN, que es un marcador de células osteoblásticas y aumenta en condiciones proinflamatorias (Zhang et al. 2015). Actualmente el papel de la expresión de OCN en EPC continúa siendo objeto de estudio. Recientemente, el aumento del recambio óseo se ha asociado con la CV y el aumento de la mortalidad de causa cardiovascular, y las EPC que expresan OCN son candidatos potenciales para establecer un vínculo entre el metabolismo óseo y el sistema vascular (Sambrook et al. 2006, Tondreau et al. 2005).

En pacientes con aterosclerosis coronaria, hay un aumento en la expresión de OCN en EPC (Gössl et al. 2008, Flammer et al. 2012). Además, las EPC que expresan OCN se han encontrado en mayor número en el tejido valvular aórtico calcificado (Gössl et al. 2012). En un estudio reciente se ha observado una fuerte correlación positiva entre el fenotipo OCN+ de EPC tempranas (CD34-CD133+VEGFR2+) con la reparación vascular, calcificación y el posterior desarrollo de aterosclerosis (Yang et al. 2017). En nuestro estudio, las EPC obtenidas de sujetos sanos expresaron OCN al ser tratadas con MV derivadas de pacientes con ERC. Este resultado refuerza el papel desempeñado por las MV en el desarrollo de la CV.

Además de las EPC, *in vitro*, las MV de pacientes con ERC que presentan CV tenían una capacidad notable para inducir la expresión de OCN en células de músculo liso vascular y fibroblastos.

Pensamos que las de EPC presentes en sangre periférica que expresan OCN podrían explicar, al menos en parte, por qué la "osificación" de las arterias puede tener lugar en cualquier momento y lugar. Como se ha descrito anteriormente, el daño endotelial da como resultado la liberación de MV, que circulan en la sangre periférica y ~~en~~ pueden llegar a la médula ósea, estimulando la producción de EPC implicadas en el proceso de reparación endotelial. En sujetos normales, existe un equilibrio entre las MVE y las EPC que es interrumpido cuando aparecen patologías como la ERC, en la que intervienen muchos factores urémicos que hace que se pierda esta homeostasis. En estos pacientes, este mecanismo de reparación endotelial es probablemente limitado y, en algún punto, el daño al endotelio es mucho mayor que la capacidad de la médula ósea para generar EPC, por lo que se activan mecanismos de reparación alternativos. En estas circunstancias, el organismo podría utilizar otros progenitores originalmente diseñados para reparar otros tipos de tejido, como el hueso, pero terminan reparando el endotelio vascular, produciendo así la CV.

Una limitación de nuestro estudio es la falta de información sobre los diferentes tipos de MV de diferente origen al endotelial. Se deberán realizar más estudios para definir el papel de estos otros tipos de MV en el desarrollo de CV. Somos conscientes de que la cantidad de MVE y sobre todo, de EPC que encontramos en sangre periférica en nuestro estudio fue muy baja. Para resolver este problema técnico, se cuantificaron una gran cantidad de eventos en el citómetro de flujo, con el objetivo de minimizar los posibles errores. También el número de pacientes de nuestro estudio fue limitado. Sin embargo, nuestros resultados obtenidos de experimentos *in vitro* corroboraron los hallazgos *in vivo*. Creemos que nuestros hallazgos pueden ayudar a comprender algunos de los procesos que tienen lugar en la vasculatura de pacientes con CV.

En nuestro estudio hemos demostrado como en pacientes con ERC con y sin CV existe un desequilibrio en el daño/reparación del endotelio vascular relacionado con un aumento de MVE y un descenso de los niveles de EPC. Las MVE que proceden de los pacientes ERC con CV expresan una molécula, OCN, relacionada

## *Discusión*

---

con el mecanismo de desarrollo osteogénico por EPC, fibroblastos y células de músculo liso vascular. También hemos demostrado que las EPC pueden participar directamente en el proceso de CV, ya que poseen características de células osteogénicas. De hecho, nuestros hallazgos pueden ayudar a entender por qué los pacientes con ERC presentan CV con mayor frecuencia que sujetos sin ERC. Nuestro estudio también ofrece potenciales nuevas herramientas de diagnóstico clínico, como el aumento del número de MVE apoptóticas, el bajo número de EPC y un alto porcentaje de células con características osteogénicas.

Los resultados también sugieren que las MVE podrían usarse como marcadores de CV, y su detección podría usarse para identificar pacientes con riesgo de ECV y/o para seguir el curso clínico de su enfermedad. Además, las MVE pueden servir como dianas terapéuticas para el control de la CV y la ECV asociada.

### **2. Marcadores de daño endotelial en pacientes con enfermedad renal crónica en hemodiálisis.**

El daño endotelial asociado a la inflamación crónica se ha propuesto como un factor de riesgo cardiovascular en pacientes con ERC en hemodiálisis (HD). En este estudio nos propusimos analizar algunos de los factores relacionados con dicho proceso, como son los niveles MVE circulantes en plasma, el porcentaje de monocitos asociados a ~~de~~ riesgo cardiovascular (CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup>), monocitos proinflamatorios (CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>) y ratio angiopoyetina 2/angiopoyetina 1 (Ang2/Ang1).

En este estudio hemos observado que en el plasma de pacientes con ERC en HD existen niveles elevados de MV, un mayor porcentaje de CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup> y de CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup>, y un mayor ratio Ang2/Ang1. Además dentro de estos pacientes, los que presentan diabetes mellitus (DM), tuvieron estos niveles más elevados de todos estos marcadores.

En este estudio multicéntrico, se asociaron los niveles de MV con la mortalidad de pacientes con ERC en HD con o sin DM durante 5,5 años de seguimiento. Así mismo, el aumento en el porcentaje de CD14<sup>+</sup>/CD16<sup>++</sup> fue proporcional al porcentaje de CD14<sup>++</sup>/CD16<sup>+</sup> y a los niveles de MV.

Los niveles de MV se encuentran más elevados en pacientes con ERC en HD en comparación con sujetos sanos (Mohandas and Segal 2010, Karpman, Ståhl, and Arvidsson 2017). Además, los niveles de MV también se encuentran aumentados en otras patologías tales como hipertensión (Schmidt, Manca, and Hoefler 2015), DM, aterosclerosis, y enfermedad de las arterias coronarias (Brodsky et al. 2004, Lawson et al. 2016), por lo que pueden considerarse como biomarcadores de enfermedades. En nuestro estudio hemos encontrado que, en pacientes con ERC en HD y con DM presentan niveles más elevados de MV que los pacientes no DM. Estos resultados nos pueden indicar que los pacientes en HD con DM tienen una mayor disfunción endotelial, haciendo por tanto que el nivel del MV posea un valor diagnóstico y terapéutico de la enfermedad.

En los últimos años se han asociado los niveles de MV CD31<sup>+</sup>/Anexina V<sup>+</sup> con el desarrollo y progreso de la ECV (Sinning et al. 2011, Jung et al. 2017,

Valencia-Nuñez et al. 2017). En este sentido, en nuestro estudio hemos encontrado una asociación entre los niveles de MV CD31+/Anexina V+ y la mortalidad en pacientes con ERC en HD. Además, hemos observado que cuando los niveles de MV CD31+/AnexinaV+ fueron superiores a 264 MV/ $\mu$ l, se encontró una menor supervivencia que cuando presentaron niveles de MV CD31+/Anexina+ inferior a 264 MV/ $\mu$ l.

En cuanto a la subpoblación de monocitos CD14+/CD16++, en estudios previos se ha reportado que los pacientes en HD presentan un elevado porcentaje de estas células (Ramírez et al. 2007, de Sequera et al. 2017) y este incremento está estrechamente relacionado con la etiopatogénesis de ECV asociada a ERC. Los monocitos CD14+/CD16++ secretan citoquinas proinflamatorias (Ramírez et al. 2005), y su aumento en sangre periférica está asociado a enfermedades crónicas y tienen una relación en el desarrollo de la diabetes mellitus (Patiño et al. 2000). En nuestro estudio, los pacientes con HD tenían un mayor porcentaje de monocitos CD14+/CD16++ que en sujetos sanos. Existen evidencias de que esta subpoblación de monocitos circulantes puede estar implicada en una enfermedad autoinmune como la con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) (Ren et al. 2017). También observamos un aumento de estos monocitos proinflamatorios en pacientes con HD con DM, cuyo porcentaje depende de si la es de DMT1 o diabetes mellitus de tipo 2 (DMT2). Encontramos que los pacientes con DMT1 tenían un mayor porcentaje de monocitos CD14+/CD16++ que aquellos que presentan DMT2.

Muchos autores han demostrado que los pacientes que se encuentran en HD presentan elevado porcentaje de monocitos CD14++CD16+ que podrían predecir riesgo cardiovascular en comparación con sujetos sanos (Maiwald et al. 2013). Nosotros también hemos encontrado que los pacientes en HD con DM presentan un mayor porcentaje de monocitos CD14++/CD16+ que los pacientes en HD sin DM, lo cual puede ser indicativo de que los pacientes con DM presentan un mayor riesgo de desarrollar ECV.

El desequilibrio en los niveles de Ang 1 y Ang 2 está relacionado con DM, ECV y tumorigénesis (Isidori, Venneri, and Fiore 2016, Dane et al. 2014, Engin et al. 2012)). En cuanto al ratio Ang2/Ang1 podría ser un marcador temprano de disfunción endotelial (Choi et al. 2013). En nuestro estudio, los pacientes con HD

experimentaron un desequilibrio en los niveles de angiopoyetinas. Además, el ratio Ang2/Ang1 aumentó en pacientes con DM en comparación con sujetos sanos. Sin embargo, estos valores no tuvieron un valor predictivo con respecto a la mortalidad.

Como hemos comentado, nuestro estudio mostró que el porcentaje de monocitos CD14+/CD16++ y CD14+/CD16+ aumentó significativamente en pacientes con HD. Ambas subpoblaciones de monocitos se correlacionaron positivamente, y es posible que ambos tengan funciones importantes en la inflamación y en el desarrollo de ECV como ya postularon algunos autores (Stansfield and Ingram 2015). Sin embargo, esta asociación no fue significativa en los pacientes en HD que presentan DM, si bien parecía tener una cierta tendencia relativa pero, no podemos explicar esta correlación dispar. En este sentido, futuros estudios deberían establecer qué ocurre en pacientes con DM y qué mecanismos pueden estar implicados en los cambios de las subpoblaciones de monocitos.

Una de las mayores limitaciones de nuestro estudio fue la elevada mortalidad por ECV que presentan los pacientes con ERC en HD ya que se trata de pacientes de edad avanzada (>50 años) por lo que muchos de los pacientes se perdieron durante los 5,5 años de seguimiento. Además, pese a ser un estudio multicéntrico se hicieron las determinaciones en una muestra relativamente pequeña por lo que se requieren estudios prospectivos mucho más amplios. Sería de sumo interés estudiar pacientes con una edad menos avanzada que presenten ERC, lo que nos podría ayudar a dilucidar biomarcadores tempranos de la patología.

El método de citometría de flujo presentado aquí solo permite el análisis de MV por encima del umbral de detección del equipo, y potencialmente excluye partículas más pequeñas por debajo de este umbral (<400nm) (Nielsen et al. 2014). Los protocolos de aislamiento, purificación, identificación y conservación para MV han avanzado significativamente (Hromada et al. 2017). También creemos que la población de MV podría estar contaminada con MV de otros orígenes, como las MV de plaquetas. Además, la unión de anexina V por medio de MV es un proceso dependiente de calcio, y este marcador tiene un valor limitado para evaluar MV apoptóticas. Sin embargo, la anexina V + MV sigue siendo un biomarcador bien estudiado de las MV derivadas del proceso de apoptosis en sangre periférica en individuos sanos y pacientes con HD (Berezin et al. 2016).

Actualmente no existe un consenso para detectar y preservar MV y ningún método utilizado hasta ahora puede caracterizarlas completamente. En este sentido para complementar la caracterización vesicular realizada citometría de flujo se utilizan otros métodos (análisis de seguimiento de nanopartículas, microscopía electrónica, detección de pulso resistivo) (van der Pol et al. 2014, Maas et al. 2015).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio pueden tener gran relevancia en múltiples áreas de la biomedicina que estudian enfermedades crónicas puesto que las MV, las subpoblaciones de monocitos y las Ang2, Ang1 pueden ser biomarcadores para diagnosticar y pronosticar el desarrollo de ECV y para ayudar a diseñar nuevas dianas farmacológicas. Así mismo muchos estudios recientes incluyen MV de origen plaquetario, monocitario y leucocitario (Paudel, Panth, and Kim 2016), por lo que en futuros estudios analizaremos este tipo de MV que nos darán más información acerca de la ECV, y concretamente, en pacientes con ERC en HD.

Por tanto, los pacientes con ERC en HD presentan un estado microinflamatorio crónico que desencadena un daño endotelial y ECV que podría detectarse precozmente cuantificando biomarcadores en sangre periférica, entre los que destacan las MV (0.4-1  $\mu\text{m}$ ).



### **3. Las microvesículas derivadas de las células endoteliales tratadas con indoxyl sulfato (IS) inducen disfunción de las células progenitoras endoteliales.**

En los pacientes con ERC, el endotelio vascular se encuentra en contacto continuo con toxinas urémicas que circulan en la sangre. IS es una toxina urémica unida a proteína que ofrece una gran dificultad para ser eliminada por las técnicas convencionales de diálisis, por lo que se acumula en sangre en pacientes con ERC (Kamiński et al. 2017). Su incremento se asocia a la ECV, porque puede producir disfunción endotelial (Niwa 2013, Dou et al. 2015) y una subsiguiente liberación de microvesículas endoteliales (MVE). En un intento de simular una situación clínica similar a la de los pacientes con ERC, en nuestro estudio *in vitro* hemos elegido la concentración de IS máxima reportada en uremia (Vanholder et al. 2003), en la que observamos un aumento significativo en la liberación de MVE y demostramos que las MVE producidas pueden alterar el proceso de reparación endotelial. De este modo, hemos establecido un modelo eficaz para el estudio de los mecanismos implicados en la fisiopatología del daño endotelial asociado con la ERC.

Actualmente la disfunción endotelial se considera como una de las primeras manifestaciones de ECV. El IS induce un incremento de estrés oxidativo en las CE que podría estar implicado en el desarrollo de ECV en pacientes urémicos. Un exceso de ROS puede conducir a estrés oxidativo y desencadenar daño a nivel endotelial (Ellis RJ et al, 2016). Varios autores han observado que las CE presentan un aumento de estrés oxidativo (Vanholder et al. 2003, Lee et al. 2015, Dou et al. 2004, Peng et al. 2012) y de moléculas de adhesión (Tumur and Niwa 2009) (Lee et al. 2012) en respuesta a diferentes dosis de IS. De la misma manera, en nuestro estudio valoramos el daño endotelial inducido por IS en CE después de 24 horas en cultivo y observamos un aumento en la liberación de ROS, en el porcentaje de Anexina V y en la expresión de moléculas como VCAM-1, ICAM-1 y VE-cadherina en HUVEC estimuladas con IS. En este sentido, nuestros resultados muestran que IS induce activación de la célula endotelial *in vitro*.

Por otro lado, en respuesta a la activación endotelial producida por IS, las CE liberan mayor cantidad de MVE que en condiciones basales, lo que sugiere que en respuesta a esta activación, las CE son capaces de liberar más MVE como resultado del daño causado por IS. De manera similar a lo observado por nosotros, otros autores

han encontrado que existe un incremento en los niveles de MVE circulantes en diferentes patologías asociadas a disfunción endotelial como el síndrome antifosfolípido (Dignat-George et al. 2004), ECV (Mallat et al. 2000, Boulanger, Amabile, and Tedgui 2006). También se ha observado este incremento de MVE en ERC y hemodiálisis (Faure et al. 2006), y se ha sugerido que este incremento de vesiculación endotelial podría ser indicativo de una disfunción endotelial consecuencia de la uremia. En relación con estos estudios, hemos observado un aumento en la liberación de MVE en nuestro modelo de daño endotelial inducido por IS.

En el estudio de caracterización de las MVE producidas en HUVEC al ser estimuladas con IS (IsMVE), hemos encontrado que en su membrana no sólo poseen moléculas de la célula de origen, la CE, y que previamente han sido identificadas por otros autores (Gaceb, Martinez, and Andriantsitohaina 2014, Faure et al. 2006), sino que su expresión podría ser modulada de forma diferencial ante un estímulo como el IS. En este sentido se observó en HUVEC tratadas con IS y en IsMVE un incremento de Anexina V y también en los marcadores de adhesión endotelial analizados (ICAM-1, PECAM-1, VE-cadherina, VCAM-1). Creemos que esta expresión diferencial de moléculas en la membrana de las MVE no es aleatoria, y puede estar asociada con su función de señalización. En efecto, las MVE expresan características propias de las células de origen y su función principal es servir de sistema de señalización entre los elementos implicados en la función y la homeostasis vascular (Meziani, Tesse, and Andriantsitohaina 2008, Burger et al. 2013, Erdbrügger and Le 2016).

Las EPC proceden de médula ósea y juegan un papel clave en la reparación y homeostasis endotelial (Asahara et al. 1997). Una función que se ha atribuido a las MVE es la capacidad de reclutar y diferenciar EPC (Chironi et al. 2010). En estudios previos, en pacientes con ERC, el aumento en la liberación de MVE se asocia con una disminución en el número de EPC circulantes lo que refleja una capacidad reducida para reparar el endotelio (Hill et al. 2003, Choi et al. 2004) (Schmidt-Lucke et al. 2005, Soriano et al. 2014).

Otros autores han postulado que los pacientes con ERC que presentan elevados niveles de IS pueden tener alterado el proceso de angiogénesis (Hung SC et al, 2017 (Hung et al. 2017, Lin et al. 2016). En nuestro estudio hemos observado que

las EPC tratadas con IsMVE reducen su capacidad para formar unidades formadoras de colonias (UFC) y su capacidad angiogénica *in vitro*. Esto nos llevó a pensar que las IsMVE podrían actuar activamente en el proceso de reparación endotelial.

Así mismo, hemos observado un aumento en la expresión de NFκB y p53 en EPC tratadas con IsMVE. Se ha postulado que IS regula positivamente a NFκB y p53 en células del túbulo contorneado proximal. Además, en otros estudios se ha observado que p53 está implicado en diversos procesos celulares que regulan el ciclo y la apoptosis celular, y que su expresión está regulada por el factor de transcripción NFκB (Shimizu et al. 2010, Shimizu et al. 2011) e intervienen gran cantidad de genes inflamatorios. NFκB se encuentra normalmente en el citoplasma en su forma inactiva formando un complejo con su proteína inhibidora, IκBα. Cuando se dan los estímulos apropiados, IκBα se fosforila, ubiquitina y degrada, activando a NFκB, que es trasladado al núcleo, donde induce su respuesta fisiológica (Hinz and Scheidereit 2014)). En nuestro trabajo, hemos observado que el aumento en la expresión NFκB (en el núcleo) está ligada a una disminución en la expresión de IκBα (en el citoplasma) en EPC tratadas con IsEMV. Esto nos llevó a pensar que IsEMV podría actuar de manera similar a como lo hace IS.

Analizando el contenido de miRNA hemos encontrado 23 miRNA en IsMVE que se encontraban expresados de forma diferencial a en comparación con MVE control. Cuatro de ellos (miR-181a-5p, miR-4454, miR-150-5p, y hsa-let-7i-5p), estaban “*upregulated*” en IsEMV. Recientemente han demostrado que existe relación entre miR-181a-5p, miR-4454, y NFκB en la degeneración del cartílago asociados con la osteoartritis (Nakamura et al., 2016 (Nakamura et al. 2016). Además, 19 miRNA están “*downregulated*” en IsMVE, como miR-126-3p. Este miR-126-3p promueve la proliferación endotelial y limita la aterosclerosis (Schober et al. 2014); por lo tanto, su reducción podría explicar la limitada capacidad funcional que presentan de las EPC (Massy et al., 2017 (Massy, Metzinger-Le Meuth, and Metzinger 2017). Estudios previos han descrito que miR-126-3p modula la expresión de NFκB en células dendríticas activadas (Agudo et al., 2014) y la expresión de p53 en un modelo murino de leucemia linfoblástica aguda (Nucera et al. 2016). Hasta la fecha, ningún estudio ha identificado los miRNA en IsMVE. Nuestros resultados sugieren que los miRNA “*downregulated*” podrían explicar en parte los efectos disfuncionales encontrados en EPC al ser tratadas con IsMVE. Por lo tanto, miRNA,

como miR-4454, miR-181a-5p, y miR-126-3p, podría estar involucrados en el aumento de la expresión de p53 y NFκB, y a su vez la activación de NFκB por la inhibición de IκB. Sin embargo, se requieren más estudios para identificar y validar los miRNA asociados a la disfunción endotelial inducida por uremia, y concretamente en aquellos que van a ser vehiculados en las MVE.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones que están relacionadas con la instrumentación y los protocolos utilizados para identificar y obtener las MVE. Un aspecto metodológico importante que debemos considerar en este estudio es que la mayoría de los citómetros de flujo tienen un umbral de detección  $>0.500\ \mu\text{m}$  (van der Pol E et al, 2010). Hay datos que sugieren que  $>80\%$  de las MV tienen un tamaño  $<0.500\ \mu\text{m}$  (Arraud et al. 2014). Por consiguiente, el recuento absoluto de MV por citometría de flujo podría estar infravalorado, haciendo que se pierda información sobre sus características que podrían ser valiosas a nivel clínico y científico.

En conclusión, nuestros resultados demuestran por primera vez que la IS, una toxina urémica difícil de eliminar en pacientes con ERC o incluso por técnicas de diálisis. IS es capaz de inducir vesiculación endotelial con diferentes características que hace que las MV sean nuevos biomarcadores muy útiles como herramientas diagnósticas y pronósticas para enfermedades vasculares. Las IsEMV tienen características de membrana, miRNA y otras moléculas que reducen la capacidad de EPC para regenerarse y participar en las vías de señalización implicadas en la apoptosis y el estrés oxidativo. Estos mecanismos específicos pueden constituir objetivos terapéuticos en pacientes con ERC y ayudar a diseñar nuevas técnicas de diálisis que ayuden a eliminarlas.





# CONCLUSIONES

---









### Capítulo I:

1.1 En los pacientes con ERC se produce un aumento de MVE CD31+Anexina V+, que es mayor en los que están diagnosticados de CV, lo cual puede ser relevante en la progresión de la patología vascular en estos pacientes

1.2 El aumento en las MVE CD31+Anexina V+ en pacientes con ERC, se asocia con una disminución en el número de EPC, lo que sugiere un desequilibrio entre los procesos de daño y reparación endotelial en pacientes con ERC, principalmente aquellos con CV.

1.3. En modelos *in vitro*, las MV de pacientes con ERC inducen la expresión de osteocalcina, una molécula procalcificante, en células de músculo liso vascular, fibroblastos y EPC.

1.4 Nuestros resultados sugieren que las EPC estimuladas con MV, pueden participar directamente en el proceso de CV a través de la expresión de OCN.

### Capítulo II:

2.1 En pacientes con ERC en hemodiálisis, hemos encontrado una asociación entre los niveles de MV CD31+Anexina V+ y la mortalidad. Así mismo, hemos observado que los pacientes con y sin DM presentan una mayor supervivencia cuando los niveles de MV son inferiores a 264 MV/ $\mu$ l.

2.2 Hemos observado un aumento en el porcentaje de monocitos proinflamatorios CD14+/CD16++ en los pacientes con ERC en hemodiálisis con DM, comparado con los pacientes sin DM.

2.3 De igual manera se ha observado un aumento en el porcentaje de monocitos de riesgo cardiovascular CD14++/CD16+ en pacientes ERC en hemodiálisis con DM en relación con los pacientes sin DM.

2.5 Así mismo ambas subpoblaciones de monocitos se encuentran aumentadas en pacientes con DM tipo I comparados con los pacientes que presentan DM tipo II.

2.4 El ratio Ang2/ang1, que es un marcador temprano de disfunción endotelial, está elevado en pacientes con ERC en hemodiálisis con DM. Sin embargo, no encontramos valores que puedan predecir la mortalidad.

2.5 Los niveles de MV, las subpoblaciones de monocitos y los factores angiogénicos en pacientes con ERC en HD, podrían ser de utilidad en el diagnóstico y en el pronóstico de la ECV frecuentemente asociada en estos pacientes

### Capítulo III:

3.1 Hemos establecido un modelo *in vitro* de daño endotelial inducido por indoxil sulfato, que promueve el aumento de estrés oxidativo, apoptosis y expresión de moléculas de adhesión endotelial en células endoteliales.

3.2 Las microvesículas derivadas de células endoteliales estimuladas con indoxil sulfato (IsEMV) interfieren en el proceso de reparación endotelial, reduciendo el número de unidades formadoras de colonias y la capacidad angiogénica de las células progenitoras de endotelio.

3.3 Los efectos de IsEMV sobre las células progenitoras de endotelio están mediados a través de la activación de rutas de inflamación, apoptosis y senescencia endotelial.

3.4 Las IsEMV tienen un contenido de miRNAs diferente a MVE. Estas diferencias podrían explicar en parte los efectos de las IsEMV sobre las EPC.

3.5 Además los miRNA como el miRNA-4454, miRNA 181a-5p y el miRNA-126-3p podrían estar involucrados en el incremento de expresión de p53 y en la activación de NFκB por inhibición de IκB.

3.6 Todo esto pone de manifiesto que las microvesículas son mucho más que un biomarcador y probablemente deben ser consideradas como diana terapéutica para prevenir el daño endotelial y la enfermedad vascular en la ERC.















# BIBLIOGRAFÍA

---







- Alberts, M., F. M. van Dissel-Emiliani, N. P. van Adrichem, M. van Wijnen, M. H. Wauben, T. A. Stout, and W. Stoorvogel. 2012. "Identification of distinct populations of prostasomes that differentially express prostate stem cell antigen, annexin A1, and GLIPR2 in humans." *Biol Reprod* 86 (3):82. doi: 10.1095/biolreprod.111.095760.
- Aatonen, M., M. Grönholm, and P. R. Siljander. 2012. "Platelet-derived microvesicles: multitasking participants in intercellular communication." *Semin Thromb Hemost* 38 (1):102-13. doi: 10.1055/s-0031-1300956.
- Abdelmouttaleb, I., N. Danchin, C. Ilardo, I. Aimone-Gastin, M. Angioi, A. Lozniewski, J. Loubinoux, A. Le Faou, and J. L. Guéant. 1999. "C-Reactive protein and coronary artery disease: additional evidence of the implication of an inflammatory process in acute coronary syndromes." *Am Heart J* 137 (2):346-51. doi: 10.1053/hj.1999.v137.92052.
- Abid Hussein, M. N., R. Nieuwland, C. M. Hau, L. M. Evers, E. W. Meesters, and A. Sturk. 2005. "Cell-derived microparticles contain caspase 3 in vitro and in vivo." *J Thromb Haemost* 3 (5):888-96. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01240.x.
- Alique, M., M. P. Ruíz-Torres, G. Bodega, M. V. Noci, N. Troyano, L. Bohórquez, C. Luna, R. Luque, A. Carmona, J. Carracedo, and R. Ramírez. 2017. "Microvesicles from the plasma of elderly subjects and from senescent endothelial cells promote vascular calcification." *Aging (Albany NY)* 9 (3):778-789. doi: 10.18632/aging.101191.
- Amabile, N., S. Cheng, J. M. Renard, M. G. Larson, A. Ghorbani, E. McCabe, G. Griffin, C. Guerin, J. E. Ho, S. Y. Shaw, K. S. Cohen, R. S. Vasani, A. Tedgui, C. M. Boulanger, and T. J. Wang. 2014. "Association of circulating endothelial microparticles with cardiometabolic risk factors in the Framingham Heart Study." *Eur Heart J* 35 (42):2972-9. doi: 10.1093/eurheartj/ehu153.
- Amabile, N., A. P. Guérin, A. Leroyer, Z. Mallat, C. Nguyen, J. Boddaert, G. M. London, A. Tedgui, and C. M. Boulanger. 2005. "Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure." *J Am Soc Nephrol* 16 (11):3381-8. doi: 10.1681/ASN.2005050535.
- Amabile, N., A. P. Guérin, A. Tedgui, C. M. Boulanger, and G. M. London. 2012. "Predictive value of circulating endothelial microparticles for cardiovascular mortality in end-stage renal failure: a pilot study." *Nephrol Dial Transplant* 27 (5):1873-80. doi: 10.1093/ndt/gfr573.
- Amabile, N., C. Heiss, W. M. Real, P. Minasi, D. McGlothlin, E. J. Rame, W. Grossman, T. De Marco, and Y. Yeghiazarians. 2008. "Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension." *Am J Respir Crit Care Med* 177 (11):1268-75. doi: 10.1164/rccm.200710-1458OC.
- Ando, M., A. Iwata, Y. Ozeki, K. Tsuchiya, T. Akiba, and H. Nihei. 2002. "Circulating platelet-derived microparticles with procoagulant activity may be a potential cause of thrombosis in uremic patients." *Kidney Int* 62 (5):1757-63. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00627.x.
- Aronson, D., P. Bartha, O. Zinder, A. Kerner, W. Markiewicz, O. Avizohar, G. J. Brook, and Y. Levy. 2004. "Obesity is the major determinant of elevated C-reactive protein in subjects with the metabolic syndrome." *Int J Obes Relat Metab Disord* 28 (5):674-9. doi: 10.1038/sj.ijo.0802609.
- Arraud, N., R. Linares, S. Tan, C. Gounou, J. M. Pasquet, S. Mornet, and A. R. Brisson. 2014. "Extracellular vesicles from blood plasma: determination of their morphology, size, phenotype and concentration." *J Thromb Haemost* 12 (5):614-27. doi: 10.1111/jth.12554.

Asahara, T., T. Murohara, A. Sullivan, M. Silver, R. van der Zee, T. Li, B. Witzenbichler, G. Schatteman, and J. M. Isner. 1997. "Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis." *Science* 275 (5302):964-7.

Asahara, T., T. Takahashi, H. Masuda, C. Kalka, D. Chen, H. Iwaguro, Y. Inai, M. Silver, and J. M. Isner. 1999. "VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells." *EMBO J* 18 (14):3964-72. doi: 10.1093/emboj/18.14.3964.

Auffray, C., M. H. Sieweke, and F. Geissmann. 2009. "Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells." *Annu Rev Immunol* 27:669-92. doi: 10.1146/annurev.immunol.021908.132557.

**B**akogiannis, C., D. Tousoulis, E. Androulakis, A. Briasoulis, N. Papageorgiou, G. Vogiatzi, A. M. Kampoli, M. Charakida, G. Siasos, G. Latsios, C. Antoniadis, and C. Stefanadis. 2012. "Circulating endothelial progenitor cells as biomarkers for prediction of cardiovascular outcomes." *Curr Med Chem* 19 (16):2597-604.

Bardin, N., F. Anfosso, J. M. Massé, E. Cramer, F. Sabatier, A. Le Bivic, J. Sampol, and F. Dignat-George. 2001. "Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion." *Blood* 98 (13):3677-84.

Bartel, D. P. 2004. "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell* 116 (2):281-97.

Barton, G. M. 2008. "A calculated response: control of inflammation by the innate immune system." *J Clin Invest* 118 (2):413-20. doi: 10.1172/JCI34431.

Belge, K. U., F. Dayyani, A. Horelt, M. Siedlar, M. Frankenberger, B. Frankenberger, T. Espevik, and L. Ziegler-Heitbrock. 2002. "The proinflammatory CD14+CD16+DR++ monocytes are a major source of TNF." *J Immunol* 168 (7):3536-42.

Berckmans, R. J., R. Nieuwland, P. P. Tak, A. N. Böing, F. P. Romijn, M. C. Kraan, F. C. Breedveld, C. E. Hack, and A. Sturk. 2002. "Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism." *Arthritis Rheum* 46 (11):2857-66. doi: 10.1002/art.10587.

Berckmans, R. J., A. Sturk, L. M. van Tienen, M. C. Schaap, and R. Nieuwland. 2011. "Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva." *Blood* 117 (11):3172-80. doi: 10.1182/blood-2010-06-290460.

Berezina, A. E., A. A. Kremzer, Y. V. Martovitskaya, T. A. Berezina, and E. A. Gromenko. 2016. "Pattern of endothelial progenitor cells and apoptotic endothelial cell-derived microparticles in chronic heart failure patients with preserved and reduced left ventricular ejection fraction." *EBioMedicine* 4:86-94. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.01.018.

Bergers, G., R. Brekken, G. McMahon, T. H. Vu, T. Itoh, K. Tamaki, K. Tanzawa, P. Thorpe, S. Itohara, Z. Werb, and D. Hanahan. 2000. "Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis." *Nat Cell Biol* 2 (10):737-44. doi: 10.1038/35036374.

Beyer, C., and D. S. Pisetsky. 2010. "The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatic diseases." *Nat Rev Rheumatol* 6 (1):21-9. doi: 10.1038/nrrheum.2009.229.

Bianco, F., C. Perrotta, L. Novellino, M. Francolini, L. Riganti, E. Menna, L. Saggiotti, E. H. Schuchman, R. Furlan, E. Clementi, M. Matteoli, and C. Verderio. 2009. "Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells." *EMBO J* 28 (8):1043-54. doi: 10.1038/emboj.2009.45.



- Bloom, A. L., J. C. Giddings, and C. J. Wilks. 1973. "Factor 8 on the vascular intima: possible importance in haemostasis and thrombosis." *Nat New Biol* 241 (111):217-9.
- Boulanger, C. M., N. Amabile, and A. Tedgui. 2006. "Circulating microparticles: a potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease." *Hypertension* 48 (2):180-6. doi: 10.1161/01.HYP.0000231507.00962.b5.
- Boulanger, C. M., A. Scoazec, T. Ebrahimian, P. Henry, E. Mathieu, A. Tedgui, and Z. Mallat. 2001. "Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction." *Circulation* 104 (22):2649-52.
- Brill, A., O. Dashevsky, J. Rivo, Y. Gozal, and D. Varon. 2005. "Platelet-derived microparticles induce angiogenesis and stimulate post-ischemic revascularization." *Cardiovasc Res* 67 (1):30-8. doi: 10.1016/j.cardiores.2005.04.007.
- Brodsky, S. V., F. Zhang, A. Nasjletti, and M. S. Goligorsky. 2004. "Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286 (5):H1910-5. doi: 10.1152/ajpheart.01172.2003.
- Buendía, P., A. Montes de Oca, J. A. Madueño, A. Merino, A. Martín-Malo, P. Aljama, R. Ramírez, M. Rodríguez, and J. Carracedo. 2015. "Endothelial microparticles mediate inflammation-induced vascular calcification." *FASEB J* 29 (1):173-81. doi: 10.1096/fj.14-249706.
- Burger, D., S. Schock, C. S. Thompson, A. C. Montezano, A. M. Hakim, and R. M. Touyz. 2013. "Microparticles: biomarkers and beyond." *Clin Sci (Lond)* 124 (7):423-41. doi: 10.1042/CS20120309.
- Burger, D., M. Turner, M. N. Munkonda, and R. M. Touyz. 2016. "Endothelial Microparticle-Derived Reactive Oxygen Species: Role in Endothelial Signaling and Vascular Function." *Oxid Med Cell Longev* 2016:5047954. doi: 10.1155/2016/5047954.
- Burton, J. O., H. A. Hamali, R. Singh, N. Abbasian, R. Parsons, A. K. Patel, A. H. Goodall, and N. J. Brunskill. 2013. "Elevated levels of procoagulant plasma microvesicles in dialysis patients." *PLoS One* 8 (8):e72663. doi: 10.1371/journal.pone.0072663.
- Böing, A. N., C. M. Hau, A. Sturk, and R. Nieuwland. 2008. "Platelet microparticles contain active caspase 3." *Platelets* 19 (2):96-103. doi: 10.1080/09537100701777295.
- Cairns, A. P., A. D. Crockard, and A. L. Bell. 2002. "The CD14+ CD16+ monocyte subset in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus." *Rheumatol Int* 21 (5):189-92.
- Campello, E., L. Spiezia, C. M. Radu, and P. Simioni. 2016. "Microparticles as biomarkers of venous thromboembolic events." *Biomark Med* 10 (7):743-55. doi: 10.2217/bmm-2015-0063.
- Carmona, A., M. L. Agüera, C. Luna Ruiz, P. Buendia, L. Calleros, A. Garcia-Jerez, M. Rodríguez-Puyol, M. Arias, M. Arias-Guillen, G. de Arriba, J. Ballarin, C. Bernis, E. Fernandez, S. Garcia-Rebollo, J. Mancha, G. Del Peso, E. Perez, E. Poch, J. M. Portoles, D. Rodriguez-Puyol, R. Sánchez-Villanueva, F. Sarro, A. Torres, A. Martin-Malo, P. Aljama, R. Ramirez, and J. Carracedo. 2017. "Markers of endothelial damage in patients with chronic kidney disease on hemodialysis." *Am J Physiol Renal Physiol*:ajprenal.00013.2016. doi: 10.1152/ajprenal.00013.2016.
- Cases, A., E. Bragulat, M. Serradell, M. Vera, A. de la Sierra, and G. Escolar. 2003. "[Endothelial dysfunction in chronic renal failure]." *Nefrologia* 23 Suppl 4:42-51.
- Castell, J. V., M. J. Gómez-Lechón, M. David, R. Fabra, R. Trullenque, and P. C. Heinrich. 1990. "Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6." *Hepatology* 12 (5):1179-86.

- Cauwenberghs, S., M. A. Feijge, A. G. Harper, S. O. Sage, J. Curvers, and J. W. Heemskerk. 2006. "Shedding of procoagulant microparticles from unstimulated platelets by integrin-mediated destabilization of actin cytoskeleton." *FEBS Lett* 580 (22):5313-20. doi: 10.1016/j.febslet.2006.08.082.
- Celletti, F. L., J. M. Waugh, P. G. Amabile, A. Brendolan, P. R. Hilfiker, and M. D. Dake. 2001. "Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression." *Nat Med* 7 (4):425-9. doi: 10.1038/86490.
- Chade, A. R., A. Lerman, and L. O. Lerman. 2005. "Kidney in early atherosclerosis." *Hypertension* 45 (6):1042-9. doi: 10.1161/01.HYP.0000167121.14254.a0.
- Chavakis, E., A. Aicher, C. Heeschen, K. Sasaki, R. Kaiser, N. El Makhfi, C. Urbich, T. Peters, K. Scharffetter-Kochanek, A. M. Zeiher, T. Chavakis, and S. Dimmeler. 2005. "Role of beta2-integrins for homing and neovascularization capacity of endothelial progenitor cells." *J Exp Med* 201 (1):63-72. doi: 10.1084/jem.20041402.
- Chen, J. Z., F. R. Zhang, Q. M. Tao, X. X. Wang, and J. H. Zhu. 2004. "Number and activity of endothelial progenitor cells from peripheral blood in patients with hypercholesterolaemia." *Clin Sci (Lond)* 107 (3):273-80. doi: 10.1042/CS20030389.
- Chironi, G. N., A. Simon, C. M. Boulanger, F. Dignat-George, B. Hugel, J. L. Megnien, M. Lefort, J. M. Freyssinet, and A. Tedgui. 2010. "Circulating microparticles may influence early carotid artery remodeling." *J Hypertens* 28 (4):789-96. doi: 10.1097/HJH.0b013e328335d0a8.
- Chironi, G., A. Simon, B. Hugel, M. Del Pino, J. Garipey, J. M. Freyssinet, and A. Tedgui. 2006. "Circulating leukocyte-derived microparticles predict subclinical atherosclerosis burden in asymptomatic subjects." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 (12):2775-80. doi: 10.1161/01.ATV.0000249639.36915.04.
- Choi, J. H., K. L. Kim, W. Huh, B. Kim, J. Byun, W. Suh, J. Sung, E. S. Jeon, H. Y. Oh, and D. K. Kim. 2004. "Decreased number and impaired angiogenic function of endothelial progenitor cells in patients with chronic renal failure." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (7):1246-52. doi: 10.1161/01.ATV.0000133488.56221.4a.
- Choi, J. S., K. A. Kwak, M. J. Park, Y. H. Kim, H. W. Gil, H. Y. Song, and S. Y. Hong. 2013. "Ratio of angiopoietin-2 to angiopoietin-1 predicts mortality in acute lung injury induced by paraquat." *Med Sci Monit* 19:28-33.
- Chrisostomidis, C., P. Konofaos, D. Karypidis, A. Lazaris, A. Kostakis, and O. Papadopoulos. 2015. "The impact of Ets-1 oncoprotein and human endoglin (CD105) on the recurrence of non-melanoma skin cancers." *Int J Dermatol* 54 (9):989-95. doi: 10.1111/ijd.12891.
- Cicmil, M., J. M. Thomas, M. Leduc, C. Bon, and J. M. Gibbins. 2002. "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 signaling inhibits the activation of human platelets." *Blood* 99 (1):137-44.
- Civin, C. I., M. L. Banquerigo, L. C. Strauss, and M. R. Loken. 1987. "Antigenic analysis of hematopoiesis. VI. Flow cytometric characterization of My-10-positive progenitor cells in normal human bone marrow." *Exp Hematol* 15 (1):10-7.
- Cocucci, E., and J. Meldolesi. 2015. "Ectosomes and exosomes: shedding the confusion between extracellular vesicles." *Trends Cell Biol* 25 (6):364-72. doi: 10.1016/j.tcb.2015.01.004.
- Cocucci, E., G. Racchetti, and J. Meldolesi. 2009. "Shedding microvesicles: artefacts no more." *Trends Cell Biol* 19 (2):43-51. doi: 10.1016/j.tcb.2008.11.003.
- Combes, V., A. C. Simon, G. E. Grau, D. Arnoux, L. Camoin, F. Sabatier, M. Mutin, M. Sanmarco, J. Sampol, and F. Dignat-George. 1999. "In vitro generation of endothelial

microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant." *J Clin Invest* 104 (1):93-102. doi: 10.1172/JCI4985.

Conway, D., and M. A. Schwartz. 2012. "Lessons from the endothelial junctional mechanosensory complex." *F1000 Biol Rep* 4:1. doi: 10.3410/B4-1.

**D**ane, M. J., M. Khairoun, D. H. Lee, B. M. van den Berg, B. J. Eskens, M. G. Boels, J. W. van Teeffelen, A. L. Rops, J. van der Vlag, A. J. van Zonneveld, M. E. Reinders, H. Vink, and T. J. Rabelink. 2014. "Association of kidney function with changes in the endothelial surface layer." *Clin J Am Soc Nephrol* 9 (4):698-704. doi: 10.2215/CJN.08160813.

Daniel, L., F. Fakhouri, D. Joly, L. Mouthon, P. Nusbaum, J. P. Grunfeld, J. Schifferli, L. Guillevin, P. Lesavre, and L. Halbwachs-Mecarelli. 2006. "Increase of circulating neutrophil and platelet microparticles during acute vasculitis and hemodialysis." *Kidney Int* 69 (8):1416-23. doi: 10.1038/sj.ki.5000306.

de Sequera, P., E. Corchete, L. Bohorquez, M. Albalate, R. Perez-Garcia, M. Alique, M. Marques, E. García-Menéndez, J. Portolés, and R. Ramirez. 2017. "Residual Renal Function in Hemodialysis and Inflammation." *Ther Apher Dial*. doi: 10.1111/1744-9987.12576.

Delia, D., M. G. Lampugnani, M. Resnati, E. Dejana, A. Aiello, E. Fontanella, D. Soligo, M. A. Pierotti, and M. F. Greaves. 1993. "CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro." *Blood* 81 (4):1001-8.

Densmore, J. C., P. R. Signorino, J. Ou, O. A. Hatoum, J. J. Rowe, Y. Shi, S. Kaul, D. W. Jones, R. E. Sabina, K. A. Pritchard, K. S. Guice, and K. T. Oldham. 2006. "Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury." *Shock* 26 (5):464-71. doi: 10.1097/01.shk.0000228791.10550.36.

Descamps-Latscha, B., V. Witko-Sarsat, T. Nguyen-Khoa, A. T. Nguyen, V. Gausson, N. Mothu, G. M. London, and P. Jungers. 2005. "Advanced oxidation protein products as risk factors for atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients." *Am J Kidney Dis* 45 (1):39-47.

Dignat-George, F., and C. M. Boulanger. 2011. "The many faces of endothelial microparticles." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31 (1):27-33. doi: 10.1161/ATVBAHA.110.218123.

Dignat-George, F., L. Camoin-Jau, F. Sabatier, D. Arnoux, F. Anfosso, N. Bardin, V. Veit, V. Combes, S. Gentile, V. Moal, M. Sanmarco, and J. Sampol. 2004. "Endothelial microparticles: a potential contribution to the thrombotic complications of the antiphospholipid syndrome." *Thromb Haemost* 91 (4):667-73. doi: 10.1160/TH03-07-0487.

Distler, J. H., L. C. Huber, S. Gay, O. Distler, and D. S. Pisetsky. 2006. "Microparticles as mediators of cellular cross-talk in inflammatory disease." *Autoimmunity* 39 (8):683-90. doi: 10.1080/08916930601061538.

Dou, L., E. Bertrand, C. Cerini, V. Faure, J. Sampol, R. Vanholder, Y. Berland, and P. Brunet. 2004. "The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair." *Kidney Int* 65 (2):442-51. doi: 10.1111/j.1523-1755.2004.00399.x.

Dou, L., M. Sallée, C. Cerini, S. Poitevin, B. Gondouin, N. Jourde-Chiche, K. Fallague, P. Brunet, R. Calaf, B. Dussol, B. Mallet, F. Dignat-George, and S. Burtey. 2015. "The cardiovascular effect of the uremic solute indole-3 acetic acid." *J Am Soc Nephrol* 26 (4):876-87. doi: 10.1681/ASN.2013121283.

Drexler, H. 1997. "Endothelial dysfunction: clinical implications." *Prog Cardiovasc Dis* 39 (4):287-324.

Du, F., J. Zhou, R. Gong, X. Huang, M. Pansuria, A. Virtue, X. Li, H. Wang, and X. F. Yang. 2012. "Endothelial progenitor cells in atherosclerosis." *Front Biosci (Landmark Ed)* 17:2327-49.

**E**Imore, S. 2007. "Apoptosis: a review of programmed cell death." *Toxicol Pathol* 35 (4):495-516. doi: 10.1080/01926230701320337.

Elshal, M. F., S. S. Khan, Y. Takahashi, M. A. Solomon, and J. P. McCoy. 2005. "CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood." *Blood* 106 (8):2923-4. doi: 10.1182/blood-2005-06-2307.

Engin, H., Y. Ustündağ, I. Ozel Tekin, and A. Gökmen. 2012. "Plasma concentrations of Ang-1, Ang-2 and Tie-2 in gastric cancer." *Eur Cytokine Netw* 23 (1):21-4. doi: 10.1684/ecn.2012.0301.

Erdrügger, U., and T. H. Le. 2016. "Extracellular Vesicles in Renal Diseases: More than Novel Biomarkers?" *J Am Soc Nephrol* 27 (1):12-26. doi: 10.1681/ASN.2015010074.

Everaert, B. R., E. M. Van Craenenbroeck, V. Y. Hoymans, S. E. Haine, L. Van Nassauw, V. M. Conraads, J. P. Timmermans, and C. J. Vrints. 2010. "Current perspective of pathophysiological and interventional effects on endothelial progenitor cell biology: focus on PI3K/AKT/eNOS pathway." *Int J Cardiol* 144 (3):350-66. doi: 10.1016/j.ijcard.2010.04.018.

**F**adini, G. P., C. Agostini, and A. Avogaro. 2005. "Endothelial progenitor cells and vascular biology in diabetes mellitus: current knowledge and future perspectives." *Curr Diabetes Rev* 1 (1):41-58.

Faille, D., F. El-Assaad, A. J. Mitchell, M. C. Alessi, G. Chimini, T. Fusai, G. E. Grau, and V. Combes. 2012. "Endocytosis and intracellular processing of platelet microparticles by brain endothelial cells." *J Cell Mol Med* 16 (8):1731-8. doi: 10.1111/j.1582-4934.2011.01434.x.

Falati, S., S. Patil, P. L. Gross, M. Stapleton, G. Merrill-Skoloff, N. E. Barrett, K. L. Pixton, H. Weiler, B. Cooley, D. K. Newman, P. J. Newman, B. C. Furie, B. Furie, and J. M. Gibbins. 2006. "Platelet PECAM-1 inhibits thrombus formation in vivo." *Blood* 107 (2):535-41. doi: 10.1182/blood-2005-04-1512.

Faure, V., L. Dou, F. Sabatier, C. Cerini, J. Sampol, Y. Berland, P. Brunet, and F. Dignat-George. 2006. "Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure." *J Thromb Haemost* 4 (3):566-73. doi: 10.1111/j.1538-7836.2005.01780.x.

Fernández-Hernando, C., C. M. Ramírez, L. Goedeke, and Y. Suárez. 2013. "MicroRNAs in metabolic disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 33 (2):178-85. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300144.

Fischer-Smith, T., S. Croul, A. E. Sverstiuk, C. Capini, D. L'Heureux, E. G. Régulier, M. W. Richardson, S. Amini, S. Morgello, K. Khalili, and J. Rappaport. 2001. "CNS invasion by CD14+/CD16+ peripheral blood-derived monocytes in HIV dementia: perivascular accumulation and reservoir of HIV infection." *J Neurovirol* 7 (6):528-41. doi: 10.1080/135502801753248114.

Flammer, A. J., M. Gössl, R. J. Widmer, M. Reriani, R. Lennon, D. Loeffler, S. Shonyo, R. D. Simari, L. O. Lerman, S. Khosla, and A. Lerman. 2012. "Osteocalcin positive CD133+/CD34-/KDR+ progenitor cells as an independent marker for unstable atherosclerosis." *Eur Heart J* 33 (23):2963-9. doi: 10.1093/eurheartj/ehs234.

- Foley, R. N., P. S. Parfrey, and M. J. Sarnak. 1998. "Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease." *Am J Kidney Dis* 32 (5 Suppl 3):S112-9.
- Franquesa, M., M. J. Hoogduijn, E. Ripoll, F. Luk, M. Salih, M. G. Betjes, J. Torras, C. C. Baan, J. M. Grinyó, and A. M. Merino. 2014. "Update on controls for isolation and quantification methodology of extracellular vesicles derived from adipose tissue mesenchymal stem cells." *Front Immunol* 5:525. doi: 10.3389/fimmu.2014.00525.
- França, C. N., M. C. Izar, J. B. Amaral, D. M. Tegani, and F. A. Fonseca. 2015. "Microparticles as potential biomarkers of cardiovascular disease." *Arq Bras Cardiol* 104 (2):169-74. doi: 10.5935/abc.20140210.
- Friend, C., W. Marovitz, G. Henie, W. Henie, D. Tsuei, K. Hirschhorn, J. G. Holland, and J. Cuttner. 1978. "Observations on cell lines derived from a patient with Hodgkin's disease." *Cancer Res* 38 (8):2581-91.
- Février, B., and G. Raposo. 2004. "Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages." *Curr Opin Cell Biol* 16 (4):415-21. doi: 10.1016/j.ceb.2004.06.003.
- G**aceb, A., M. C. Martinez, and R. Andriantsitohaina. 2014. "Extracellular vesicles: new players in cardiovascular diseases." *Int J Biochem Cell Biol* 50:24-8. doi: 10.1016/j.biocel.2014.01.018.
- Gehling, U. M., S. Ergün, U. Schumacher, C. Wagener, K. Pantel, M. Otte, G. Schuch, P. Schafhausen, T. Mende, N. Kilic, K. Kluge, B. Schäfer, D. K. Hossfeld, and W. Fiedler. 2000. "In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells." *Blood* 95 (10):3106-12.
- George, J., E. Goldstein, S. Abashidze, V. Deutsch, H. Shmilovich, A. Finkelstein, I. Herz, H. Miller, and G. Keren. 2004. "Circulating endothelial progenitor cells in patients with unstable angina: association with systemic inflammation." *Eur Heart J* 25 (12):1003-8. doi: 10.1016/j.ehj.2004.03.026.
- Ghani, U., A. Shuaib, A. Salam, A. Nasir, U. Shuaib, T. Jeerakathil, F. Sher, F. O'Rourke, A. M. Nasser, B. Schwindt, and K. Todd. 2005. "Endothelial progenitor cells during cerebrovascular disease." *Stroke* 36 (1):151-3. doi: 10.1161/01.STR.0000149944.15406.16.
- Ginestra, A., M. D. La Placa, F. Saladino, D. Cassarà, H. Nagase, and M. L. Vittorelli. 1998. "The amount and proteolytic content of vesicles shed by human cancer cell lines correlates with their in vitro invasiveness." *Anticancer Res* 18 (5A):3433-7.
- Goldberg, R. B. 2000. "Cardiovascular disease in diabetic patients." *Med Clin North Am* 84 (1):81-93, viii.
- Graves, L. E., E. V. Ariztia, J. R. Navari, H. J. Matzel, M. S. Stack, and D. A. Fishman. 2004. "Proinvasive properties of ovarian cancer ascites-derived membrane vesicles." *Cancer Res* 64 (19):7045-9. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-04-1800.
- Green, D., S. Skeoch, M. Y. Alexander, P. A. Kalra, and B. Parker. 2017. "The Association of Baseline and Longitudinal Change in Endothelial Microparticle Count with Mortality in Chronic Kidney Disease." *Nephron* 135 (4):252-260. doi: 10.1159/000452344.
- Grisar, J., D. Aletaha, C. W. Steiner, T. Kapral, S. Steiner, D. Seidinger, G. Weigel, I. Schwarzwinger, W. Wolozczuk, G. Steiner, and J. S. Smolen. 2005. "Depletion of endothelial progenitor cells in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis." *Circulation* 111 (2):204-11. doi: 10.1161/01.CIR.0000151875.21836.AE.
- Grützmeier, S., and E. Sandström. 1999. "C-reactive protein levels in HIV complicated by opportunistic infections and infections with common bacterial pathogens." *Scand J Infect Dis* 31 (3):229-34.

György, B., T. G. Szabó, M. Pásztói, Z. Pál, P. Misják, B. Aradi, V. László, E. Pállinger, E. Pap, A. Kittel, G. Nagy, A. Falus, and E. I. Buzás. 2011. "Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles." *Cell Mol Life Sci* 68 (16):2667-88. doi: 10.1007/s00018-011-0689-3.

Gössl, M., S. Khosla, X. Zhang, N. Higano, K. L. Jordan, D. Loeffler, M. Enriquez-Sarano, R. J. Lennon, U. McGregor, L. O. Lerman, and A. Lerman. 2012. "Role of circulating osteogenic progenitor cells in calcific aortic stenosis." *J Am Coll Cardiol* 60 (19):1945-53. doi: 10.1016/j.jacc.2012.07.042.

Gössl, M., U. I. Mödder, E. J. Atkinson, A. Lerman, and S. Khosla. 2008. "Osteocalcin expression by circulating endothelial progenitor cells in patients with coronary atherosclerosis." *J Am Coll Cardiol* 52 (16):1314-25. doi: 10.1016/j.jacc.2008.07.019.

**H**akulinen, J., S. Junnikkala, T. Sorsa, and S. Meri. 2004. "Complement inhibitor membrane cofactor protein (MCP; CD46) is constitutively shed from cancer cell membranes in vesicles and converted by a metalloproteinase to a functionally active soluble form." *Eur J Immunol* 34 (9):2620-9. doi: 10.1002/eji.200424969.

Heeschen, C., A. Aicher, R. Lehmann, S. Fichtlscherer, M. Vasa, C. Urbich, C. Mildner-Rihm, H. Martin, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2003. "Erythropoietin is a potent physiologic stimulus for endothelial progenitor cell mobilization." *Blood* 102 (4):1340-6. doi: 10.1182/blood-2003-01-0223.

Heine, G. H., C. Ulrich, E. Seibert, S. Seiler, J. Marell, B. Reichart, M. Krause, A. Schlitt, H. Köhler, and M. Girndt. 2008. "CD14(++)CD16+ monocytes but not total monocyte numbers predict cardiovascular events in dialysis patients." *Kidney Int* 73 (5):622-9. doi: 10.1038/sj.ki.5002744.

Heiss, C., N. Amabile, A. C. Lee, W. M. Real, S. F. Schick, D. Lao, M. L. Wong, S. Jahn, F. S. Angeli, P. Minasi, M. L. Springer, S. K. Hammond, S. A. Glantz, W. Grossman, J. R. Balmes, and Y. Yeghiazarians. 2008. "Brief secondhand smoke exposure depresses endothelial progenitor cells activity and endothelial function: sustained vascular injury and blunted nitric oxide production." *J Am Coll Cardiol* 51 (18):1760-71. doi: 10.1016/j.jacc.2008.01.040.

Heiss, C., P. Kleinbongard, A. Dejam, S. Perré, H. Schroeter, H. Sies, and M. Kelm. 2005. "Acute consumption of flavanol-rich cocoa and the reversal of endothelial dysfunction in smokers." *J Am Coll Cardiol* 46 (7):1276-83. doi: 10.1016/j.jacc.2005.06.055.

Heissig, B., K. Hattori, S. Dias, M. Friedrich, B. Ferris, N. R. Hackett, R. G. Crystal, P. Besmer, D. Lyden, M. A. Moore, Z. Werb, and S. Rafii. 2002. "Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand." *Cell* 109 (5):625-37.

Herbrig, K., F. Pistrosch, S. Foerster, and P. Gross. 2006. "Endothelial progenitor cells in chronic renal insufficiency." *Kidney Blood Press Res* 29 (1):24-31. doi: 10.1159/000092484.

HILL, A. G. 1951. "C-reactive protein in the chronic rheumatic diseases." *Lancet* 2 (6688):807-11.

Hill, J. M., G. Zalos, J. P. Halcox, W. H. Schenke, M. A. Waclawiw, A. A. Quyyumi, and T. Finkel. 2003. "Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk." *N Engl J Med* 348 (7):593-600. doi: 10.1056/NEJMoa022287.

Hinz, M., and C. Scheidereit. 2014. "The I $\kappa$ B kinase complex in NF- $\kappa$ B regulation and beyond." *EMBO Rep* 15 (1):46-61. doi: 10.1002/embr.201337983.

- Hirschi, K. K., D. A. Ingram, and M. C. Yoder. 2008. "Assessing identity, phenotype, and fate of endothelial progenitor cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28 (9):1584-95. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.155960.
- Hoetzer, G. L., O. J. MacEneaney, H. M. Irmiger, R. Keith, G. P. Van Guilders, B. L. Stauffer, and C. A. DeSouza. 2007. "Gender differences in circulating endothelial progenitor cell colony-forming capacity and migratory activity in middle-aged adults." *Am J Cardiol* 99 (1):46-8. doi: 10.1016/j.amjcard.2006.07.061.
- Hoetzer, G. L., G. P. Van Guilders, H. M. Irmiger, R. S. Keith, B. L. Stauffer, and C. A. DeSouza. 2007. "Aging, exercise, and endothelial progenitor cell clonogenic and migratory capacity in men." *J Appl Physiol (1985)* 102 (3):847-52. doi: 10.1152/jappphysiol.01183.2006.
- Holubarsch, C. J. 2000. "Endothelial dysfunction: impact on epicardial coronary arteries and microcirculation." *Semin Thromb Hemost* 26 (5):547-51.
- Honold, J., R. Lehmann, C. Heeschen, D. H. Walter, B. Assmus, K. Sasaki, H. Martin, J. Haendeler, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2006. "Effects of granulocyte colony stimulating factor on functional activities of endothelial progenitor cells in patients with chronic ischemic heart disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 (10):2238-43. doi: 10.1161/01.ATV.0000240248.55172.dd.
- Horn, P., G. Erkilet, V. Veulemans, P. Kröpil, L. Schurgers, T. Zeus, C. Heiss, M. Kelm, and R. Westenfeld. 2016. "Microparticle-Induced Coagulation Relates to Coronary Artery Atherosclerosis in Severe Aortic Valve Stenosis." *PLoS One* 11 (3):e0151499. doi: 10.1371/journal.pone.0151499.
- Hoyer, F. F., G. Nickenig, and N. Werner. 2010. "Microparticles--messengers of biological information." *J Cell Mol Med* 14 (9):2250-6. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01114.x.
- Hristov, M., W. Erl, S. Linder, and P. C. Weber. 2004. "Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial progenitor cells in vitro." *Blood* 104 (9):2761-6. doi: 10.1182/blood-2003-10-3614.
- Hristov, M., W. Erl, and P. C. Weber. 2003. "Endothelial progenitor cells: isolation and characterization." *Trends Cardiovasc Med* 13 (5):201-6.
- Hromada, C., S. Mühleder, J. Grillari, H. Redl, and W. Holnthoner. 2017. "Endothelial Extracellular Vesicles-Promises and Challenges." *Front Physiol* 8:275. doi: 10.3389/fphys.2017.00275.
- Hsu, H. H., and N. P. Camacho. 1999. "Isolation of calcifiable vesicles from human atherosclerotic aortas." *Atherosclerosis* 143 (2):353-62.
- Huang, P. H., Y. H. Chen, C. H. Wang, J. S. Chen, H. Y. Tsai, F. Y. Lin, W. Y. Lo, T. C. Wu, M. Sata, J. W. Chen, and S. J. Lin. 2009. "Matrix metalloproteinase-9 is essential for ischemia-induced neovascularization by modulating bone marrow-derived endothelial progenitor cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29 (8):1179-84. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.189175.
- Hugel, B., M. C. Martínez, C. Kunzelmann, and J. M. Freyssinet. 2005. "Membrane microparticles: two sides of the coin." *Physiology (Bethesda)* 20:22-7. doi: 10.1152/physiol.00029.2004.
- Hulsmans, M., D. De Keyser, and P. Holvoet. 2011. "MicroRNAs regulating oxidative stress and inflammation in relation to obesity and atherosclerosis." *FASEB J* 25 (8):2515-27. doi: 10.1096/fj.11-181149.
- Hung, S. C., K. L. Kuo, C. C. Wu, and D. C. Tarng. 2017. "Indoxyl Sulfate: A Novel Cardiovascular Risk Factor in Chronic Kidney Disease." *J Am Heart Assoc* 6 (2). doi: 10.1161/JAHA.116.005022.

Hunter, M. P., N. Ismail, X. Zhang, B. D. Aguda, E. J. Lee, L. Yu, T. Xiao, J. Schafer, M. L. Lee, T. D. Schmittgen, S. P. Nana-Sinkam, D. Jarjoura, and C. B. Marsh. 2008. "Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles." *PLoS One* 3 (11):e3694. doi: 10.1371/journal.pone.0003694.

Iseki, K., M. Tozawa, S. Yoshi, and K. Fukiyama. 1999. "Serum C-reactive protein (CRP) and risk of death in chronic dialysis patients." *Nephrol Dial Transplant* 14 (8):1956-60.

Isidori, A. M., M. A. Venneri, and D. Fiore. 2016. "Angiopoietin-1 and Angiopoietin-2 in metabolic disorders: therapeutic strategies to restore the highs and lows of angiogenesis in diabetes." *J Endocrinol Invest* 39 (11):1235-1246. doi: 10.1007/s40618-016-0502-0.

Iwaguro, H., J. Yamaguchi, C. Kalka, S. Murasawa, H. Masuda, S. Hayashi, M. Silver, T. Li, J. M. Isner, and T. Asahara. 2002. "Endothelial progenitor cell vascular endothelial growth factor gene transfer for vascular regeneration." *Circulation* 105 (6):732-8.

Jimenez, J. J., W. Jy, L. M. Mauro, C. Soderland, L. L. Horstman, and Y. S. Ahn. 2003. "Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis." *Thromb Res* 109 (4):175-80.

Johnstone, R. M., M. Adam, J. R. Hammond, L. Orr, and C. Turbide. 1987. "Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes)." *J Biol Chem* 262 (19):9412-20.

Jung, C., M. Lichtenauer, H. R. Figulla, B. Wernly, B. Goebel, M. Foerster, C. Edlinger, and A. Lauten. 2017. "Microparticles in patients undergoing transcatheter aortic valve implantation (TAVI)." *Heart Vessels* 32 (4):458-466. doi: 10.1007/s00380-016-0885-z.

Jóźwik, M., O. E. Okunbowa, A. Lipska, M. Smoktunowicz, A. Semczuk, and P. Radziwon. 2015. "Surface antigen expression on peripheral blood monocytes in women with gynecologic malignancies." *BMC Cancer* 15:129. doi: 10.1186/s12885-015-1136-x.

Kamihata, H., H. Matsubara, T. Nishiue, S. Fujiyama, K. Amano, O. Iba, T. Imada, and T. Iwasaka. 2002. "Improvement of collateral perfusion and regional function by implantation of peripheral blood mononuclear cells into ischemic hibernating myocardium." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22 (11):1804-10.

Kamiński, T. W., K. Pawlak, M. Karbowska, M. Myśliwiec, and D. Pawlak. 2017. "Indoxyl sulfate - the uremic toxin linking hemostatic system disturbances with the prevalence of cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease." *BMC Nephrol* 18 (1):35. doi: 10.1186/s12882-017-0457-1.

Kapustin, A. N., J. D. Davies, J. L. Reynolds, R. McNair, G. T. Jones, A. Sidibe, L. J. Schurgers, J. N. Skepper, D. Proudfoot, M. Mayr, and C. M. Shanahan. 2011. "Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization." *Circ Res* 109 (1):e1-12. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.238808.

Kapustin, A. N., and C. M. Shanahan. 2016. "Emerging roles for vascular smooth muscle cell exosomes in calcification and coagulation." *J Physiol* 594 (11):2905-14. doi: 10.1113/JP271340.

Karkkainen, M. J., and T. V. Petrova. 2000. "Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis." *Oncogene* 19 (49):5598-605. doi: 10.1038/sj.onc.1203855.



- Karpman, D., A. L. Ståhl, and I. Arvidsson. 2017. "Extracellular vesicles in renal disease." *Nat Rev Nephrol* 13 (9):545-562. doi: 10.1038/nrneph.2017.98.
- Kawamoto, A., H. C. Gwon, H. Iwaguro, J. I. Yamaguchi, S. Uchida, H. Masuda, M. Silver, H. Ma, M. Kearney, J. M. Isner, and T. Asahara. 2001. "Therapeutic potential of ex vivo expanded endothelial progenitor cells for myocardial ischemia." *Circulation* 103 (5):634-7.
- Kawashima, S., and M. Yokoyama. 2004. "Dysfunction of endothelial nitric oxide synthase and atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24 (6):998-1005. doi: 10.1161/01.ATV.0000125114.88079.96.
- Kendrick, J., and M. Chonchol. 2011. "The role of phosphorus in the development and progression of vascular calcification." *Am J Kidney Dis* 58 (5):826-34. doi: 10.1053/j.ajkd.2011.07.020.
- Khakoo, A. Y., and T. Finkel. 2005. "Endothelial progenitor cells." *Annu Rev Med* 56:79-101. doi: 10.1146/annurev.med.56.090203.104149.
- Khan, S. S., M. A. Solomon, and J. P. McCoy. 2005. "Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry." *Cytometry B Clin Cytom* 64 (1):1-8. doi: 10.1002/cyto.b.20040.
- Kim, E. C., J. H. Moon, S. W. Kang, B. Kwon, and H. W. Lee. 2015. "TMEM126A, a CD137 ligand binding protein, couples with the TLR4 signal transduction pathway in macrophages." *Mol Immunol* 64 (2):244-51. doi: 10.1016/j.molimm.2014.12.001.
- Kim, H. K., K. S. Song, J. H. Chung, K. R. Lee, and S. N. Lee. 2004. "Platelet microparticles induce angiogenesis in vitro." *Br J Haematol* 124 (3):376-84.
- Kim, H. K., K. S. Song, Y. S. Park, Y. H. Kang, Y. J. Lee, K. R. Lee, K. W. Ryu, J. M. Bae, and S. Kim. 2003. "Elevated levels of circulating platelet microparticles, VEGF, IL-6 and RANTES in patients with gastric cancer: possible role of a metastasis predictor." *Eur J Cancer* 39 (2):184-91.
- Knijff-Dutmer, E. A., J. Koerts, R. Nieuwland, E. M. Kalsbeek-Batenburg, and M. A. van de Laar. 2002. "Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum* 46 (6):1498-503. doi: 10.1002/art.10312.
- Kokubo, T., H. Uchida, and E. T. Choi. 2007. "Integrin alpha(v)beta(3) as a target in the prevention of neointimal hyperplasia." *J Vasc Surg* 45 Suppl A:A33-8. doi: 10.1016/j.jvs.2007.02.069.
- Kovacic, J. C., and M. Boehm. 2009. "Resident vascular progenitor cells: an emerging role for non-terminally differentiated vessel-resident cells in vascular biology." *Stem Cell Res* 2 (1):2-15. doi: 10.1016/j.scr.2008.05.005.
- Krenning, G., M. J. van Luyn, and M. C. Harmsen. 2009. "Endothelial progenitor cell-based neovascularization: implications for therapy." *Trends Mol Med* 15 (4):180-9. doi: 10.1016/j.molmed.2009.02.001.
- Krieter, D. H., R. Fischer, K. Merget, H. D. Lemke, A. Morgenroth, B. Canaud, and C. Wanner. 2010. "Endothelial progenitor cells in patients on extracorporeal maintenance dialysis therapy." *Nephrol Dial Transplant* 25 (12):4023-31. doi: 10.1093/ndt/gfq552.
- Lacroix, R., C. Judicone, P. Poncelet, S. Robert, L. Arnaud, J. Sampol, and F. Dignat-George. 2012. "Impact of pre-analytical parameters on the measurement of circulating microparticles: towards standardization of protocol." *J Thromb Haemost* 10 (3):437-46. doi: 10.1111/j.1538-7836.2011.04610.x.

## Bibliografía

---

- Lacroix, R., S. Robert, P. Poncelet, and F. Dignat-George. 2010. "Overcoming limitations of microparticle measurement by flow cytometry." *Semin Thromb Hemost* 36 (8):807-18. doi: 10.1055/s-0030-1267034.
- Lacson, E., and N. W. Levin. 2004. "C-reactive protein and end-stage renal disease." *Semin Dial* 17 (6):438-48. doi: 10.1111/j.0894-0959.2004.17604.x.
- Lau, B., A. R. Sharrett, L. A. Kingsley, W. Post, F. J. Palella, B. Visscher, and S. J. Gange. 2006. "C-reactive protein is a marker for human immunodeficiency virus disease progression." *Arch Intern Med* 166 (1):64-70. doi: 10.1001/archinte.166.1.64.
- Lawson, C., J. M. Vicencio, D. M. Yellon, and S. M. Davidson. 2016. "Microvesicles and exosomes: new players in metabolic and cardiovascular disease." *J Endocrinol* 228 (2):R57-71. doi: 10.1530/JOE-15-0201.
- Lechner, D., and A. Weltermann. 2008. "Circulating tissue factor-exposing microparticles." *Thromb Res* 122 Suppl 1:S47-54. doi: 10.1016/S0049-3848(08)70019-7.
- Lee, C. T., Y. T. Lee, H. Y. Ng, T. T. Chiou, C. I. Cheng, C. C. Kuo, C. H. Wu, P. J. Chi, and W. C. Lee. 2012. "Lack of modulatory effect of simvastatin on indoxyl sulfate-induced activation of cultured endothelial cells." *Life Sci* 90 (1-2):47-53. doi: 10.1016/j.lfs.2011.10.014.
- Lee, T. H., E. D'Asti, N. Magnus, K. Al-Nedawi, B. Meehan, and J. Rak. 2011. "Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer--the emerging science of cellular 'debris'." *Semin Immunopathol* 33 (5):455-67. doi: 10.1007/s00281-011-0250-3.
- Lee, W. C., L. C. Li, J. B. Chen, and H. W. Chang. 2015. "Indoxyl sulfate-induced oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and impaired biogenesis are partly protected by vitamin C and N-acetylcysteine." *ScientificWorldJournal* 2015:620826. doi: 10.1155/2015/620826.
- Lehmann, J. M., G. Riethmüller, and J. P. Johnson. 1989. "MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily." *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (24):9891-5.
- Lembo, S., R. Capasso, A. Balato, T. Cirillo, F. Flora, V. Zappia, N. Balato, D. Ingrosso, and F. Ayala. 2014. "MCP-1 in psoriatic patients: effect of biological therapy." *J Dermatolog Treat* 25 (1):83-6. doi: 10.3109/09546634.2013.782091.
- Leroyer, A. S., P. E. Rautou, J. S. Silvestre, Y. Castier, G. Lesèche, C. Devue, M. Duriez, R. P. Brandes, E. Lutgens, A. Tedgui, and C. M. Boulanger. 2008. "CD40 ligand+ microparticles from human atherosclerotic plaques stimulate endothelial proliferation and angiogenesis a potential mechanism for intraplaque neovascularization." *J Am Coll Cardiol* 52 (16):1302-11. doi: 10.1016/j.jacc.2008.07.032.
- Leroyer, A. S., A. Tedgui, and C. M. Boulanger. 2008. "Role of microparticles in atherothrombosis." *J Intern Med* 263 (5):528-37. doi: 10.1111/j.1365-2796.2008.01957.x.
- Ley, K., C. Laudanna, M. I. Cybulsky, and S. Nourshargh. 2007. "Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated." *Nat Rev Immunol* 7 (9):678-89. doi: 10.1038/nri2156.
- Li, M., and T Asahara. 2008. *Use of Endothelial Progenitors to treat ischemia. Cell therapy.* McGraw Hill, Madrid ed.
- Lin, C. J., C. J. Wu, P. C. Wu, C. F. Pan, T. J. Wang, F. J. Sun, H. L. Liu, H. H. Chen, and H. I. Yeh. 2016. "Indoxyl Sulfate Impairs Endothelial Progenitor Cells and Might Contribute to Vascular Dysfunction in Patients with Chronic Kidney Disease." *Kidney Blood Press Res* 41 (6):1025-1036. doi: 10.1159/000452604.
- Lin, J., V. Kakkar, and X. Lu. 2014. "Impact of MCP-1 in atherosclerosis." *Curr Pharm Des* 20 (28):4580-8.

- Loyer, X., A. C. Vion, A. Tedgui, and C. M. Boulanger. 2014. "Microvesicles as cell-cell messengers in cardiovascular diseases." *Circ Res* 114 (2):345-53. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300858.
- Lu, G. Y., R. J. Xu, S. H. Zhang, Q. Qiao, L. Shen, M. Li, D. Y. Xu, and Z. Y. Wang. 2015. "Alteration of circulatory platelet microparticles and endothelial microparticles in patients with chronic kidney disease." *Int J Clin Exp Med* 8 (9):16704-8.
- Luna, C., A. Carmona, M. Alique, J. Carracedo, and R. Ramirez. 2015. "TNF $\alpha$ -Damaged-HUVECs Microparticles Modify Endothelial Progenitor Cell Functional Activity." *Front Physiol* 6:395. doi: 10.3389/fphys.2015.00395.
- M**a, Z. L., X. L. Mai, J. H. Sun, S. H. Ju, X. Yang, Y. Ni, and G. J. Teng. 2009. "Inhibited atherosclerotic plaque formation by local administration of magnetically labeled endothelial progenitor cells (EPCs) in a rabbit model." *Atherosclerosis* 205 (1):80-6. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.07.048.
- Maas, S. L., J. de Vrij, E. J. van der Vlist, B. Geragousian, L. van Bloois, E. Mastrobattista, R. M. Schiffelers, M. H. Wauben, M. L. Broekman, and E. N. Nolte-'t Hoen. 2015. "Possibilities and limitations of current technologies for quantification of biological extracellular vesicles and synthetic mimics." *J Control Release* 200:87-96. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.12.041.
- Maier, C. L., B. R. Shepherd, T. Yi, and J. S. Pober. 2010. "Explant outgrowth, propagation and characterization of human pericytes." *Microcirculation* 17 (5):367-80. doi: 10.1111/j.1549-8719.2010.00038.x.
- Maiwald, S., P. P. Zwetsloot, S. Sivapalaratnam, and G. M. Dallinga-Thie. 2013. "Monocyte gene expression and coronary artery disease." *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 16 (4):411-7. doi: 10.1097/MCO.0b013e32836236f9.
- Mallat, Z., H. Benamer, B. Hugel, J. Benessiano, P. G. Steg, J. M. Freyssinet, and A. Tedgui. 2000. "Elevated levels of shed membrane microparticles with procoagulant potential in the peripheral circulating blood of patients with acute coronary syndromes." *Circulation* 101 (8):841-3.
- Mallat, Z., B. Hugel, J. Ohan, G. Lesèche, J. M. Freyssinet, and A. Tedgui. 1999. "Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity." *Circulation* 99 (3):348-53.
- Mandl, M., S. Schmitz, C. Weber, and M. Hristov. 2014. "Characterization of the CD14<sup>++</sup>CD16<sup>+</sup> monocyte population in human bone marrow." *PLoS One* 9 (11):e112140. doi: 10.1371/journal.pone.0112140.
- Manivannan, J., M. Prashanth, V. Saravana Kumar, M. Shairam, and J. Subburaj. 2016. "Systems biological understanding of the regulatory network and the possible therapeutic strategies for vascular calcification." *Mol Biosyst* 12 (12):3683-3694. doi: 10.1039/c6mb00557h.
- Marlin, S. D., and T. A. Springer. 1987. "Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)." *Cell* 51 (5):813-9.
- Massy, Z. A., V. Metzinger-Le Meuth, and L. Metzinger. 2017. "MicroRNAs Are Associated with Uremic Toxicity, Cardiovascular Calcification, and Disease." *Contrib Nephrol* 189:160-168. doi: 10.1159/000450774.
- Merino, A., P. Buendia, A. Martin-Malo, P. Aljama, R. Ramirez, and J. Carracedo. 2011. "Senescent CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> monocytes exhibit proinflammatory and proatherosclerotic activity." *J Immunol* 186 (3):1809-15. doi: 10.4049/jimmunol.1001866.

## Bibliografía

---

- Merino, A., J. Portolés, R. Selgas, R. Ojeda, P. Buendia, J. Ocaña, M. A. Bajo, G. del Peso, J. Carracedo, R. Ramírez, A. Martín-Malo, and P. Aljama. 2010. "Effect of different dialysis modalities on microinflammatory status and endothelial damage." *Clin J Am Soc Nephrol* 5 (2):227-34. doi: 10.2215/CJN.03260509.
- Meziani, F., A. Tesse, and R. Andriantsitohaina. 2008. "Microparticles are vectors of paradoxical information in vascular cells including the endothelium: role in health and diseases." *Pharmacol Rep* 60 (1):75-84.
- Minciacchi, V. R., M. R. Freeman, and D. Di Vizio. 2015. "Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes." *Semin Cell Dev Biol* 40:41-51. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.02.010.
- Mitchell, P. S., R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogossova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O'Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C. W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin, and M. Tewari. 2008. "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105 (30):10513-8. doi: 10.1073/pnas.0804549105.
- Mizuno, K., T. Toma, H. Tsukiji, H. Okamoto, H. Yamazaki, K. Ohta, Y. Kasahara, S. Koizumi, and A. Yachie. 2005. "Selective expansion of CD16highCCR2- subpopulation of circulating monocytes with preferential production of haem oxygenase (HO)-1 in response to acute inflammation." *Clin Exp Immunol* 142 (3):461-70. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02932.x.
- Mohandas, R., and M. S. Segal. 2010. "Endothelial progenitor cells and endothelial vesicles - what is the significance for patients with chronic kidney disease?" *Blood Purif* 29 (2):158-62. doi: 10.1159/000245643.
- Mombouli, J. V., and P. M. Vanhoutte. 1999. "Endothelial dysfunction: from physiology to therapy." *J Mol Cell Cardiol* 31 (1):61-74. doi: 10.1006/jmcc.1998.0844.
- Morel, O., L. Jesel, J. M. Freyssinet, and F. Toti. 2011. "Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31 (1):15-26. doi: 10.1161/ATVBAHA.109.200956.
- Morrone, D., F. Felice, C. Scatena, A. De Martino, M. L. E. Picoi, N. Mancini, S. Blasi, M. Menicagli, R. Di Stefano, U. Bortolotti, A. G. Naccarato, and A. Balbarini. 2017. "Role of circulating endothelial progenitor cells in the reparative mechanisms of stable ischemic myocardium." *Int J Cardiol*. doi: 10.1016/j.ijcard.2017.05.070.
- Mukai, N., T. Akahori, M. Komaki, Q. Li, T. Kanayasu-Toyoda, A. Ishii-Watabe, A. Kobayashi, T. Yamaguchi, M. Abe, T. Amagasa, and I. Morita. 2008. "A comparison of the tube forming potentials of early and late endothelial progenitor cells." *Exp Cell Res* 314 (3):430-40. doi: 10.1016/j.yexcr.2007.11.016.
- Murasawa, S. 2004. "[Application of endothelial progenitor cell for regenerative medicine]." *Nihon Ronen Igakkai Zasshi* 41 (1):48-50.
- Murohara, T., H. Ikeda, J. Duan, S. Shintani, K. Sasaki, H. Eguchi, I. Onitsuka, K. Matsui, and T. Imaizumi. 2000. "Transplanted cord blood-derived endothelial precursor cells augment postnatal neovascularization." *J Clin Invest* 105 (11):1527-36. doi: 10.1172/JCI8296.
- N**akamura, A., Y. R. Rampersaud, A. Sharma, S. J. Lewis, B. Wu, P. Datta, K. Sundararajan, H. Endisha, E. Rossomacha, J. S. Rockel, I. Jurisica, and M. Kapoor. 2016. "Identification of microRNA-181a-5p and microRNA-4454 as mediators of facet cartilage degeneration." *JCI Insight* 1 (12):e86820. doi: 10.1172/jci.insight.86820.

Newman, P. J., M. C. Berndt, J. Gorski, G. C. White, S. Lyman, C. Paddock, and W. A. Muller. 1990. "PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily." *Science* 247 (4947):1219-22.

Nielsen, C. T., O. Østergaard, C. Johnsen, S. Jacobsen, and N. H. Heegaard. 2011. "Distinct features of circulating microparticles and their relationship to clinical manifestations in systemic lupus erythematosus." *Arthritis Rheum* 63 (10):3067-77. doi: 10.1002/art.30499.

Nielsen, M. H., H. Beck-Nielsen, M. N. Andersen, and A. Handberg. 2014. "A flow cytometric method for characterization of circulating cell-derived microparticles in plasma." *J Extracell Vesicles* 3. doi: 10.3402/jev.v3.20795.

Niwa, T. 2013. "Removal of protein-bound uraemic toxins by haemodialysis." *Blood Purif* 35 Suppl 2:20-5. doi: 10.1159/000350843.

Noci, M. V., R. Ramírez, M. Lluch, M. Rodríguez, and J. Carracedo. 2015. "Changes in endothelial microparticles and endothelial progenitor cells in obese patients in response to surgical stress." *J Bone Joint Surg Am* 97 (5):353-8. doi: 10.2106/JBJS.N.00570.

Nockher, W. A., and J. E. Scherberich. 1998. "Expanded CD14+ CD16+ monocyte subpopulation in patients with acute and chronic infections undergoing hemodialysis." *Infect Immun* 66 (6):2782-90.

Noh, H., S. W. Lee, S. W. Kang, S. K. Shin, K. H. Choi, H. Y. Lee, and D. S. Han. 1998. "Serum C-reactive protein: a predictor of mortality in continuous ambulatory peritoneal dialysis patients." *Perit Dial Int* 18 (4):387-94.

Nowak, G., A. Karrar, C. Holmén, S. Nava, M. Uzunel, K. Hultenby, and S. Sumitran-Holgersson. 2004. "Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2 or Tie-2 on peripheral blood cells defines functionally competent cell populations capable of reendothelialization." *Circulation* 110 (24):3699-707. doi: 10.1161/01.CIR.0000143626.16576.51.

Nucera, S., A. Giustacchini, F. Boccalatte, A. Calabria, C. Fanciullo, T. Plati, A. Raghetti, J. Garcia-Manteiga, D. Cittaro, F. Benedicenti, E. R. Lechman, J. E. Dick, M. Ponzoni, F. Ciceri, E. Montini, B. Gentner, and L. Naldini. 2016. "miRNA-126 Orchestrates an Oncogenic Program in B Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia." *Cancer Cell* 29 (6):905-21. doi: 10.1016/j.ccell.2016.05.007.

**O**rozco, A. F., and D. E. Lewis. 2010. "Flow cytometric analysis of circulating microparticles in plasma." *Cytometry A* 77 (6):502-14. doi: 10.1002/cyto.a.20886.

**P**ark, J. E., H. S. Tan, A. Datta, R. C. Lai, H. Zhang, W. Meng, S. K. Lim, and S. K. Sze. 2010. "Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes." *Mol Cell Proteomics* 9 (6):1085-99. doi: 10.1074/mcp.M900381-MCP200.

Parolini, I., C. Federici, C. Raggi, L. Lugini, S. Palleschi, A. De Milito, C. Coscia, E. Iessi, M. Logozzi, A. Molinari, M. Colone, M. Tatti, M. Sargiacomo, and S. Fais. 2009. "Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells." *J Biol Chem* 284 (49):34211-22. doi: 10.1074/jbc.M109.041152.

Passlick, B., D. Flieger, and H. W. Ziegler-Heitbrock. 1989. "Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood." *Blood* 74 (7):2527-34.

- Patil, S., D. K. Newman, and P. J. Newman. 2001. "Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 serves as an inhibitory receptor that modulates platelet responses to collagen." *Blood* 97 (6):1727-32.
- Patiño, R., J. Ibarra, A. Rodriguez, M. R. Yagüe, E. Pintor, A. Fernandez-Cruz, and A. Figueredo. 2000. "Circulating monocytes in patients with diabetes mellitus, arterial disease, and increased CD14 expression." *Am J Cardiol* 85 (11):1288-91.
- Paudel, K. R., N. Panth, and D. W. Kim. 2016. "Circulating Endothelial Microparticles: A Key Hallmark of Atherosclerosis Progression." *Scientifica (Cairo)* 2016:8514056. doi: 10.1155/2016/8514056.
- Pavkova Goldbergova, M., J. Lipkova, N. Pavek, J. Gatterova, A. Vasku, M. Soucek, and P. Nemeč. 2012. "RANTES, MCP-1 chemokines and factors describing rheumatoid arthritis." *Mol Immunol* 52 (3-4):273-8. doi: 10.1016/j.molimm.2012.06.006.
- Peichev, M., A. J. Naiyer, D. Pereira, Z. Zhu, W. J. Lane, M. Williams, M. C. Oz, D. J. Hicklin, L. Witte, M. A. Moore, and S. Rafii. 2000. "Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors." *Blood* 95 (3):952-8.
- Peng, Y. S., Y. T. Lin, Y. Chen, K. Y. Hung, and S. M. Wang. 2012. "Effects of indoxyl sulfate on adherens junctions of endothelial cells and the underlying signaling mechanism." *J Cell Biochem* 113 (3):1034-43. doi: 10.1002/jcb.23435.
- Prada, I., and J. Meldolesi. 2016. "Binding and Fusion of Extracellular Vesicles to the Plasma Membrane of Their Cell Targets." *Int J Mol Sci* 17 (8). doi: 10.3390/ijms17081296.
- Puri, K. D., E. B. Finger, G. Gaudernack, and T. A. Springer. 1995. "Sialomucin CD34 is the major L-selectin ligand in human tonsil high endothelial venules." *J Cell Biol* 131 (1):261-70.
- R**adziwon-Balicka, A., C. Moncada de la Rosa, and P. Jurasz. 2012. "Platelet-associated angiogenesis regulating factors: a pharmacological perspective." *Can J Physiol Pharmacol* 90 (6):679-88. doi: 10.1139/y2012-036.
- Ramirez, R., J. Carracedo, I. Berdud, D. Carretero, A. Merino, M. Rodríguez, C. Tetta, A. Martín-Malo, and P. Aljama. 2006. "Microinflammation in hemodialysis is related to a preactivated subset of monocytes." *Hemodial Int* 10 Suppl 1:S24-7. doi: 10.1111/j.1542-4758.2006.01186.x.
- Ramirez, R., J. Carracedo, A. Merino, S. Nogueras, M. A. Alvarez-Lara, M. Rodríguez, A. Martín-Malo, C. Tetta, and P. Aljama. 2007. "Microinflammation induces endothelial damage in hemodialysis patients: the role of convective transport." *Kidney Int* 72 (1):108-13. doi: 10.1038/sj.ki.5002250.
- Ramírez, R., J. Carracedo, A. Merino, S. Soriano, R. Ojeda, M. A. Alvarez-Lara, A. Martín-Malo, and P. Aljama. 2011. "CD14+CD16+ monocytes from chronic kidney disease patients exhibit increased adhesion ability to endothelial cells." *Contrib Nephrol* 171:57-61. doi: 10.1159/000327134.
- Ramírez, R., J. Carracedo, S. Soriano, R. Jiménez, A. Martín-Malo, M. Rodríguez, M. Blasco, and P. Aljama. 2005. "Stress-induced premature senescence in mononuclear cells from patients on long-term hemodialysis." *Am J Kidney Dis* 45 (2):353-9.
- Raposo, G., and W. Stoorvogel. 2013. "Extracellular vesicles: exosomes, microvesicles, and friends." *J Cell Biol* 200 (4):373-83. doi: 10.1083/jcb.201211138.

## Bibliografía

---

- Rautou, P. E., A. C. Vion, N. Amabile, G. Chironi, A. Simon, A. Tedgui, and C. M. Boulanger. 2011. "Microparticles, vascular function, and atherothrombosis." *Circ Res* 109 (5):593-606. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.233163.
- Redondo, S., C. G. Santos-Gallego, and T. Tejerina. 2007. "TGF-beta1: a novel target for cardiovascular pharmacology." *Cytokine Growth Factor Rev* 18 (3-4):279-86. doi: 10.1016/j.cytogfr.2007.04.005.
- Ren, X., W. Mou, C. Su, X. Chen, H. Zhang, B. Cao, X. Li, D. Wu, X. Ni, J. Gui, and C. Gong. 2017. "Increase in Peripheral Blood Intermediate Monocytes is Associated with the Development of Recent-Onset Type 1 Diabetes Mellitus in Children." *Int J Biol Sci* 13 (2):209-218. doi: 10.7150/ijbs.15659.
- Reyes, M., A. Dudek, B. Jahagirdar, L. Koodie, P. H. Marker, and C. M. Verfaillie. 2002. "Origin of endothelial progenitors in human postnatal bone marrow." *J Clin Invest* 109 (3):337-46. doi: 10.1172/JCI14327.
- Rogacev, K. S., B. Cremers, A. M. Zawada, S. Seiler, N. Binder, P. Ege, G. Große-Dunker, I. Heisel, F. Hornof, J. Jeken, N. M. Rebling, C. Ulrich, B. Scheller, M. Böhm, D. Fliser, and G. H. Heine. 2012. "CD14++CD16+ monocytes independently predict cardiovascular events: a cohort study of 951 patients referred for elective coronary angiography." *J Am Coll Cardiol* 60 (16):1512-20. doi: 10.1016/j.jacc.2012.07.019.
- Rogacev, K. S., S. Seiler, A. M. Zawada, B. Reichart, E. Herath, D. Roth, C. Ulrich, D. Fliser, and G. H. Heine. 2011. "CD14++CD16+ monocytes and cardiovascular outcome in patients with chronic kidney disease." *Eur Heart J* 32 (1):84-92. doi: 10.1093/eurheartj/ehq371.
- Ross, R. 1999. "Atherosclerosis--an inflammatory disease." *N Engl J Med* 340 (2):115-26. doi: 10.1056/NEJM199901143400207.
- Ross, R., and J. A. Glomset. 1973. "Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: Proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis." *Science* 180 (4093):1332-9.
- Ruggeri, Z. M. 2007. "Von Willebrand factor: looking back and looking forward." *Thromb Haemost* 98 (1):55-62.
- Safaei, R., B. J. Larson, T. C. Cheng, M. A. Gibson, S. Otani, W. Naerdemann, and S. B. Howell. 2005. "Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells." *Mol Cancer Ther* 4 (10):1595-604. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-05-0102.
- Salven, P., S. Mustjoki, R. Alitalo, K. Alitalo, and S. Rafii. 2003. "VEGFR-3 and CD133 identify a population of CD34+ lymphatic/vascular endothelial precursor cells." *Blood* 101 (1):168-72. doi: 10.1182/blood-2002-03-0755.
- Sambrook, P. N., C. J. Chen, L. March, I. D. Cameron, R. G. Cumming, S. R. Lord, J. M. Simpson, and M. J. Seibel. 2006. "High bone turnover is an independent predictor of mortality in the frail elderly." *J Bone Miner Res* 21 (4):549-55. doi: 10.1359/jbmr.060104.
- Schaper, W., and D. Scholz. 2003. "Factors regulating arteriogenesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23 (7):1143-51. doi: 10.1161/01.ATV.0000069625.11230.96.
- Schattman, G. C. 2004. "Adult bone marrow-derived hemangioblasts, endothelial cell progenitors, and EPCs." *Curr Top Dev Biol* 64:141-80. doi: 10.1016/S0070-2153(04)64007-5.

- Scheubel, R. J., H. Zorn, R. E. Silber, O. Kuss, H. Morawietz, J. Holtz, and A. Simm. 2003. "Age-dependent depression in circulating endothelial progenitor cells in patients undergoing coronary artery bypass grafting." *J Am Coll Cardiol* 42 (12):2073-80.
- Schiffrin, E. L., M. L. Lipman, and J. F. Mann. 2007. "Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system." *Circulation* 116 (1):85-97. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.106.678342.
- Schiro, A., F. L. Wilkinson, R. Weston, J. V. Smyth, F. Serracino-Inglott, and M. Y. Alexander. 2014. "Endothelial microparticles as conveyors of information in atherosclerotic disease." *Atherosclerosis* 234 (2):295-302. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.019.
- Schmid, M. C., and J. A. Varner. 2009. "Circulating endothelial progenitor cells." *Methods Mol Biol* 467:139-55.
- Schmidt, D. E., M. Manca, and I. E. Hoefer. 2015. "Circulating endothelial cells in coronary artery disease and acute coronary syndrome." *Trends Cardiovasc Med* 25 (7):578-87. doi: 10.1016/j.tcm.2015.01.013.
- Schmidt-Lucke, C., L. Rössig, S. Fichtlscherer, M. Vasa, M. Britten, U. Kämper, S. Dimmeler, and A. M. Zeiher. 2005. "Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair." *Circulation* 111 (22):2981-7. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.104.504340.
- Schober, A., M. Nazari-Jahantigh, Y. Wei, K. Bidzhekov, F. Gremse, J. Grommes, R. T. Megens, K. Heyll, H. Noels, M. Hristov, S. Wang, F. Kiessling, E. N. Olson, and C. Weber. 2014. "MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1." *Nat Med* 20 (4):368-76. doi: 10.1038/nm.3487.
- Schwartz, R. E., M. Reyes, L. Koodie, Y. Jiang, M. Blackstad, T. Lund, T. Lenvik, S. Johnson, W. S. Hu, and C. M. Verfaillie. 2002. "Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells." *J Clin Invest* 109 (10):1291-302. doi: 10.1172/JCI15182.
- Sellam, J., V. Proulle, A. Jüngel, M. Ittah, C. Miceli Richard, J. E. Gottenberg, F. Toti, J. Benessiano, S. Gay, J. M. Freyssinet, and X. Mariette. 2009. "Increased levels of circulating microparticles in primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis and relation with disease activity." *Arthritis Res Ther* 11 (5):R156. doi: 10.1186/ar2833.
- Sen, S., S. P. McDonald, P. T. Coates, and C. S. Bonder. 2011. "Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease." *Clin Sci (Lond)* 120 (7):263-83. doi: 10.1042/CS20100429.
- Shedden, K., X. T. Xie, P. Chandaroy, Y. T. Chang, and G. R. Rosania. 2003. "Expulsion of small molecules in vesicles shed by cancer cells: association with gene expression and chemosensitivity profiles." *Cancer Res* 63 (15):4331-7.
- Sheppard, D. 2004. "Roles of alphav integrins in vascular biology and pulmonary pathology." *Curr Opin Cell Biol* 16 (5):552-7. doi: 10.1016/j.ceb.2004.06.017.
- Shi, Q., S. Rafii, M. H. Wu, E. S. Wijelath, C. Yu, A. Ishida, Y. Fujita, S. Kothari, R. Mohle, L. R. Sauvage, M. A. Moore, R. F. Storb, and W. P. Hammond. 1998. "Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells." *Blood* 92 (2):362-7.
- Shi, Q., H. D. Wu, L. R. Sauvage, K. R. Durante, M. Patel, A. R. Wechezak, S. Kaplan, and M. Walker. 1990. "Re-endothelialization of isolated segments of the canine carotid artery with reference to the possible role of the adventitial vasa vasorum." *J Vasc Surg* 12 (4):476-85; discussion 485-7.



- Shigematsu, T., T. Sonou, M. Ohya, K. Yokoyama, H. Yoshida, T. Yokoo, K. Okuda, A. R. Masumoto, Y. Iwashita, K. Iseki, S. Kunimoto, and Y. Yamano. 2017. "Preventive Strategies for Vascular Calcification in Patients with Chronic Kidney Disease." *Contrib Nephrol* 189:169-177. doi: 10.1159/000452310.
- Shimizu, H., D. Bolati, A. Adijiang, A. Enomoto, F. Nishijima, M. Dateki, and T. Niwa. 2010. "Senescence and dysfunction of proximal tubular cells are associated with activated p53 expression by indoxyl sulfate." *Am J Physiol Cell Physiol* 299 (5):C1110-7. doi: 10.1152/ajpcell.00217.2010.
- Shimizu, H., D. Bolati, A. Adijiang, G. Muteliefu, A. Enomoto, F. Nishijima, M. Dateki, and T. Niwa. 2011. "NF- $\kappa$ B plays an important role in indoxyl sulfate-induced cellular senescence, fibrotic gene expression, and inhibition of proliferation in proximal tubular cells." *Am J Physiol Cell Physiol* 301 (5):C1201-12. doi: 10.1152/ajpcell.00471.2010.
- Shiojima, I., and K. Walsh. 2006. "Regulation of cardiac growth and coronary angiogenesis by the Akt/PKB signaling pathway." *Genes Dev* 20 (24):3347-65. doi: 10.1101/gad.1492806.
- Sima, A. V., C. S. Stancu, and M. Simionescu. 2009. "Vascular endothelium in atherosclerosis." *Cell Tissue Res* 335 (1):191-203. doi: 10.1007/s00441-008-0678-5.
- Sinning, J. M., J. Losch, K. Walenta, M. Böhm, G. Nickenig, and N. Werner. 2011. "Circulating CD31+/Annexin V+ microparticles correlate with cardiovascular outcomes." *Eur Heart J* 32 (16):2034-41. doi: 10.1093/eurheartj/ehq478.
- Smalley, D. M., N. E. Sheman, K. Nelson, and D. Theodorescu. 2008. "Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer." *J Proteome Res* 7 (5):2088-96. doi: 10.1021/pr700775x.
- Smirnov, I. V., I. V. Gryazeva, M. P. Samoilovich, and V. B. Klimovich. 2015. "[Endoglin (CD105)--a target for visualization and anti-angiogenic therapy for malignant tumors]." *Vopr Onkol* 61 (6):898-907.
- Soriano, S., A. Carmona, F. Triviño, M. Rodriguez, M. Alvarez-Benito, A. Martín-Malo, M. A. Alvarez-Lara, R. Ramírez, P. Aljama, and J. Carracedo. 2014. "Endothelial damage and vascular calcification in patients with chronic kidney disease." *Am J Physiol Renal Physiol* 307 (11):F1302-11. doi: 10.1152/ajprenal.00114.2014.
- Sosnoski, D. M., B. S. Emanuel, A. L. Hawkins, P. van Tuinen, D. H. Ledbetter, R. L. Nussbaum, F. T. Kaos, E. Schwartz, D. Phillips, and J. S. Bennett. 1988. "Chromosomal localization of the genes for the vitronectin and fibronectin receptors alpha subunits and for platelet glycoproteins IIb and IIIa." *J Clin Invest* 81 (6):1993-8. doi: 10.1172/JCI113548.
- Stansfield, B. K., and D. A. Ingram. 2015. "Clinical significance of monocyte heterogeneity." *Clin Transl Med* 4:5. doi: 10.1186/s40169-014-0040-3.
- Staupe, H., S. Jeske, K. Schmitz, G. Warncke, and D. C. Fischer. 2013. "Cardiovascular risk and mineral bone disorder in patients with chronic kidney disease." *Kidney Blood Press Res* 37 (1):68-83. doi: 10.1159/000343402.
- Steffel, J., and T. F. Lüscher. 2009. "Predicting the development of atherosclerosis." *Circulation* 119 (7):919-21. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.846725.
- Stellos, K., and M. Gawaz. 2007. "Platelets and stromal cell-derived factor-1 in progenitor cell recruitment." *Semin Thromb Hemost* 33 (2):159-64. doi: 10.1055/s-2007-969029.
- Stellos, K., H. Langer, K. Daub, T. Schoenberger, A. Gauss, T. Geisler, B. Bigalke, I. Mueller, M. Schumm, I. Schaefer, P. Seizer, B. F. Kraemer, D. Siegel-Axel, A. E. May, S. Lindemann, and M. Gawaz. 2008. "Platelet-derived stromal cell-derived factor-1 regulates adhesion and promotes differentiation of human CD34+ cells to endothelial progenitor cells." *Circulation* 117 (2):206-15. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.107.714691.

Stenvinkel, P., and A. Alvestrand. 2002. "Inflammation in end-stage renal disease: sources, consequences, and therapy." *Semin Dial* 15 (5):329-37.

Stockinger, H., S. J. Gadd, R. Eher, O. Majdic, W. Schreiber, W. Kasinrerck, B. Strass, E. Schnabl, and W. Knapp. 1990. "Molecular characterization and functional analysis of the leukocyte surface protein CD31." *J Immunol* 145 (11):3889-97.

Strehlow, K., N. Werner, J. Berweiler, A. Link, U. Dirnagl, J. Priller, K. Laufs, L. Ghaeni, M. Milosevic, M. Böhm, and G. Nickenig. 2003. "Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation." *Circulation* 107 (24):3059-65. doi: 10.1161/01.CIR.0000077911.81151.30.

Sudano, I., A. Viridis, S. Taddei, L. Spieker, R. Corti, G. Noll, A. Salvetti, and T. F. Luscher. 2007. "Chronic treatment with long-acting nifedipine reduces vasoconstriction to endothelin-1 in essential hypertension." *Hypertension* 49 (2):285-90. doi: 10.1161/01.HYP.0000254645.33321.a3.

**T**akahashi, T., S. Kobayashi, N. Fujino, T. Suzuki, C. Ota, Y. Tando, M. He, M. Yamada, S. Kurosawa, M. Yamaya, and H. Kubo. 2013. "Differences in the released endothelial microparticle subtypes between human pulmonary microvascular endothelial cells and aortic endothelial cells in vitro." *Exp Lung Res* 39 (4-5):155-61. doi: 10.3109/01902148.2013.784932.

Tepper, O. M., R. D. Galiano, J. M. Capla, C. Kalka, P. J. Gagne, G. R. Jacobowitz, J. P. Levine, and G. C. Gurtner. 2002. "Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures." *Circulation* 106 (22):2781-6.

Terrisse, A. D., N. Puech, S. Allart, P. Gourdy, J. M. Xuereb, B. Payrastre, and P. Sié. 2010. "Internalization of microparticles by endothelial cells promotes platelet/endothelial cell interaction under flow." *J Thromb Haemost* 8 (12):2810-9. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.04088.x.

Tesfamariam, B., and A. F. DeFelice. 2007. "Endothelial injury in the initiation and progression of vascular disorders." *Vascul Pharmacol* 46 (4):229-37. doi: 10.1016/j.vph.2006.11.005.

Thum, T., and M. Mayr. 2012. "Review focus on the role of microRNA in cardiovascular biology and disease." *Cardiovasc Res* 93 (4):543-4. doi: 10.1093/cvr/cvs085.

Théry, C., S. Amigorena, G. Raposo, and A. Clayton. 2006. "Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids." *Curr Protoc Cell Biol* Chapter 3:Unit 3.22. doi: 10.1002/0471143030.cb0322s30.

Tian, T., Y. L. Zhu, Y. Y. Zhou, G. F. Liang, Y. Y. Wang, F. H. Hu, and Z. D. Xiao. 2014. "Exosome uptake through clathrin-mediated endocytosis and macropinocytosis and mediating miR-21 delivery." *J Biol Chem* 289 (32):22258-67. doi: 10.1074/jbc.M114.588046.

Tondreau, T., N. Meuleman, A. Delforge, M. Dejeneffe, R. Leroy, M. Massy, C. Mortier, D. Bron, and L. Lagneaux. 2005. "Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity." *Stem Cells* 23 (8):1105-12. doi: 10.1634/stemcells.2004-0330.

Tramontano, A. F., R. Lyubarova, J. Tsiakos, T. Palaia, J. R. Deleon, and L. Ragolia. 2010. "Circulating endothelial microparticles in diabetes mellitus." *Mediators Inflamm* 2010:250476. doi: 10.1155/2010/250476.

Tramontano, A. F., J. O'Leary, A. D. Black, R. Muniyappa, M. V. Cutaia, and N. El-Sherif. 2004. "Statin decreases endothelial microparticle release from human coronary artery

endothelial cells: implication for the Rho-kinase pathway." *Biochem Biophys Res Commun* 320 (1):34-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2004.05.127.

Trappenburg, M. C., M. van Schilfgaarde, F. C. Frerichs, H. M. Spronk, H. ten Cate, C. W. de Fijter, W. E. Terpstra, and A. Leyte. 2012. "Chronic renal failure is accompanied by endothelial activation and a large increase in microparticle numbers with reduced procoagulant capacity." *Nephrol Dial Transplant* 27 (4):1446-53. doi: 10.1093/ndt/gfr474.

Trzepizur, W., M. C. Martinez, P. Priou, R. Andriantsitohaina, and F. Gagnadoux. 2014. "Microparticles and vascular dysfunction in obstructive sleep apnoea." *Eur Respir J* 44 (1):207-16. doi: 10.1183/09031936.00197413.

Tso, C., G. Martinic, W. H. Fan, C. Rogers, K. A. Rye, and P. J. Barter. 2006. "High-density lipoproteins enhance progenitor-mediated endothelium repair in mice." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 (5):1144-9. doi: 10.1161/01.ATV.0000216600.37436.cf.

Tual-Chalot, S., F. Gagnadoux, W. Trzepizur, P. Priou, R. Andriantsitohaina, and M. C. Martinez. 2014. "Circulating microparticles from obstructive sleep apnea syndrome patients induce endothelin-mediated angiogenesis." *Biochim Biophys Acta* 1842 (2):202-7. doi: 10.1016/j.bbadis.2013.11.017.

Tumur, Z., and T. Niwa. 2009. "Indoxyl sulfate inhibits nitric oxide production and cell viability by inducing oxidative stress in vascular endothelial cells." *Am J Nephrol* 29 (6):551-7. doi: 10.1159/000191468.

**U**rich, C., G. H. Heine, M. K. Gerhart, H. Köhler, and M. Girndt. 2008. "Proinflammatory CD14+CD16+ monocytes are associated with subclinical atherosclerosis in renal transplant patients." *Am J Transplant* 8 (1):103-10. doi: 10.1111/j.1600-6143.2007.02035.x.

Urrea, X., N. Villamor, S. Amaro, M. Gómez-Choco, V. Obach, L. Oleaga, A. M. Planas, and A. Chamorro. 2009. "Monocyte subtypes predict clinical course and prognosis in human stroke." *J Cereb Blood Flow Metab* 29 (5):994-1002. doi: 10.1038/jcbfm.2009.25.

**V**aladi, H., K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J. J. Lee, and J. O. Lötvall. 2007. "Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells." *Nat Cell Biol* 9 (6):654-9. doi: 10.1038/ncb1596.

Valencia-Nuñez, D. M., W. Kreutler, J. Moya-Gonzalez, P. Alados-Arboledas, I. Muñoz-Carvajal, A. Carmona, R. Ramirez-Chamond, and J. Carracedo-Añon. 2017. "Endothelial vascular markers in coronary surgery." *Heart Vessels* 32 (11):1390-1399. doi: 10.1007/s00380-017-1006-3.

Valenti, R., V. Huber, P. Filipazzi, L. Pilla, G. Sovena, A. Villa, A. Corbelli, S. Fais, G. Parmiani, and L. Rivoltini. 2006. "Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes." *Cancer Res* 66 (18):9290-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-1819.

van der Pol, E., A. N. Böing, E. L. Gool, and R. Nieuwland. 2016. "Recent developments in the nomenclature, presence, isolation, detection and clinical impact of extracellular vesicles." *J Thromb Haemost* 14 (1):48-56. doi: 10.1111/jth.13190.

van der Pol, E., A. N. Böing, P. Harrison, A. Sturk, and R. Nieuwland. 2012. "Classification, functions, and clinical relevance of extracellular vesicles." *Pharmacol Rev* 64 (3):676-705. doi: 10.1124/pr.112.005983.

van der Pol, E., F. A. Coumans, A. E. Grootemaat, C. Gardiner, I. L. Sargent, P. Harrison, A. Sturk, T. G. van Leeuwen, and R. Nieuwland. 2014. "Particle size distribution of exosomes and microvesicles determined by transmission electron microscopy, flow cytometry,

- nanoparticle tracking analysis, and resistive pulse sensing." *J Thromb Haemost* 12 (7):1182-92. doi: 10.1111/jth.12602.
- van Ierssel, S. H., E. M. Van Craenenbroeck, V. M. Conraads, V. F. Van Tendeloo, C. J. Vrints, P. G. Jorens, and V. Y. Hoymans. 2010. "Flow cytometric detection of endothelial microparticles (EMP): effects of centrifugation and storage alter with the phenotype studied." *Thromb Res* 125 (4):332-9. doi: 10.1016/j.thromres.2009.12.019.
- Vanholder, R., R. De Smet, G. Glorieux, A. Argilés, U. Baurmeister, P. Brunet, W. Clark, G. Cohen, P. P. De Deyn, R. Deppisch, B. Descamps-Latscha, T. Henle, A. Jörres, H. D. Lemke, Z. A. Massy, J. Passlick-Deetjen, M. Rodriguez, B. Stegmayr, P. Stenvinkel, C. Tetta, C. Wanner, W. Zidek, and European Uremic Toxin Work Group (EUTox). 2003. "Review on uremic toxins: classification, concentration, and interindividual variability." *Kidney Int* 63 (5):1934-43. doi: 10.1046/j.1523-1755.2003.00924.x.
- VanWijk, M. J., E. VanBavel, A. Sturk, and R. Nieuwland. 2003. "Microparticles in cardiovascular diseases." *Cardiovasc Res* 59 (2):277-87.
- Vasa, M., S. Fichtlscherer, A. Aicher, K. Adler, C. Urbich, H. Martin, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler. 2001. "Number and migratory activity of circulating endothelial progenitor cells inversely correlate with risk factors for coronary artery disease." *Circ Res* 89 (1):E1-7.
- Verma, S., P. E. Szmitko, and E. T. Yeh. 2004. "C-reactive protein: structure affects function." *Circulation* 109 (16):1914-7. doi: 10.1161/01.CIR.0000127085.32999.64.
- Volger, O. L., J. O. Fledderus, N. Kisters, R. D. Fontijn, P. D. Moerland, J. Kuiper, T. J. van Berkel, A. P. Bijlens, M. J. Daemen, H. Pannekoek, and A. J. Horrevoets. 2007. "Distinctive expression of chemokines and transforming growth factor-beta signaling in human arterial endothelium during atherosclerosis." *Am J Pathol* 171 (1):326-37.
- W**eber, J. A., D. H. Baxter, S. Zhang, D. Y. Huang, K. H. Huang, M. J. Lee, D. J. Galas, and K. Wang. 2010. "The microRNA spectrum in 12 body fluids." *Clin Chem* 56 (11):1733-41. doi: 10.1373/clinchem.2010.147405.
- Werner, N., S. Wassmann, P. Ahlers, S. Kosiol, and G. Nickenig. 2006. "Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26 (1):112-6. doi: 10.1161/01.ATV.0000191634.13057.15.
- White, W. E., M. M. Yaqoob, and S. M. Harwood. 2015. "Aging and uremia: Is there cellular and molecular crossover?" *World J Nephrol* 4 (1):19-30. doi: 10.5527/wjn.v4.i1.19.
- Wildgruber, M., T. Aschenbrenner, H. Wendorff, M. Czubba, A. Glinzer, B. Haller, M. Schiemann, A. Zimmermann, H. Berger, H. H. Eckstein, R. Meier, W. A. Wohlgemuth, P. Libby, and A. Zerneck. 2016. "The "Intermediate" CD14(++)CD16(+) monocyte subset increases in severe peripheral artery disease in humans." *Sci Rep* 6:39483. doi: 10.1038/srep39483.
- Willekens, F. L., J. M. Werre, J. K. Kruijt, B. Roerdinkholder-Stoelwinder, Y. A. Groenen-Döpp, A. G. van den Bos, G. J. Bosman, and T. J. van Berkel. 2005. "Liver Kupffer cells rapidly remove red blood cell-derived vesicles from the circulation by scavenger receptors." *Blood* 105 (5):2141-5. doi: 10.1182/blood-2004-04-1578.
- Williams, M. S., H. L. Rogers, N. Y. Wang, and R. C. Ziegelstein. 2014. "Do platelet-derived microparticles play a role in depression, inflammation, and acute coronary syndrome?" *Psychosomatics* 55 (3):252-60. doi: 10.1016/j.psym.2013.09.004.

Wilson, P. W., L. I. Kauppila, C. J. O'Donnell, D. P. Kiel, M. Hannan, J. M. Polak, and L. A. Cupples. 2001. "Abdominal aortic calcific deposits are an important predictor of vascular morbidity and mortality." *Circulation* 103 (11):1529-34.

Wolf, P. 1967. "The nature and significance of platelet products in human plasma." *Br J Haematol* 13 (3):269-88.

Woodfin, A., M. B. Voisin, and S. Nourshargh. 2007. "PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27 (12):2514-23. doi: 10.1161/ATVBAHA.107.151456.

Wu, H., H. Chen, and P. C. Hu. 2007. "Circulating endothelial cells and endothelial progenitors as surrogate biomarkers in vascular dysfunction." *Clin Lab* 53 (5-6):285-95.

Wuchter, C., R. Ratei, G. Spahn, C. Schoch, J. Harbott, S. Schnittger, T. Haferlach, U. Creutzig, C. Sperling, L. Karawajew, and W. D. Ludwig. 2001. "Impact of CD133 (AC133) and CD90 expression analysis for acute leukemia immunophenotyping." *Haematologica* 86 (2):154-61.

**X**ie, R. F., P. Hu, Z. C. Wang, J. Yang, Y. M. Yang, L. Gao, H. H. Fan, and Y. M. Zhu. 2015. "Platelet-derived microparticles induce polymorphonuclear leukocyte-mediated damage of human pulmonary microvascular endothelial cells." *Transfusion* 55 (5):1051-7. doi: 10.1111/trf.12952.

Xu, L., B. F. Yang, and J. Ai. 2013. "MicroRNA transport: a new way in cell communication." *J Cell Physiol* 228 (8):1713-9. doi: 10.1002/jcp.24344.

**Y**ang, C., C. Gagnon, X. Hou, and P. Hardy. 2010. "Low density lipoprotein receptor mediates anti-VEGF effect of lymphocyte T-derived microparticles in Lewis lung carcinoma cells." *Cancer Biol Ther* 10 (5):448-56.

Yang, C., B. R. Mwaikambo, T. Zhu, C. Gagnon, J. Lafleur, S. Seshadri, P. Lachapelle, J. C. Lavoie, S. Chemtob, and P. Hardy. 2008. "Lymphocytic microparticles inhibit angiogenesis by stimulating oxidative stress and negatively regulating VEGF-induced pathways." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294 (2):R467-76. doi: 10.1152/ajpregu.00432.2007.

Yang, S. W., R. R. Hennessy, S. Khosla, R. Lennon, D. Loeffler, T. Sun, Z. Liu, K. H. Park, F. L. Wang, L. O. Lerman, and A. Lerman. 2017. "Circulating osteogenic endothelial progenitor cell counts: new biomarker for the severity of coronary artery disease." *Int J Cardiol* 227:833-839. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.10.036.

Yin, A. H., S. Miraglia, E. D. Zanjani, G. Almeida-Porada, M. Ogawa, A. G. Leary, J. Olweus, J. Kearney, and D. W. Buck. 1997. "AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells." *Blood* 90 (12):5002-12.

Yin, M., X. Loyer, and C. M. Boulanger. 2015. "Extracellular vesicles as new pharmacological targets to treat atherosclerosis." *Eur J Pharmacol* 763 (Pt A):90-103. doi: 10.1016/j.ejphar.2015.06.047.

Yong, P. J., C. H. Koh, and W. S. Shim. 2013. "Endothelial microparticles: missing link in endothelial dysfunction?" *Eur J Prev Cardiol* 20 (3):496-512. doi: 10.1177/2047487312445001.

Yuana, Y., A. Sturk, and R. Nieuwland. 2013. "Extracellular vesicles in physiological and pathological conditions." *Blood Rev* 27 (1):31-9. doi: 10.1016/j.blre.2012.12.002.

- Zhang, H., L. J. Wang, D. L. Si, C. Wang, J. C. Yang, P. Jiang, C. Du, and J. J. Wang. 2015. "Correlation between osteocalcin-positive endothelial progenitor cells and spotty calcification in patients with coronary artery disease." *Clin Exp Pharmacol Physiol* 42 (7):734-9. doi: 10.1111/1440-1681.12366.
- Zhao, C., H. Zhang, W. C. Wong, X. Sem, H. Han, S. M. Ong, Y. C. Tan, W. H. Yeap, C. S. Gan, K. Q. Ng, M. B. Koh, P. Kourilsky, S. K. Sze, and S. C. Wong. 2009. "Identification of novel functional differences in monocyte subsets using proteomic and transcriptomic methods." *J Proteome Res* 8 (8):4028-38. doi: 10.1021/pr900364p.
- Ziegler-Heitbrock, H. W. 2000. "Definition of human blood monocytes." *J Leukoc Biol* 67 (5):603-6.
- Ziegler-Heitbrock, L. 2007. "The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation." *J Leukoc Biol* 81 (3):584-92. doi: 10.1189/jlb.0806510.
- Ziegler-Heitbrock, L., P. Ancuta, S. Crowe, M. Dalod, V. Grau, D. N. Hart, P. J. Leenen, Y. J. Liu, G. MacPherson, G. J. Randolph, J. Scherberich, J. Schmitz, K. Shortman, S. Sozzani, H. Strobl, M. Zembala, J. M. Austyn, and M. B. Lutz. 2010. "Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood." *Blood* 116 (16):e74-80. doi: 10.1182/blood-2010-02-258558.
- Zwicker, J. I., H. A. Liebman, D. Neuberg, R. Lacroix, K. A. Bauer, B. C. Furie, and B. Furie. 2009. "Tumor-derived tissue factor-bearing microparticles are associated with venous thromboembolic events in malignancy." *Clin Cancer Res* 15 (22):6830-40. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0371.







# ANEXO I

---







ANEXO I. Informe factor de impacto y cuartil del Journal Citation Reports (SCI y/o SSCI) o de las bases de datos de referencia del área en el que se encuentran las publicaciones presentadas.

**Primer artículo:**

Translational Physiology

*Am J Physiol Renal Physiol* 307: F1302–F1311, 2014.  
First published October 22, 2014; doi:10.1152/ajprenal.00114.2014.

TRANSLATIONAL PHYSIOLOGY |

Endothelial damage and vascular calcification in patients with chronic kidney disease

Sagrario Soriano,<sup>1,2,4\*</sup> Andrés Carmona,<sup>1,2,4\*</sup> Francisco Triviño,<sup>3</sup> Mariano Rodríguez,<sup>1,2,4</sup> Marina Alvarez-Benito,<sup>3</sup> Alejandro Martín-Malo,<sup>1,2,4</sup> Maria-Antonia Alvarez-Lara,<sup>1,2,4</sup> Rafael Ramírez,<sup>1,4,5</sup> Pedro Aljama,<sup>1,2,4</sup> and Julia Carracedo<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba, Reina Sofía University Hospital, University of Córdoba, Córdoba, Spain; <sup>2</sup>Nephrology Unit, Reina Sofía University Hospital, Córdoba, Spain; <sup>3</sup>Radiology Unit, Reina Sofía University Hospital, Córdoba, Spain; <sup>4</sup>RETICs Red Renal (Instituto de Salud Carlos III), Madrid, Spain; and <sup>5</sup>Biología de Sistemas Department Módulo II-Planta B, Alcalá de Henares University, Madrid, Spain

JCR Impact Factor						
JCR Year	PHYSIOLOGY			UROLOGY & NEPHROLOGY		
	Rank	Quartile	JIF Percentile	Rank	Quartile	JIF Percentile
2016	17/84	Q1	80.357	15/77	Q1	81.169
2015	20/83	Q1	76.506	15/77	Q1	81.169
2014	22/83	Q2	74.096	17/78	Q1	78.846

ESI Total Citations	
JCR Year	CLINICAL MEDICINE
2016	130/2029-Q1
2015	122/2012-Q1
2014	113/1975-Q1

Segundo artículo:



AMERICAN JOURNAL of PHYSIOLOGY  
Renal Physiology®

Markers of endothelial damage in patients with chronic kidney disease on hemodialysis

Andrés Carmona, María L. Agüera, Carlos Luna-Ruiz, Paula Buendía, Laura Calleros, Andrea García-Jerez, Manuel Rodríguez-Puyol, Manuel Arias, Marta Arias-Guillen, Gabriel de Arriba, Jose Ballarín, Carmen Bernis, Elvira Fernández, Sagrario García-Rebollo, Javier Mancha, Gloria del Peso, Estefanía Pérez, Esteban Poch, Jose M. Portolés, Diego Rodríguez-Puyol, Rafael Sánchez-Villanueva, Felipe Sarro, Armando Torres, Alejandro Martín-Malo, Pedro Aljama, Rafael Ramírez, Julia Carracedo

American Journal of Physiology - Renal Physiology Published 1 April 2017 Vol. 312 no. 4, F673-F681 DOI: 10.1152/ajprenal.00013.2016

JCR Impact Factor						
JCR Year	PHYSIOLOGY			UROLOGY & NEPHROLOGY		
	Rank	Quartile	JIF Percentile	Rank	Quartile	JIF Percentile
2016	17/84	Q1	80.357	15/77	Q1	81.169
2015	20/83	Q1	76.506	15/77	Q1	81.169
2014	22/83	Q2	74.096	17/78	Q1	78.846

ESI Total Citations	
JCR Year	CLINICAL MEDICINE
2016	130/2029-Q1
2015	122/2012-Q1
2014	113/1975-Q1

Tercer artículo:



Vascular Physiology

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE

Front. Physiol., 08 September 2017 | <https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00666>



# Microvesicles Derived from Indoxyl Sulfate Treated Endothelial Cells Induce Endothelial Progenitor Cells Dysfunction

Andres Carmona<sup>1†</sup>, Fatima Guerrero<sup>1††</sup>, Paula Buendia<sup>1</sup>, Teresa Obrero<sup>1</sup>, Pedro Aljama<sup>1,2,3</sup> and Julia Carracedo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Maimonides Institute of Biomedical Research of Cordoba, Cordoba, Spain

<sup>2</sup>Department of Nephrology, Nephrology Service, Reina Sofia University Hospital, Cordoba, Spain

<sup>3</sup>RETICs Red Renal, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

<sup>4</sup>Department of Animal Physiology II, Faculty of Biology, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

JCR Impact Factor			
JCR Year	PHYSIOLOGY		
	Rank	Quartile	JIF Percentile
2016	15/84	Q1	82.738
2015	14/83	Q1	83.735
2014	20/83	Q1	76.506

ESI Total Citations	
JCR Year	BIOLOGY & BIOCHEMISTRY
2016	111/422-Q2
2015	130/416-Q2
2014	166/412-Q2

**Producción Científica:**

1. Fatima Guerrero, Andres Carmona, Rosa Ortega, Sagrario Cañadillas, Rodolfo Crespo, Concha Herrera, Pedro Aljama. Relevance of Protein Content within the Renal Scaffold for Kidney Bioengineering and Regeneration. *J. Biomedical Science and Engineering*. 2017;vol. 10, (No. 11), pp:506-526.

2. Diaz-Tocados JM, Peralta-Ramirez A, Rodríguez-Ortiz ME, Raya AI, Lopez I, Pineda C, Herencia C, Montes de Oca A, Vergara N, Stepan S, Pendon-Ruiz de Mier MV, Buendía P, Carmona A, Carracedo J, Alcalá-Díaz JF, Frazao J, Martínez-Moreno JM, Canalejo A, Felsenfeld A, Rodriguez M, Aguilera-Tejero E, Almadén Y, Muñoz-Castañeda JR. Dietary magnesium supplementation prevents and reverses vascular and soft tissue calcifications in uremic rats. *Kidney Int*. 2017;92(5):1084-1099. Q1

3. Valencia-Nuñez DM, Kreutler W, Moya-Gonzalez J, Alados-Arboledas P, Muñoz-Carvajal I, Carmona A, Ramirez-Chamond R, Carracedo-Añon J. Endothelial vascular markers in coronary surgery. *Heart Vessels*. 2017;32(11):1390-1399. Q2

4. Ojeda López R, Esquivias de Motta E, Carmona A, García Montemayor V, Berdud I, Martín Malo A, Aljama García P. Correction of 25-OH-vitamin D deficiency improves control of secondary hyperparathyroidism and reduces the inflammation in stable haemodialysis patients. *Nefrologia*. 2017 pii: S0211-6995(17)30131-5. Q4

5. Alique M, Ruíz-Torres MP, Bodega G, Noci MV, Troyano N, Bohórquez L, Luna C, Luque R, Carmona A, Carracedo J, Ramírez R. Microvesicles from the plasma of elderly subjects and from senescent endothelial cells promote vascular calcification. *Aging (Albany NY)*. 2017;9(3):778-789. Q2

6. Agüera ML, Hurtarte AR, Álvarez de Lara MA, Aumente MD, Carmona A, Carracedo J, Aljama P, Rodríguez Benot A. Donor-Specific Antibodies After Starting Hemodialysis in Nonrenal Solid Organ Transplant Recipients: Role of TH17. *Transplant Proc*. 2016;48(9):2920-2923. Q4



7. Luna C, **Carmona A\***, Alique M, Carracedo J, Ramirez R. TNF $\alpha$ -Damaged-HUVECs Microparticles Modify Endothelial Progenitor Cell Functional Activity. *Front Physiol.* 2015;6:395. \*SHARED FIRST AUTHORSHIP. Q1