



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Remodelat vascular a les malalties pulmonars: perfil d'expressió gènica i biomarcadors

Jéssica Garcia Lucio

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Remodelat vascular a les malalties pulmonars: perfil d'expressió gènica i biomarcadors

Tesi presentada per

Jéssica García Lucio

per optar al títol de Doctora per la Universitat de Barcelona

Dirigida per:

Dr. Joan Albert Barberà

Dr. Víctor I. Peinado

Tutor: Dr. Joan Albert Barberà

Programa de doctorat de Medicina i Recerca Translacional
Universitat de Barcelona, 2017



B:KC Barcelona
Knowledge
Campus

Campus d'Excel·lència Internacional

*A mis padres,
mi pareja y
mis hijos*

ÍNDEX

ABREVIATURES	I
INTRODUCCIÓ	1
1.- MARC CONCEPTUAL: MALALTIA PULMONAR OBSTRUCTIVA CRÒNICA (MPOC) I HIPERTENSIÓ PULMONAR (HP)	3
1.1.- ALTERACIONS VASCULARS DE LA CIRCULACIÓ PULMONAR EN LA MPOC I LA HP	5
1.1.1.- <i>Remodelat vascular</i>	6
1.1.1.1.- Principals factors de creixement i citocines implicats en el remodelat vascular pulmonar.....	9
1.1.1.1.1.- Sistema angiopoietines (ANGPTs) - Tie2.....	9
1.1.1.1.2.- Família del factor de creixement endotelial vascular (VEGF)	11
1.1.1.1.3.- Família del factor transformant de creixement β -1 (TGF- β 1).....	12
1.1.1.1.4.- Família del factor de creixement dels fibroblasts (FGF).....	12
1.1.1.1.5.- Factor de necrosis tumoral alpha (TNF α).....	12
1.1.1.1.6.- El paper de la matriu extracel·lular en el remodelat vascular pulmonar.....	13
1.1.2.- <i>Disfunció endotelial</i>	13
2.- NECESSITAT DE BIOMARCADORS A LA MPOC I LA HP	15
2.1.- CÈL·LULES PROGENITORES ENDOTELIALS (CPEs).....	16
2.1.1.- <i>Mobilització i alliberament de CPEs</i>	16
2.1.2.- <i>Identificació de les CPEs</i>	17
2.1.3.- <i>Marcadors per detectar les CPEs</i>	19
2.1.4.- <i>Funcions de les CPEs</i>	19
2.1.5.- <i>CPEs en condicions fisiològiques</i>	20
2.1.6.- <i>CPEs en diferents situacions clíniques</i>	20
2.1.6.1- CPEs i disfunció endotelial.....	20
2.1.6.2- CPEs i tabac.....	20
2.1.6.3- CPEs i MPOC	21
2.1.6.4- CPEs i HP.....	21
2.2.- MICROPARTÍCULES	21
2.2.1.- <i>Formació de les MPs</i>	23
2.2.1.1.- Formació de MPs com a resposta a activació cel·lular.....	23
2.2.1.2.- Formació de MPs com a resposta a dany cel·lular (apoptosi)	23
2.2.2.- <i>Identificació de MPs</i>	24
2.2.3.- <i>Funcions de les MPs</i>	25
2.2.4.- <i>MPs d'origen endotelial (EMPs)</i>	26
2.2.4.1.- Marcadors per detectar les EMPs	26
2.2.4.2.- EMPs en condicions fisiològiques.....	28
2.2.4.3.- EMPs en diferents situacions clíniques.....	28
2.2.4.3.1.- EMPs i disfunció endotelial.....	28
2.2.4.3.2.- EMPs i tabac.....	29
2.2.4.3.3.- EMPs i MPOC	29
2.2.4.3.4.- EMPs i HP.....	30
HIPÒTESIS	31
OBJECTIUS	35
RESULTATS	39
DISCUSSIÓ	59
CONCLUSIONS	71
BIBLIOGRAFIA	75
AGRAÏMENTS	97

ABREVIATURES

ANGPTs	Angiopoietines
BMPR2	Bone Morphogenetic Protein Receptor, type II
BNP	Brain Natriuretic Peptide
CEs	Cèl·lules Endotelials
CMLs	Cèl·lules Musculars Llises
CPEs	Cèl·lules Progenitores Endotelials
DL _{co}	Capacitat de Difusió del Monòxid de Carboni
EMPs	Endothelial Microparticles
eNOS	Òxid Nítric Sintasa Endotelial
FEV ₁	Forced Expiratory Volume in 1 second
FGF	Fibroblast Growth Factor
GOLD	Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease
HP	Hipertensió Pulmonar
HSC	Hematopoietic Stem Cell
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
KDR	Kinase insert Domain Receptor
MCAM	Melanoma Cell Adhesion Molecule
MPOC	Malaltia Pulmonar Obstructiva Crònica
MMPs	Metaloproteïnases de la Matriu
PAPm	Mean Pulmonary Artery Pressure
PAWP	Pulmonary Arterial Wedge Pressure
PECAM-1	Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
PPP	Poor Platelet Plasma
PIGF	Placental Growth Factor
TGF- β 1	Transforming Growth Factor
TIMPs	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TNF α	Tumor Necrosis Factor
UFC	Unitats Formadores de Colònies
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

INTRODUCCIÓ

1.- Marc conceptual: malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC) i hipertensió pulmonar (HP)

La malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC) es caracteritza per la progressiva limitació al flux aeri, que no és completament reversible amb broncodilatadors, dispnea, tos crònica i producció de moc¹. Estudis recents descriuen la MPOC com la tercera causa de mort arreu del món². El tractament pot millorar els símptomes i minimitzar els futurs danys, però no altera la progressió de la malaltia. La principal causa de la MPOC és l'exposició activa al fum de tabac^{3,4}. Factors com l'edat d'inici i el nombre de paquets/any són determinants en el desenvolupament de la malaltia⁵. Tot i això, existeixen altres factors de risc importants en l'aparició de la MPOC; com factors genètics (dèficit de l'enzim α -1-antitripsina)⁶, l'exposició a la contaminació ambiental i a l'inhalació de partícules i gasos nocius⁷, així com l'exposició a la pol·lució de l'aire derivat de la biomassa cremada⁸. Es calcula que entre un 25-50% dels pacients amb MPOC en estadis GOLD 3 i 4 presenten també hipertensió pulmonar associada^{9,10}.

La hipertensió pulmonar (HP) és un trastorn hemodinàmic definit per l'augment anòmal de la pressió arterial pulmonar mitjana (PAPm) ≥ 25 mmHg en repòs, avaluada mitjançant cateterisme cardíac dret¹¹. Els principals símptomes són la dispnea, fatiga, debilitat i angina. Normalment, aquests símptomes van acompanyats d'una progressiva disfunció del ventricle dret¹¹. La classificació clínica de la HP intenta categoritzar múltiples condicions clíniques en 5 grups segons la seva presentació clínica, la patologia, les característiques hemodinàmiques i el tractament (Taula 1).

Taula 1. Nomenclatura i classificació de la HP

1. Hipertensió arterial pulmonar (HAP)

- 1.1 Idiopàtica
- 1.2 Hereditària
 - 1.2.1 Mutació de BMPR2
 - 1.2.2 Altres mutacions
- 1.3 Induïda per toxines i drogues
- 1.4 Associada a:
 - 1.4.1 Malalties del teixit connectiu
 - 1.4.2 Infecció per VIH
 - 1.4.3 Hipertensió portal
 - 1.4.4 Malalties cardíagues congènites

Introducció

1.4.5 Esquistosomiasis

1'. Malaltia pulmonar veno-oclusiva i/o hemangiomatosi capil·lar pulmonar

1'.1 Idiopàtica

1'.2 Hereditària

1'.2.1 Mutació de EIF2AK4

1'.2.2 Altres mutacions

1'.3 Induïda per toxines, drogues i radiacions

1'.4 Associada a:

1'.4.1 Malalties del teixit connectiu

1'.4.2 Infecció per VIH

1''. Hipertensió pulmonar persistent del nouat

2. Hipertensió pulmonar associada a malaltia cardíaca esquerra

2.1 Disfunció sistòlica ventricular esquerra

2.2 Disfunció diastòlica ventricular esquerra

2.3 Malaltia valvular

2.4 Obstrucció congènita/adquirida del cor esquerre i cardiomiopaties congènites

2.5 Estenosi congènita/adquirida de les venes pulmonars

3. Hipertensió pulmonar associada a malalties respiratòries i/o hipòxia

3.1 Malaltia pulmonar obstructiva crònica

3.2 Malaltia pulmonar intersticial

3.3 Altres malalties pulmonars amb patró restrictiu i obstructiu

3.4 Desordres respiratoris de la son

3.5 Desordres de la hipoventilació alveolar

3.6 Exposició crònica a grans alçades

3.7 Anormalitats del desenvolupament

4. Hipertensió pulmonar tromboembòlica crònica i altres obstruccions de l'artèria pulmonar

4.1 Hipertensió pulmonar tromboembòlica crònica

4.2 Altres obstruccions de l'artèria pulmonar

4.2.1 Angiosarcoma

4.2.2 Altres tumors intravasculars

4.2.3 Arteritis

4.2.4 Estenosi congènita de les artèries pulmonars

4.2.4 Paràsits

5. Hipertensió pulmonar de causa poc clara i/o mecanismes multifactorials

5.1 Trastorns hematològics: anèmia hemolítica crònica, desordres mieloproliferatius i esplenectomia.

5.2 Desordres sistèmics: sarcoïdosis, histiocitosi pulmonar, limfangioleiomiomatosis i neurofibromatosis.

5.3 Desordres metabòlics: Malaltia de l'emmagatzematge del glicògen, malaltia de Gaucher i desordres de tiroïdes.

5.4 Altres: microangiopatia trombòtica tumoral pulmonar, mediastinitis fibròtica, fallada renal crònica (amb/sense diàlisi) i hipertensió pulmonar segmentària.

Adaptació de: 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension¹¹.

L'informació sobre l'incidència de la HP a nivell mundial és pobre. Al Regne Unit es va calcular una prevalença de 97 casos per milió i una proporció de dones:homes de 1.8¹¹. La causa més comú de HP són les malalties cardíaques esquerres i en segon lloc les malalties respiratòries cròniques. Avui dia es disposa de tractament farmacològic per la HAP, el qual, pot ajudar a reduir els símptomes i reduir la progressió de la malaltia, però no la cura¹².

La presència de HP associada a la MPOC és una complicació greu que es presenta en alguns pacients amb MPOC en estadi avançat. En la MPOC, la supervivència es relaciona inversament amb el valor de la PAP¹³ (Figura 1).

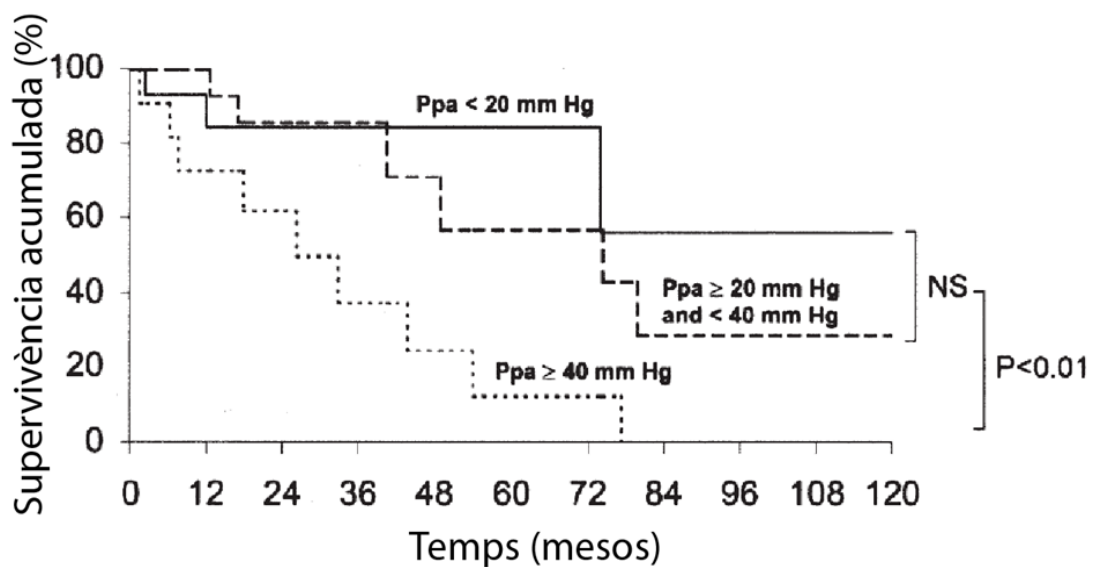


Figura 1. Índex de supervivència segons el valor de pressió arterial pulmonar (PAP)¹³.

1.1.- Alteracions vasculars de la circulació pulmonar en la MPOC i la HP

Durant molts anys, la via aèria en les malalties respiratòries ha estat el centre d'atenció en la clínica. Amb el temps, s'ha vist l'importància de les alteracions vasculars en el trastorn de l'intercanvi de gasos o afectacions cardíaques secundàries. En aquesta línia, les principals alteracions vasculars de la circulació pulmonar en la MPOC i la HP són el remodelat vascular i la disfunció endotelial.

Introducció

1.1.1.- Remodelat vascular

El remodelat vascular és un procés actiu en el que s'altera l'estructura dels vasos del sistema vascular, el qual, està format principalment per artèries i venes. Les artèries són conductes membranosos i elàstics encarregades de distribuir la sang per l'organisme. Cada artèria muscular consta de 3 capes (Figura 2):

Capa interna o íntima: està en contacte directe amb la sang del lumen. Constituïda per l'endoteli (cèl·lules endotelials i pericits), una capa subendotelial i la làmina elàstica interna.

Capa mitja o mitja: formada majoritàriament per fibres musculars llises disposades de forma concèntrica, fibres elàstiques, fibres de col·lagen i la làmina elàstica externa. La proporció d'aquestes fibres depèn del tipus de vas.

Capa externa o adventícia: constituïda per teixit conjuntiu lax, fibroblasts i col·lagen.

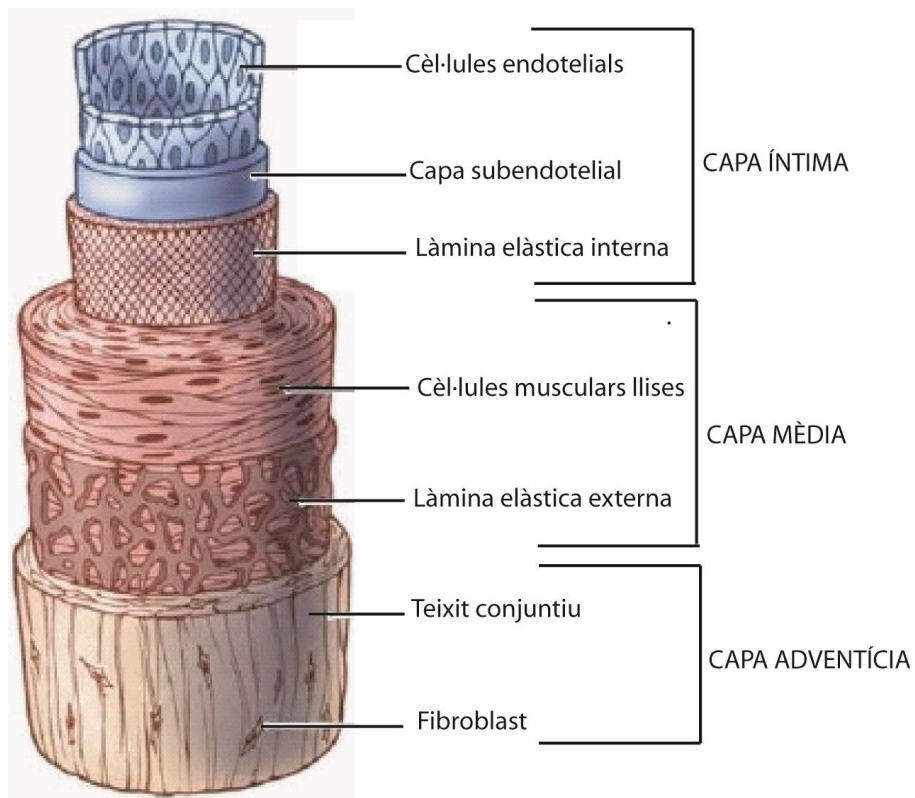


Figura 2. Estructura de les artèries musculars. Figura adaptada del llibre *Harrison. Principios de Medicina Interna*. Kasper et al.,¹⁴.

L'alteració d'aquesta estructura es porta a terme mitjançant el creixement, mort, proliferació i migració cel·lular així com la producció o degradació de la matriu extracel·lular. Tots aquests processos venen regulats dinàmicament per l'interacció de diversos factors de creixement, substàncies vasoactives i estímuls hemodinàmics¹⁵⁻¹⁷. Aquesta alteració pot afectar a qualsevol tipus de vas i òrgan, tot i que en aquesta Tesi Doctoral ens centrarem en el remodelat vascular pulmonar.

El remodelat vascular pulmonar és un procés patològic caracteritzat per un engruiximent de la capa íntima, media i/o adventícia de les artèries i arterioles, reduïnt el diàmetre del lumen i, conseqüentment, augmentant la resistència al flux sanguini¹⁸⁻²⁰ (Figura 3). Aquest engruiximent és degut a la hipertròfia (creixement cel·lular) i la hiperplàsia (proliferació) de les cèl·lules predominants de cada capa així com a un increment de l'acumulació de components de la matriu extracel·lular¹⁸.

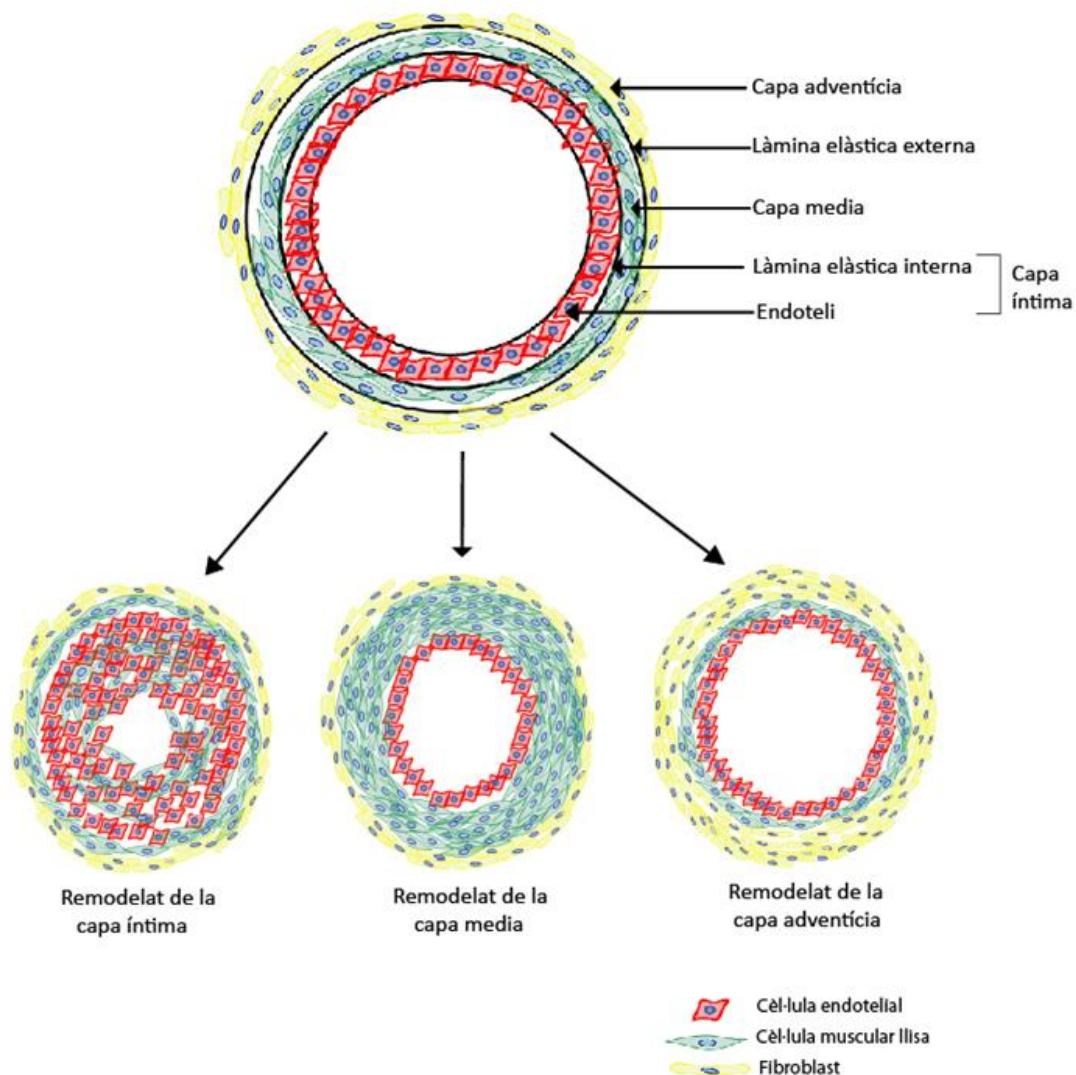


Figura 3. Tall transversal d'una artèria normal i les 3 formes de remodelat vascular.

Introducció

Estudis previs del nostre grup van demostrar que l'engruiximent de la capa íntima de les artèries pulmonars és un dels trets més característics en el remodelat vascular pulmonar dels malalts amb MPOC²¹. Aquest engruiximent de la capa íntima és degut a una proliferació de cèl·lules musculars llises (CML) dediferenciades (α -actina⁺/desmina⁻) o cèl·lules miofibroblàstiques, així com a l'acumulació de proteïnes de la matriu extracel·lular (Figura 4).

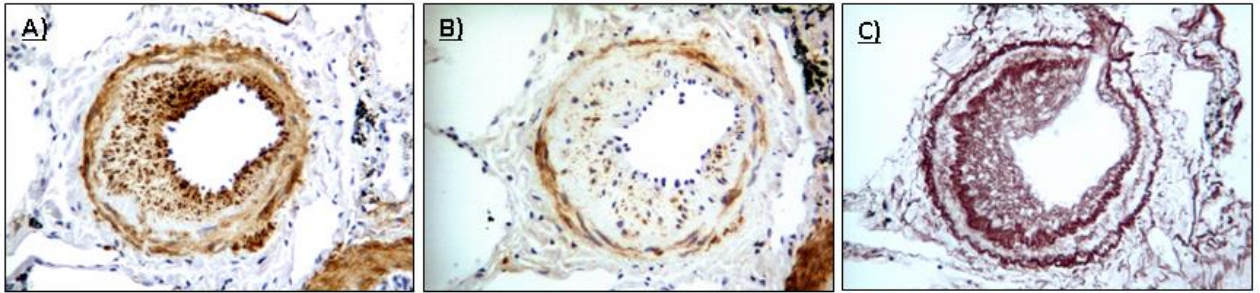


Figura 4. Tall transversal d'una artèria pulmonar remodelada d'un pacient amb MPOC. A) Immunotinció amb anticòs monoclonal contra α -actina de múscul llis (marcatge positiu), B) immunotinció amb anticòs monoclonal contra desmina (marcatge negatiu) i C) tinció d'orceïna que revela l'acumulació de fibres elàstiques de la capa íntima.

A part de la proliferació de les CMLs, les artèries dels pacients amb algunes formes de HP també pateixen lesions plexiformes formades per una excessiva proliferació de cèl·lules endotelials (CEs) que oclueixen la llum vascular^{18,22}. A més, també s'ha vist que les cèl·lules progenitores endotelials (CPEs) disfuncionals poden estar implicades en processos de remodelat vascular²³. En aquest sentit, estudis previs del nostre grup han demostrat la presència de CPEs derivades del moll de l'os en les artèries pulmonars de pacients amb MPOC, les quals, semblen contribuir tant a la reparació endotelial com a la patogènesi del remodelat vascular pulmonar²⁴.

El remodelat de les artèries vasculars pulmonars no és un fet exclusiu dels pacients amb MPOC i/o HP. Estudis del nostre grup han posat de manifest l'hiperplàsia de la capa íntima i muscularització de petites artèries pulmonars en fumadors amb funció pulmonar normal²¹.

Diferents estudis han demostrat que durant el remodelat vascular pulmonar s'alliberen diversos factors de creixement i citocines que poden contribuir a la patogènesi del remodelat vascular^{25,26}. Aquests estudis han evidenciat el procés

d'angiogènesi com l'iniciador del remodelat vascular, contribuint així a la progressió de malalties respiratòries cròniques com la MPOC i la HP.

1.1.1.1.- Principals factors de creixement i citocines implicats en el remodelat vascular pulmonar

Actualment els factors de creixement angiogènics i citocines més relacionats amb el remodelat vascular són els següents:

1.1.1.1.1.- Sistema angiopoietines (ANGPTs) - Tie2: Es coneixen 4 proteïnes d'ANGPTs, (ANGPT-1 fins la ANGPT-4), totes elles tenen una estructura similar però es secreten per diferents tipus cel·lulars i tenen diferents funcions dins la vasculatura²⁷. El receptor de les ANGPTs és el Tie-2 (també conegut com TEK), el qual, pertany a la família dels receptors tirosin quinasa²⁸.

L'ANGPT-1 és sintetitzada i secretada de manera constitutiva per les CMLs, els pericits que envolten i suporten les CEs, fibroblasts i cèl·lules tumorals²⁷. La unió de l'ANGPT-1 amb el receptor Tie-2 a la superfície de les CEs indueix l'activació de la via de senyalització PI3K-AKT, la qual, promou la migració, supervivència, formació de tubs de les CEs i el manteniment de les unions cel·lulars, prevenint així la permeabilitat endotelial²⁹ (Figura 5). A més, aquesta unió indueix a les CEs a reclutar fibroblasts i/o CMLs, promovent l'estabilitat i l'estat quiescent dels vasos³⁰. Estudis en ratolins deficientes en ANGPT-1 i/o Tie-2 moren durant la gestació degut a problemes d'integritat vascular³¹, mentre que la sobreexpressió d'ANGPT-1 en ratolins provoca un augment del diàmetres dels vasos, els quals, contenen un major nombre de CEs i estan excessivament recoberts per pericits³².

L'ANGPT-2 és sintetitzada per les CEs i emmagatzemada als cossos de Weibel-Palade que alliberen l'ANGPT-2 en resposta a diferents estímuls, com inflamació i/o hipòxia³³ (Figura 5). En la literatura hi ha certes discrepàncies sobre si l'ANGPT-2 actua com agonista del receptor Tie-2 o com antagonista. Donada aquesta situació, es va concloure el paper dual de l'ANGPT-2 com agonista/antagonista depenent del tipus cel·lular i el teixit examinat. Per tant, l'ANGPT-2 es comporta com agonista parcial del receptor Tie-2, induïnt els mateixos processos biològics que l'ANGPT-1 però en un nivell molt més reduït, i es comporta com un antagonista parcial del Tie-2 bloquejant la

Introducció

seva unió amb l'ANGPT-1³⁴. El paper de l'ANGPT-2 en la vasculatura està relacionat amb el remodelat vascular postnatal³⁵, desenvolupament limfàtic i com a agent pro-inflamatori³⁶. En el remodelat vascular postnatal, l'ANGPT-2 afavoreix la dissociació dels pericits dels vasos amb el consegüent increment de la permeabilitat vascular, facilitant així l'infiltració de proteases i citocines. L'infiltració d'aquestes molècules desestabilitza l'estat quiescent de la vasculatura donant lloc a l'inici de l'angiogènesi en presència de factors de creixement com per exemple el VEGF-A²⁹. L'ANGPT-2, en resposta a TNF α , també promou el reclutament de leucòcits mitjançant un augment de l'expressió de les molècules d'adhesió ICAM-1 i VCAM-1 a les CE³⁷ (Figura 6).

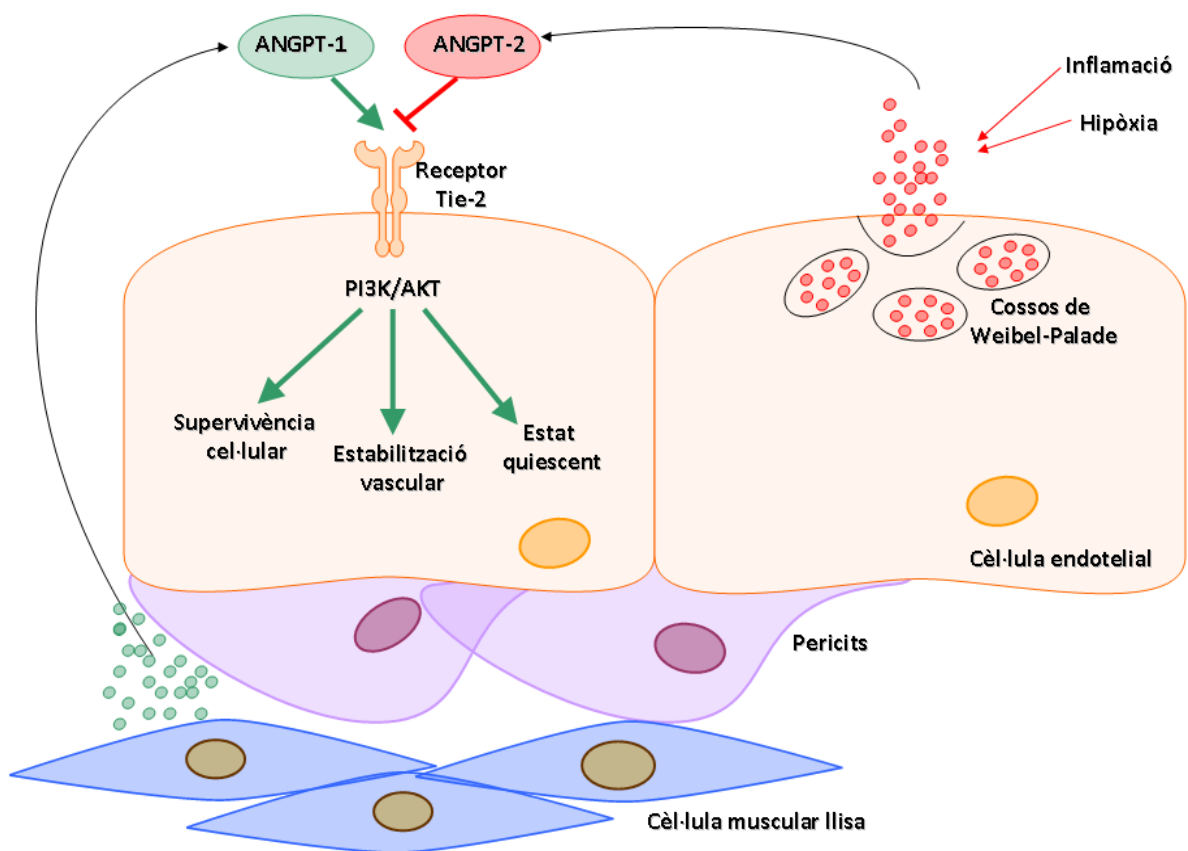


Figura 5. Representació esquemàtica de les funcions de l'ANGPT-1 i l'ANGPT-2.

Els ratolins deficientes en ANGPT-2 es desenvolupen fins l'edat adulta, tot i que tenen defectes vasculars i limfàtics persistents i poca resposta inflamatòria³⁸. Contràriament, la sobreexpressió embrionària sistèmica d'ANGPT-2 causa letalitat embrionària³⁹.

Per tant, els nivells d'ANGPT-1 i d'ANGPT-2 representen l'equilibri entre l'endoteli vascular en repòs i activat/inflamat (Figura 6). L'alteració d'aquest equilibri pot donar lloc a malalties cròniques inflamatòries com la MPOC i la HP.

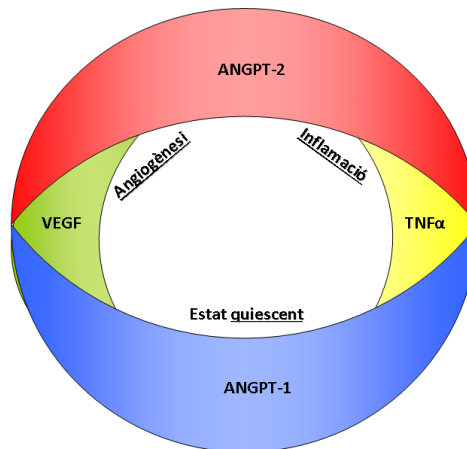


Figura 6. Representació de l'equilibri entre l'ANGPT-1 i l'ANGPT-2 i la relació amb el VEGF i el TNFα.

L'ANGPT-3 i L'ANGPT-4 no són tan conegudes com l'ANGPT-1 i l'ANGPT-2. En ratolí, l'ANGPT-3 està expressada de manera elevada a cor, ronyó i testicles, mentre que en humà, l'ANGPT-4 està expressada als pulmons. Estudis *in vitro*, demostren que l'ANGPT-3 i l'ANGPT-4 indueixen supervivència i migració de les CEs⁴⁰.

1.1.1.1.2.- Família del factor de creixement endotelial vascular (VEGF): Es coneixen 7 molècules de VEGF (VEGF-A fins VEGF-E i PIGF-1 i PIGF-2).

Aquesta família és la principal reguladora de l'angiogènesi i limfagiogènesi durant el desenvolupament vascular i la neovascularització en adults⁴¹. El VEGF actua sobre diferents tipus cel·lulars, però sobretot a les CEs. La unió del VEGF amb el seu receptor VEGF-R2 indueix la formació de nous vasos, regula la permeabilitat vascular i indueix la migració, proliferació i supervivència de les CEs^{41,42}. S'han observat nivells elevats de VEGF durant el desenvolupament embrionari, on conjuntament amb altres factors de creixement, controlen la formació de nous vasos. Per exemple, el VEGF treballa conjuntament amb l'ANGPT-2. En presència de VEGF, l'ANGPT-2 promou l'angiogènesi mentre que en absència de VEGF, l'ANGPT-2 dona lloc a regressió vascular⁴². Com a conseqüència, la inhibició del VEGF en ratolins augmenta la letalitat embrionària degut a problemes circulatoris⁴². L'expressió de VEGF disminueix

Introducció

significativament després de nèixer, però s'observen nivells elevats en teixits que pateixen dany i remodelat vascular⁴¹.

1.1.1.1.3.- Família del factor transformant de creixement β -1 (TGF- β 1): estudis previs del nostre grup han posat de manifest el paper del TGF- β 1 i el seu receptor TGF- β R2 en la maduració dels vasos sanguinis mitjançant la inhibició de la proliferació de les CEs i induïnt la diferenciació de les CMLs i l'acumulació de components de la matriu extracel·lular⁴³. El TGF- β 1 també té un paper clau en la inducció de l'*epithelial to mesenchymal transition* (EnMT)⁴⁴. En aquest sentit, estudis *in vitro* del nostre grup⁴⁵, van demostrar que la via del TGF- β 1 juga un paper clau en la migració i diferenciació de les CPEs a CML-like contribuint al remodelat vascular⁴⁵. També s'ha observat el paper dual del TGF- β 1: per una banda activa l'acció de diferents metaloproteïnases de la matriu (MMPs; MMP1, MMP2 i MMP9) afavorint la migració i la invasió de la matriu extracel·lular de les CEs⁴⁶, però per altra banda, també està implicat en la formació dels filaments intermedis i la reorganització del citoesquelet⁴⁷.

1.1.1.1.4.- Família del factor de creixement dels fibroblasts (FGF): els FGFs estan implicats en la regulació de la proliferació, migració i diferenciació cel·lular durant el desenvolupament embrionari⁴⁸. En l'adult, els FGFs actuen com a factors homeostàtics i contribueixen a la reparació tissular⁴⁹. Però els FGFs també estan relacionats amb la proteòlisi de components de la matriu extracel·lular i la inducció de la síntesi de col·lagen, fibronectina i proteoglicans per part de les CEs, demostrant així els seus efectes en el remodelat durant l'angiogènesi⁴⁹. A més a més, s'ha observat que els FGFs promouen la producció endògena de VEGF⁵⁰.

1.1.1.1.5.- Factor de necrosis tumoral alpha (TNF α): el TNF α és una citocina important en la modulació de la resposta immune. Està implicada en l'increment de la permeabilitat vascular, la proliferació de fibroblasts, regulació de l'inflamació, angiogènesi i remodelat tissular, entre d'altres⁵¹. Diferents estudis han descrit nivells incrementats de TNF α en diferents malalties inflamatòries pulmonars com MPOC, dany agut pulmonar, fibrosis pulmonar intersticial i síndrome de distrés respiratori agut^{52,53}. Tot i que el TNF α juga un paper important en la patogènesi de la MPOC, els antagonistes de TNF α han mostrat una eficàcia clínica limitada⁵⁴.

1.1.1.1.6.- El paper de la matriu extracel·lular en el remodelat vascular pulmonar

La proteòlisi i reorganització de la matriu extracel·lular és un procés important en el remodelat vascular. Les metaloproteïnases de la matriu (MMPs) són una família de proteases que degraden la matriu extracel·lular i proteïnes del teixit connectiu⁵⁵. L'efecte proteolític de les MMPs juga un paper important en el remodelat vascular, migració cel·lular i angiogènesi⁵⁶. En condicions fisiològiques, els inhibidors de les MMPs anomenats TIMPs proporcionen un mecanisme d'equilibri per prevenir una degradació excessiva de la matriu extracel·lular. Alteracions d'aquest equilibri poden donar lloc a un increment de l'activitat de les MMPs donant lloc a canvis estructurals patològics dels vasos associats a malalties vasculares⁵⁷. S'ha vist que factors que promouen el remodelat dels vasos incrementen l'activitat de les MMPs⁵⁷. També s'ha descrit el paper de les MMPs en l'angiogènesi; afavorint la separació dels pericits dels vasos mitjançant l'alliberació de factors de creixement continguts a la matriu extracel·lular (com VEGF, FGF o TGF- β 1) i la desestabilització de les adhesions cel·lulars⁵⁶. Els nivells plasmàtics i l'activitat de les MMP-2, MMP-9 i el receptor TIMP-1 s'han trobat incrementats en pacients hipertensos⁵⁸.

1.1.2.- Disfunció endotelial

La disfunció endotelial és un dels trets més característics dels pacients amb MPOC i HP⁵⁹⁻⁶¹. L'endoteli pulmonar té un paper clau en l'homeostasi vascular a l'alliberar agents vasodilatadors (com l'òxid nítric o la prostaciclina) i vasoconstrictors (com l'endotelina-1 o l'angiotensina)⁶². La disfunció endotelial s'entén com un desequilibri de la síntesi o alliberació d'aquests agents. Però a més, també un desequilibri en els nivells d'altres mediadors com activadors de la proliferació de CMLs *versus* inhibidors, senyals pro-inflamatòries *versus* anti-inflamatòries i substàncies pro-trombòtiques *versus* anti-trombòtiques, donant lloc a un excés de vasoconstricció, hiperplàsia de les CMLs i remodelat vascular pulmonar⁵⁹ (Figura 7). L'hipoxèmia, el tabac, l'inflamació i l'estrès mecànic són els factors més involucrats en l'inducció de canvis en el fenotip de les CE⁶³ (Figura 7).

Introducció

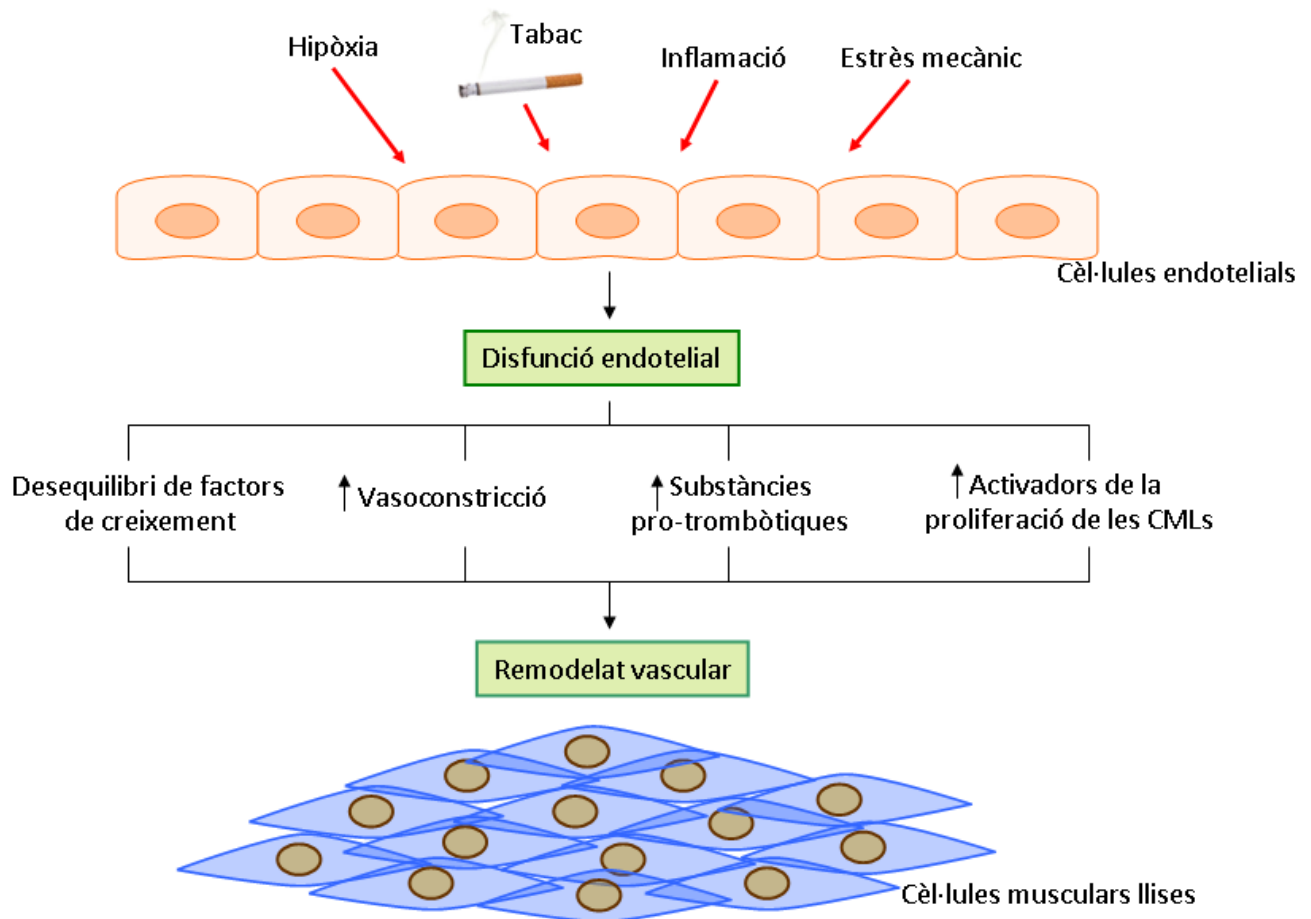


Figura 7. Fisiopatologia de la disfunció endotelial.

Dinh-Xuan *et al.*, van ser els primers en demostrar que l'endoteli de les artèries pulmonars de pacients amb MPOC eren disfuncionants⁶⁴. Estudis del nostre grup també han posat de manifest la disfunció endotelial pulmonar en pacients amb MPOC moderada que no estan hipoxèmics⁶⁵, així com una disminució de l'expressió de l'enzim òxid nítric sintasa endotelial (eNOS) en les artèries pulmonars de subjectes fumadors amb funció pulmonar normal⁶⁶. Recentment, el nostre grup també ha demostrat que, tant els malalts amb MPOC com els subjectes fumadors, pateixen disfunció vascular⁶⁰. A més, els pacients amb MPOC amb sospita de HP tenen una vasodilatació depenent de l'endoteli més baixa que aquells sense HP⁶⁰. De fet, s'ha descrit una reducció de l'expressió d'eNOS⁶⁷ i un increment de l'expressió d'endotelina-1⁶⁸ en les artèries pulmonars de pacients amb HP.

2.- Necessitat de biomarcadors a la MPOC i la HP

La severitat de la MPOC es determina d'acord amb el grau d'obstrucció al flux aeri, el qual, es mesura mitjançant el volum d'aire en el primer segon de l'expiració forçada (FEV₁). No obstant, existeixen diferents limitacions en l'ús d'aquesta tècnica per avaluar la condició diària i la progressió de la malaltia de pacients amb MPOC. En primer lloc, la sensibilitat del FEV₁ en l'avaluació de la condició física diària no és molt alta⁶⁹. En segon lloc, encara que tant l'exacerbació freqüent com l'hiperreactivitat bronquial s'associen amb un ràpida disminució del FEV₁, el FEV₁ no reflecteix aquestes condicions⁶⁹. En tercer lloc, en pacients amb MPOC les manifestacions clíniques i les observacions radiològiques són variables, fins i tot quan el grau d'obstrucció al flux aeri és el mateix⁷⁰. Finalment, el FEV₁ no reflecteix d'una manera directa l'alteració de l'endoteli pulmonar.

En el cas de la HP, el cateterisme cardíac dret és el mètode per excel·lència en el diagnòstic de la malaltia¹¹. No obstant, és un mètode invasiu.

Per totes aquestes raons, en els últims anys s'està treballant en la búsqueda de nous biomarcadors per la MPOC i la HP⁷¹. Uns dels biomarcadors que més s'estan estudiant són els biomarcadors cel·lulars. El principal avantatge de mesurar aquests biomarcadors de la funció endotelial és que proporcionen una visió directa de la condició de l'endoteli. A diferència dels marcadors bioquímics, que poden no ser específics de l'endoteli, els biomarcadors cel·lulars procedeixen directament de l'endoteli, com per exemple les cèl·lules progenitores endotelials (CPEs) i les micropartícules endotelials (EMPs) i, per tant, són millors representants de l'estat endotelial. Mitjançant la combinació d'aquests biomarcadors cel·lulars es pot avaluar no només l'estat del dany endotelial (mitjançant els nivells d'EMPs) sinó també la capacitat de reparació (mitjançant els nivells de CPEs). Es creu que aquesta combinació de marcadors pot ser un bon paràmetre per reflectir l'estat de "competència vascular"^{72,73}. Per tant, l'avaluació de biomarcadors cel·lulars circulants pot revelar mecanismes de la patologia endotelial, així com proporcionar informació sobre l'estat funcional de l'endoteli, sense deixar de ser mínimament invasiva. En aquesta Tesi Doctoral ens centrarem en l'estudi dels nivells de les cèl·lules progenitores i les micropartícules endotelials.

Introducció

2.1.- Cèl·lules progenitores endotelials (CPEs)

Les cèl·lules progenitores endotelials (CPEs) són una població de cèl·lules mare adultes derivades del moll de l'os que circulen per la sang amb la capacitat de proliferar i diferenciar-se a cèl·lules endotelials madures i funcionals⁷⁴. En condicions fisiològiques, les CPEs representen només un 0.0001-0.01% de les cèl·lules mononuclears sanguínees⁷⁵. Al 1997, Asahara *et al.*, van ser els primers en descriure l'existència en sang perifèrica d'una població mononuclear de cèl·lules CD34⁺ derivades del moll de l'os capaces de diferenciar-se a CEs madures *in vitro* i també en descriure el paper en la vasculogènesi durant el procés de neovascularització postnatal⁷⁶.

El principal problema és que no hi ha una definició estandaritzada de la definició de CPE i quina és la millor metodologia pel seu aïllament⁷⁷. A més, la superposició funcional i fenotípica de les CPEs, de les cèl·lules progenitores hematopoètiques (HSC) i de les CEs madures dificulten aquesta tasca. Es considera que les CPEs han de: 1) residir al moll de l'os i poder ser mobilitzades per factors de creixement o altres senyals a llocs de dany vascular o creixement tumoral⁷⁸; 2) expressar marcadors de superfície tant del llinatge endotelial com hematopoiètic⁷⁷; 3) poder ser distingides de les CEs madures⁷⁹ i 4) poder integrar-se a l'endoteli a llocs de reparació vascular o angiogènesi⁷⁵.

2.1.1.- Mobilització i alliberament de CPEs

La mobilització de les CPEs des del moll de l'os és un procés complex regulat per diversos enzims, factors de creixement i els seus receptors⁸⁰. El pas inicial per l'alliberament de CPEs per part del moll de l'os és l'activació de la MMP-9. Aquesta activació provoca la transformació del lligant Kit unit a la membrana a Kit soluble, amb el consegüent alliberament de cèl·lules c-kit⁺ a la circulació sanguínea⁸¹. Alguns autors anomenen aquestes cèl·lules hemangioblast i es consideren les possibles precursoras de les CPEs (Figura 8).

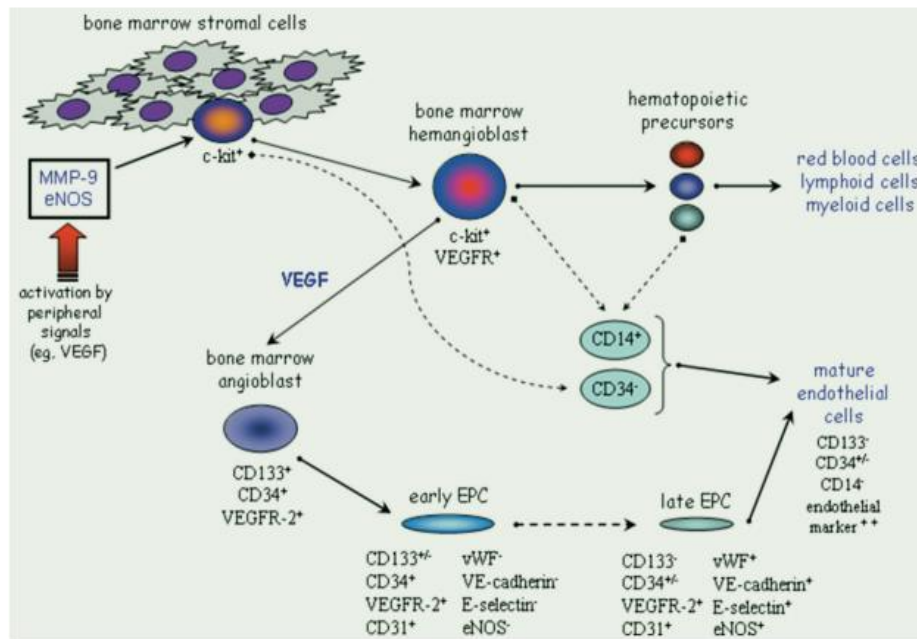


Figura 8. Mobilització, reclutament i diferenciació de les CPEs derivades del moll de l'os⁸¹.

2.1.2.- Identificació de les CPEs

Normalment, les CPEs s'obtenen de mostres de sang venosa perifèrica⁶⁰. Però també hi han estudis que han aïllat CPEs del cordó umbilical o del fetge fetal⁸². Els mètodes més utilitzats per poder aïllar les CPEs són la citometria de flux i l'assaig de formació de colònies *in vitro*.

Citometria de flux

Aquesta tècnica es basa en l'especificitat de les proteïnes de la superfície cel·lular i els corresponents anticossos que s'utilitzen per identificar-les. La tècnica és molt sensible i proporciona una avaluació de gran nombre de cèl·lules d'una manera ràpida i acurada.

Assaig de formació de colònies *in vitro*

Aquest assaig no només mesura el número absolut de CPEs, sino també la seva capacitat proliferativa, reflectint així la capacitat de reparació endotelial. Via cultiu, s'obtenen dos principals subtipus de CPEs.

CPEs tempranes (Early EPCs o angiogenic EPCs): són cèl·lules arrodonides amb els voltants en forma de fus que apareixen en els primers 4-7 dies de cultiu de cèl·lules mononuclears de sang. Aquestes cèl·lules deriven de les unitats formadores de colònies (UFC) de CPEs (assaig de colònies estandaritzat descobert per Hill *et al.*, en el 2003)⁸³

Introducció

(Figura 9A). L'aparició de UFC de CPEs es pot detectar visualment, però es pot confirmar mitjançant la seva capacitat de captar LDL (*Low Density Lipoprotein*)-acetilat o la seva capacitat d'unir-se a la lectina UEA (*Ulex Europaeus Agglutinin*)-1⁸⁴. Les CPEs tempranes presenten algunes característiques de cèl·lules endotelials així com també de monòcits. Tenen una baixa capacitat proliferativa i d'adherència però en canvi secreten factors angiogènics⁸⁵. Els marcadors que expressen són CD34, CD133, VEGFR2, CD14 i CD45 (Figura 8).

CPEs tardanes (*Late EPCs* o *outgrowth EPCs*): són cèl·lules més allargades que apareixen aproximadament després de 14 dies de cultiu^{86,87} (Figura 9B). Tenen una alta capacitat proliferativa i d'adhesió i expressen marcadors endotelials, però no marcadors hematopoètics o de monòcits⁸⁵. Per tant, aquestes cèl·lules són fenotípicament similars a les CEs i s'ha vist que poden formar vasos tant *in vivo* com *in vitro*⁸⁷. De fet, aquestes cèl·lules són capaces de mantenir, generar i reemplaçar cèl·lules diferenciades terminals dins d'un teixit específic com a conseqüència del recanvi cel·lular fisiològic o degut a dany tisular⁸⁸. Els marcadors que expressen són eNOS, VE-caderina, CD34, KDR, CD31 i von Willebrand factor (Figura 8).

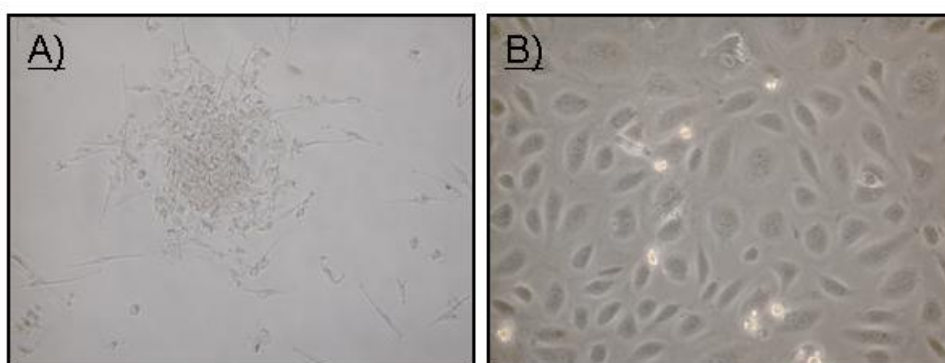


Figura 9. Cèl·lules progenitores endotelials derivades de sang humana. A) Unitat formadora de colònies de CPEs tempranes, de les quals, s'aprecia la típica forma arrodonida amb els voltants en fus i B) CPEs tardanes obtingudes després de gairebé dues setmanes de cultiu, amb morfologia més allargada i semblant a les CEs.

2.1.3.- Marcadors per detectar les CPEs

La nomenclatura per poder definir una CPE és encara ambigua i existeixen discrepàncies entre els diferents estudis, agrupant diferents subtipus cel·lulars sota el terme de CPE. A dia d'avui, la combinació més utilitzada per identificar les CPEs circulants en sang perifèrica és CD34⁺CD133⁺KDR⁺⁸⁹. S'ha de tenir en compte que a mesura que les CPEs van migrant per la circulació sistèmica, van perdent de manera gradual els marcadors de tipus progenitor i van expressant marcadors de CEs com VE-caderina, von Willebrand factor o eNOS.

CD34: és un marcador hematopoètic que també es pot trobar en altres cèl·lules mare derivades del moll de l'os. De fet, les CPEs representen una petita fracció del total de cèl·lules CD34⁺⁹⁰. Les CEs madures també expressen CD34, per tant, CD34 s'ha d'utilitzar en combinació amb altres marcadors que identifiquin una població cel·lular més específica.

CD133 (també conegut com AC133): és un marcador hematopoètic amb característiques de progenitor que s'expressa en les CPEs però no en les CEs madures. La seva expressió es perd ràpidament en el procés de diferenciació. Aquesta pèrdua del marcador CD133 reflecteix el primer pas de transformació de les CPEs a les CEs madures⁹¹.

KDR (*Kinase insert Domain Receptor*) ; també conegut com VEGFR2 (*Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*): marcador expressat en les CEs. Per tant, l'ús del KDR es fa en combinació amb marcadors de cèl·lula mare per assegurar-se l'origen progenitor de les cèl·lules⁸².

A part d'aquests 3 marcadors, hi ha estudis que també identifiquen les CPEs en combinació amb el CD45. El CD45 és un marcador hematopoètic que s'expressa sobretot en leucòcits. Per aquest motiu, les CPEs no es consideren CD45⁺ sino CD45^{dim}⁹². Quan es considera el CD45⁺ es parla més aviat de cèl·lules progenitores angiogèniques o hematopoètiques⁹³.

2.1.4.- Funcions de les CPEs

Les CPEs tenen un paper clau en el manteniment de l'endoteli i en la restauració de la funció normal, reemplaçant la pèrdua de cèl·lules diferenciades com

Introducció

a conseqüència del recanvi cel·lular fisiològic o de dany tissular degut a una lesió. En aquest sentit, diversos estudis han demostrat el paper de les CPEs en la reparació de vasos danyats en diverses alteracions vasculares^{94,95}. No obstant, també s'ha observat el possible paper de les CPEs en la progressió del remodelat vascular^{24,96}. Per tant, aquest possible paper dual de les CPEs s'ha de tenir en compte a l'hora d'utilitzar les CPEs com a possible terapia cel·lular.

2.1.5.- CPEs en condicions fisiològiques

Les CPEs estan presents en la circulació sanguínea de subjectes sans en nivells baixos assegurant el correcte funcionament de l'endoteli⁹⁷.

2.1.6.- CPEs en diferents situacions clíniques

2.1.6.1- CPEs i disfunció endotelial

En pacients amb disfunció endotelial, s'ha vist que una reducció dels nivells de CPEs s'associa amb un major risc cardiovascular^{98,99}. De fet, estudis previs del nostre grup han descrit una correlació inversa entre els nivells de CPEs i la funció endotelial⁶⁰.

2.1.6.2- CPEs i tabac

Hi han certes discrepàncies sobre l'efecte del tabac en els nivells de CPEs. Mentre que alguns estudis han descrit nivells reduïts de CPEs amb el tabac que incrementen ràpidament després de deixar de fumar^{100,101}, altres estudis han descrit nivells incrementats després d'una segona exposició al fum de tabac¹⁰², després de l'incubació *in vitro* amb nicotina¹⁰³ o inclús després de fumar només un cigarret¹⁰⁴. Tant el nostre grup com el grup de Janssen *et al.*, hem descrit nivells de CPEs similars entre els subjectes sans no fumadors i els fumadors, suggerint que en absència d'altres factors cardiovasculars, el tabac no altera de manera significativa els nivells de CPEs^{60,93}. De totes maneres, el treball de Michaud *et al.*, descriu que les CPEs de subjectes fumadors tenen una baixa capacitat proliferativa, migratòria i d'adherència¹⁰⁵. Per tant, futurs estudis avaluant la relació tabac-CPEs són necessaris per tal de poder aclarir aquestes discrepàncies.

2.1.6.3- CPEs i MPOC

Diversos estudis han avaluat els nivells de CPEs a la MPOC. Recentment, el nostre grup ha descrit nivells reduïts de CPs en la MPOC⁶⁰, seguint la mateixa línia que la majoria d'estudis^{93,106-111}, mentre que altres no han trobat diferències significatives^{100,112}. Aquesta reducció dels nivells de CPEs en els malalts amb MPOC pot donar lloc a una baixa capacitat reparadora i, consegüentment, a una alteració de la funció vascular¹¹³.

2.1.6.4- CPEs i HP

Actualment existeixen discrepàncies sobre els nivells de CPEs en la HP. Mentre que alguns estudis descriuen nivells elevats de CPEs en pacients amb HP^{23,114-117}, d'altres troben nivells reduïts^{106,118-120} o, fins i tot, no diferències entre controls i pacients amb HP¹²¹. Aquestes diferències poden ser degudes al tipus de pacients reclutats, el tractament que reben, els marcadors utilitzats per detectar les CPEs, el tipus de HP així com la severitat de la malaltia.

2.2.- Micropartícules

Les micropartícules (MPs) formen part de la família de les vesícules extracel·lulars. Hi han tres tipus de vesícules extracel·lulars que es distingeixen principalment per la mida: exosomes (40-100 nm), MPs (0,1-1,0 µm) i cossos apoptòtics (1-3 µm) (Figura 10).

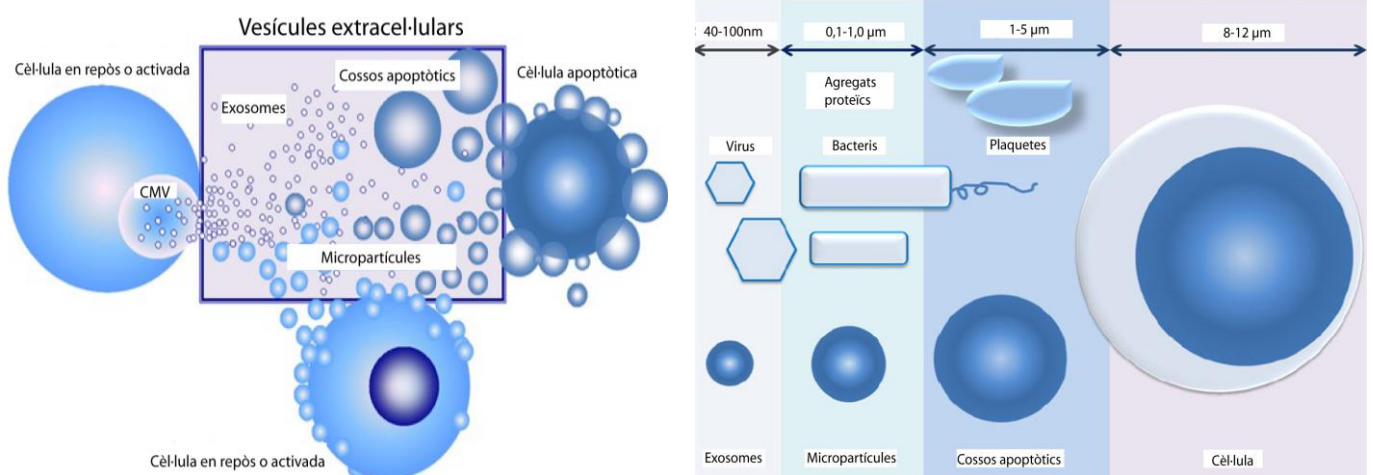


Figura 10. Representació esquemàtica dels diferents tipus de vesícules extracel·lulars i la seva mida. Adaptació de György *et al.*, 2011¹²².

Introducció

Però a part de la mida, també existeixen tota una sèrie de característiques que diferencien les vesícules extracel·lulars entre elles. La següent taula recull les principals característiques de cada tipus de vesícula extracel·lular.

Taula 2. Diferències entre els tres principals tipus de vesícules extracel·lulars.

	Exosomes	Micropartícules	Cossos apoptòtics
Rang de mida	40-100 nm	0.1-1 µm	1-5 µm
Mecanisme de generació	Per exocitosi dels cossos multivesiculars (CMV)	Per gemmació de la membrana plasmàtica	Per alliberament de vesícules de cèl·lules sotmeses a apoptosi
Aïllament	Centrifugació diferencial i ultracentrifugació en gradient de sacarosa	Centrifugació diferencial	Falta de protocols estandaritzats
Detecció	Microscopia electrònica de transmissió, espectrometria de masses i/o citometria de flux	Citometria de flux i/o microscopia electrònica	Citometria de flux i/o microscopia electrònica
Millors fonts cel·lulars caracteritzades	Tumors i cèl·lules immunes	Plaquetes, CEs i cèl·lules vermelles de la sang	Línees cel·lulars
Composició	Proteïnes, ARN i miARNs	Proteïnes, ARN i miARNs	Proteïnes, ARN, miARNs, orgànuls cel·lulars i ADN.
Marcadors	CD63, CD81, CD9, CD107a, TSG101 i Annexina V	Marcadors específics de cada línia cel·lular i Annexina V	Contingut d'ADN i Annexina V

Les MPs van ser descrites per primera vegada al 1946 per Chargaff i West com un factor precipitable en el plasma lliure de plaquetes amb el potencial de generar trombina¹²³.

Les MPs són estructures de 0,1-1,0 µm de diàmetre envoltades d'una bicapa fosfolipídica que són alliberades per les cèl·lules en condicions d'estrès i/o dany cel·lular així com per activació/inflamació^{79,124}. Les MPs poden ser alliberades per plaquetes, CEs, monòcits, granulòcits, eritròcits i cèl·lules tumorals. Contenen proteïnes de superfície cel·lular i material citoplasmàtic (mARN, miARN i factors de

transcripció, entre d'altres) provinents de les cèl·lules de les quals deriven^{124,125}. El component proteic de les MPs pot variar segons el fenotip de les MPs i el estímul que dóna lloc a la seva producció¹²⁶. Degut a que les MPs circulen per la vasculatura, no només actuen al seu entorn local, sino també a llocs diferents del seu origen. Així, les MPs tenen un paper important en la comunicació cèl·lula- cèl·lula¹²⁷.

2.2.1.- Formació de les MPs

Els mecanismes que condueixen a la formació de MPs no estan completament clars, però la reorganització del citoesquelet cel·lular i alteracions en la simetria dels fosfolípids són passos essencials en la seva formació. Diversos estudis proporcionen evidència que la formació de MPs es porta a terme mitjançant activació cel·lular (tant física com i/o química) o com a resposta a un dany cel·lular (apoptosi)¹²⁸ (Figura 11).

2.2.1.1.- Formació de MPs com a resposta a activació cel·lular

L'activació cel·lular degut a l'acció de diferents agonistes desencadena una aflluència de calci extracel·lular que s'associa amb una proteòlisi calci-dependenta de les proteïnes del citoesquelet a través de l'activació de la calpaïna¹²⁵. L'elevació sostinguda de la concentració de calci citosòlic també produeix l'activació de les quinases i la inhibició de les fosfatases, contribuint així a la disrupció del citoesquelet i la consegüent formació de MPs¹²⁵ (Figura 11).

Aquesta pèrdua de l'asimetria de la membrana cel·lular també pot ser resultat de l'exposició de la fosfatidilserina a la cara externa de la bicapa de fosfolípids. La fosfatidilserina és un aminofosfolípid amb càrrega negativa que en cèl·lules en repòs es troba a la cara interna de la membrana plasmàtica. L'exposició de la fosfatidilserina a la cara externa de la membrana plasmàtica contribueix a un excés de càrrega negativa a la superfície cel·lular que podria ser la causa de la seva desestabilització i la formació de MPs. De totes maneres, diferents estudis han observat que no totes les MPs expressen fosfatidilserina a la part externa de la membrana plasmàtica^{129,130} i, per tant, futurs estudis són necessaris per discernir aquestes discrepàncies.

2.2.1.2.- Formació de MPs com a resposta a dany cel·lular (apoptosi)

Durant l'apoptosi, la formació de MPs s'associa a l'activació de la caspasa-3 i de ROCK I. Aquestes activacions tenen com a resultat final la disrupció del citoesquelet i la

Introducció

conseqüent formació de MPs¹²⁵ (Figura 11). Altres estudis han trobat que TRAIL (TNF α -related apoptosis-inducing ligand) i el seu receptor TRAIL-R2 també estan implicats en la via de senyalització de l'apoptosi, promovent l'alliberament de MPs d'origen endotelial mitjançant l'inici de la contracció de proteïnes adaptadores i l'activació del factor nuclear Kappa B (NF-kB)¹³¹ (Figura 11).

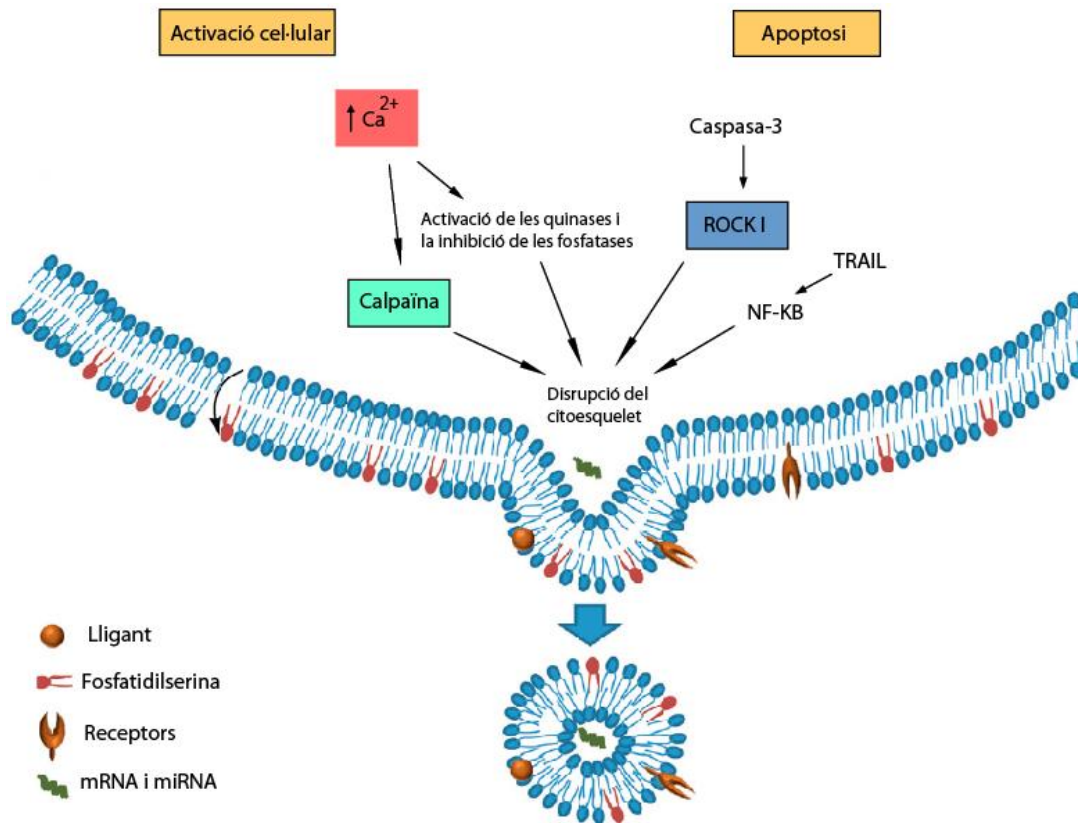


Figura 11. Representació esquemàtica bàsica dels diferents passos que tenen lloc en la formació de MPs. Adaptació de Martínez *et al.*,¹³².

2.2.2.- Identificació de MPs

La majoria d'estudis determinen els nivells de MPs a partir de mostres de plasma pobre en plaquetes (PPP), el qual, s'obté a partir d'una sèrie de centrifugacions diferencials de la sang recolectada en vacutainers amb citrat sòdic¹³³. El PPP normalment conté MPs d'origen endotelial, plaquetari, leucocitari i eritrocitari, tot i que aproximadament un 60-70% de les MPs són d'origen plaquetari¹³². A part de plasma, altres estudis també han aïllat MPs d'orina¹³⁴, esput¹³⁵, rentat broncoalveolar¹³⁶, fluid sinovial¹³⁷ i saliva¹³⁸. Tot i que es creu que en els teixits també hi ha una formació activa de MPs, actualment no existeix cap mètode fiable per poder aïllar i caracteritzar les MPs a partir de teixits.

El mètode més ampliament utilitzat per la detecció de MPs degut a la seva senzillesa i a la quantitat d'informació que es pot extreure de la població que s'està estudiant és la citometria de flux. Tot i això, existeixen alternatives com per exemple els assajos ELISA i els assajos funcionals¹³⁹. En aquests últims, es quantifica les MPs mitjançant la mesura de la seva activitat procoagulant i protrombinasa¹⁴⁰.

El principal problema en la detecció de les MPs és que no hi ha un protocol estandaritzat i, per tant, a vegades es troben inconsistències entre els estudis degudes a diferències entre la sensibilitat dels diferents citòmetres, així com diferències en les centrifugacions¹⁴¹.

2.2.3.- Funcions de les MPs

Les funcions de les MPs depenen del tipus cel·lular que les origina i del seu contingut. Durant els últims anys s'ha descrit el paper de les MPs en processos de coagulació¹⁴², angiogènesi¹⁴³, disfunció endotelial¹⁴⁴, inflamació¹⁴⁵, modulació immunitària¹⁴⁶ i transferència horitzontal de molècules bioactives com ARNs, miARNs, factors de creixement i el seus receptors¹²⁷, entre d'altres¹⁴⁷ (Figura 12). Aquesta transmissió d'informació és independent del número de MPs però sí que depèn de la composició i l'origen de les MPs¹⁴⁸. La comunicació intercel·lular associada a les MPs pot tenir lloc de diferents maneres: a) les MPs poden directament interaccionar amb els lligands presents a la superfície de les cèl·lules dianes i activar la cascada de senyalització, o b) transferir proteïnes, ARNm i/o miARN per fusió o internalització. Per aquest últim mecanisme, les cèl·lules dianes adquireixen nous antígens de membrana i, per tant, noves propietats biològiques.

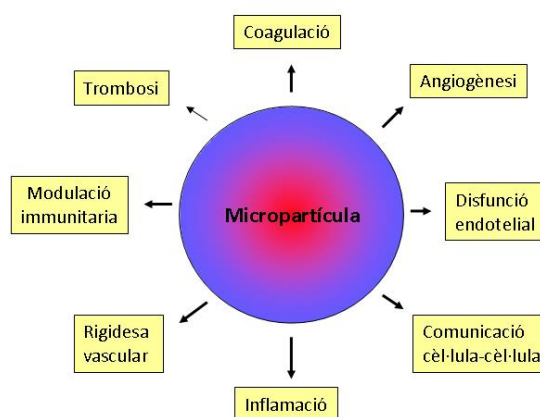


Figura 12. Representació esquemàtica de les principals funcions de les MPs.

Introducció

2.2.4.- MPs d'origen endotelial (EMPs)

Tot i que aproximadament el 60-70% de les MPs són d'origen plaquetari¹⁴⁹, el següent tipus de MPs en abundància correspon a les EMPs¹⁵⁰ i són en les que ens centrarem en aquesta Tesi Doctoral.

2.2.4.1.- Marcadors per detectar les EMPs

L'identificació de MPs d'origen endotelial es basa en l'ús de marcadors específics que es detecten per citometria de flux. Desafortunadament, tret de les VE (*vascular endothelial*)-caderines i les selectines, la resta de marcadors no s'expressen de manera exclusiva a les CEs. Per aquesta raó s'estableixen diferents combinacions de múltiples marcadors per tal d'evitar una possible contaminació de MPs d'altres orígens (sobretot plaquetari) i així avaluar de manera acurada les EMPs.

Els marcadors més utilitzats en els diferents estudis publicats estan resumits en la següent taula (Taula 3):

Taula 3: Marcadors endotelials utilitzats per detectar EMPs.

	Cèl·lules que ho expressen	Localització en les CEs	Tipus d'expressió en les CEs
VE-caderines: CD144	CEs	Unions d'adherència	Constitutiva
PECAM-1: CD31	CEs, plaquetes, neutròfils i monòcits.	Unions intercel·lulars	Constitutiva
MCAM: CD146	CEs i altres tipus cel·lulars sota condicions patològiques	Unions intercel·lulars	Constitutiva
E-selectina: CD62E	CEs activades	Superfície cel·lular	Induïble

VE-caderina

La VE-caderina (també coneguda com CD144) és la principal molècula d'adhesió cel·lular¹⁵¹. S'expressa només en CEs i està local·litzada específicament a les unions d'adherència¹⁵² (Figura 13). Canvis en la local·lització de la VE-caderina estan associats amb la migració de neutròfils i increment de la permeabilitat vascular¹⁵³. Per tant, l'increment d'EMPs CD144+ reflecteix més una possible destrucció estructural de

l'endoteli pulmonar que no pas una inflamació. Tot i que aquest marcador s'ha proposat com un dels més específics per detectar EMPs, és dels menys sensibles¹⁵⁴.

PECAM-1

Les PECAM-1 (*Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule*), també conegudes com CD31, són molècules que s'expressen a les unions de CEs però també en la superfície de plaquetes, neutròfils, monòcits i alguns tipus de limfòcits¹⁵⁵. A diferència de les VE-caderines, les PECAM es localitzen fora de les unions d'adherència de les CEs¹⁵⁶ (Figura 13). Com que les PECAM no són només específiques de les CEs, s'utilitzen en combinació amb marcadors específics de plaquetes (CD41 o CD42b), per tal de poder distingir MPs CD31+ d'origen endotelial d'aquelles d'origen plaquetari. Per tant, les EMPs poden ser definides com CD31+CD41- o CD31+CD42b-¹⁵⁷. Les PECAM tenen un paper important en la regulació de les funcions plaquetàries, activació de cèl·lules B i T, permeabilitat de cèl·lules endotelials i migració cel·lular a través de l'endoteli¹⁵⁶.

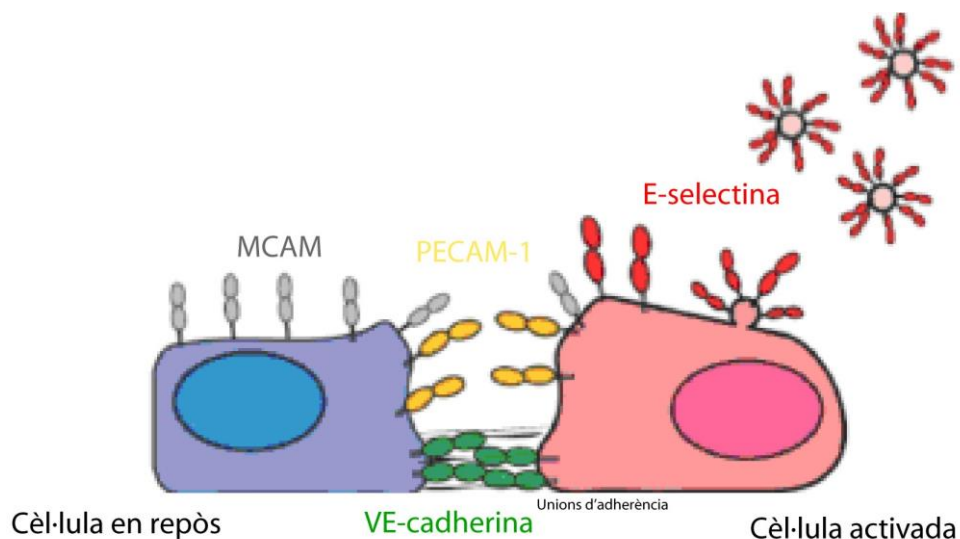


Figura 13. Localització dels marcadors d'EMPs a les cèl·lules endotelials. Adaptació de Takahashi *et al.*,¹⁵⁸.

MCAM

Les MCAM (*Melanoma Cell Adhesion Molecule*), també conegudes com CD146, són molècules d'adhesió que es troben en les CEs i estan implicades en processos de permeabilitat i migració cel·lular, transducció de senyals, angiogènesi i resposta immunològica¹⁵⁹. Les MCAM es localitzen fora de les unions d'adherència i s'expressen

Introducció

a la part apical de les CEs (Figura 13). Aquestes molècules, tot i que s'expressen sobretot en el llinatge endotelial, també s'expressen en altres tipus cel·lulars en condicions patològiques¹⁶⁰.

E-selectina

Les E-selectines (també conegudes com CD62E) són molècules d'adhesió cel·lular expressades només en CEs activades (Figura 13). La seva expressió és ràpidament induïble sota un estímul inflamatori, a diferència de les molècules VE-caderines, PECAM i MCAM que s'expressen de manera constitutiva¹⁶¹. La seva principal funció és el reclutament de leucòcits a llocs de dany deguts a inflamació¹⁶². Per tant, la presència d'EMPs CD62E pot reflexar el grau d'inflamació en curs.

2.2.4.2.- EMPs en condicions fisiològiques

Sota condicions normals, l'homeostasi dels vasos està assegurada per les propietats antiinflamatòries i antitrombòtiques de la monocapa de CEs¹⁶³. La seva integritat funcional es manté per una baixa regeneració cel·lular contínua i la incorporació de les CPEs. L'activació endotelial és local, de baix grau i reversible. Conseqüentment, els nivells circulants d'EMPs en plasma de persones sanes són baixos, reflectint una renovació endotelial normal¹⁶⁴. Per la seva banda, l'activitat protectora pro-coagulant de baix grau es manté per les EMPs que expressen proteïnes anti-trombòtiques a la seva superfície i per MPs derivades de plaquetes¹⁶⁵.

2.2.4.3.- EMPs en diferents situacions clíniques

2.2.4.3.1.- EMPs i disfunció endotelial

Diversos estudis han evidenciat que els nivells d'EMPs circulants en pacients amb disfunció endotelial correlacionen de manera inversa amb l'amplitud de la dilatació mediada per flux¹⁶⁶⁻¹⁶⁹. Estudis *ex vivo* demostren que les MPs aïllades de sang de pacients amb síndrome coronària aguda poden causar disfunció endotelial en les aortes de rates mitjançant l'alteració de la via de transducció de la eNO¹⁷⁰. Aquestes observacions demostren que nivells elevats d'EMPs circulants estan relacionats amb la vasodilatació depenent de l'endoteli, proporcionant a les EMPs un possible paper com a marcadors de disfunció endotelial.

2.2.4.3.2.- EMPs i tabac

Com s'ha comentat anteriorment, el tabac és el factor de risc més important en la MPOC. Diferents estudis demostren que fumar incrementa els nivells circulants d'EMPs. Takahashi *et al.*, van demostrar *in vitro* que l'incubació de CEs microvasculars del pulmó o de CEs de l'aorta amb fum de tabac induïa l'alliberament d'EMPs CD31⁺CD41⁻ i CD146⁺¹⁵⁰. Heiss *et al.*, van observar l'alliberació d'EMPs CD144⁺ a les poques hores de l'exposició al fum de tabac¹⁰². Posteriorment, Gordon *et al.*, va observar un increment dels nivells circulants d'EMPs CD31⁺CD42b⁻ en fumadors actius sans i encara un increment més accentuat en fumadors actius amb enfisema¹⁵⁷. Mobarrez *et al.*, van descriure que només amb un cigarret ja es produeix un augment significatiu dels nivells d'EMPs CD144⁺¹⁰⁴. Recentment, el grup de Serban *et al.*, va descriure que l'exposició al fum de tabac era suficient per incrementar *in vivo* els nivells circulants d'EMPs tant en el plasma d'humans com de ratolins, així com en el sobrenedant de CEs de cultivades *in vitro*¹⁷¹.

2.2.4.3.3.- EMPs i MPOC

El paper de les EMPs com a possible efector patològic i/o marcador prognòstic en la MPOC i enfisema també ha estat estudiat. Thomashow *et al.*, van trobar nivells incrementats d'EMPs CD31⁺ en pacients amb MPOC moderada i nivells incrementats d'EMPs CD62E⁺ en pacients amb MPOC greu¹⁷². A més, els nivells d'EMPs apoptòtiques correlacionaven de manera positiva amb el grau d'enfisema i de manera negativa amb la perfusió microvascular pulmonar. Per la seva banda, en l'estudi de Takahashi *et al.*, van trobar nivells elevats tant d'EMPs d'origen activat com apoptòtic en malalts amb MPOC amb exacerbacions comparat amb pacients amb MPOC estables¹⁷³. A més, l'estudi suggereix que les EMPs CD62E⁺ podrien predir la susceptibilitat a patir exacerbacions. En un estudi posterior del mateix grup, van trobar una correlació entre els nivells basals d'EMPs CD62E⁺ i el FEV₁, nivells alts d'EMPs prediuen una disminució més accentuada del FEV₁¹⁷⁴. Per tant, l'inflamació i l'activació endotelial persistent podrien jugar un paper clau en la disminució funcional dels malalts amb MPOC. Recentment, l'estudi de Strulovici-Barel *et al.*, també va trobar nivells elevats d'EMPs CD31⁺CD42b⁻ en malalts amb MPOC¹⁷⁵.

Introducció

2.2.4.3.4.- EMPs i HP

Diferents estudis han avaluat els nivells d'EMPs circulants en pacients amb HP^{140,148,176-178}. Amabile *et al.*, i Bakouloula *et al.*, van observar un increment dels nivells d'EMPs en pacients amb HAP, sent els seus nivells altament predictius de la gravetat hemodinàmica^{140,176}. També s'ha demostrat que nivells basals d'EMPs CD62E⁺ (mesurades abans d'iniciar terapia específica) poden predir l'ocurrència d'episodis adversos en una població de HP amb etiologies variades¹⁷⁷. De fet, l'etiologia de la malaltia també sembla influir en els nivells d'EMPs circulants, els pacients amb HAP tenen nivells d'EMPs més elevats comparats amb el pacients amb HPTEC¹⁷⁶. Però curiosament, nivells del subtipus d'EMPs CD62⁺ estan més incrementats en pacients amb HPTEC¹⁷⁸.

Finalment, s'ha vist que MPs circulants aïllades de rates amb HP induïda per hipòxia poden afectar al to de la vasculatura¹⁴⁸.

HIPÒTESIS

La present Tesi Doctoral es fonamenta en les següents hipòtesis:

1.- El remodelat vascular pulmonar és una de les principals alteracions vasculares de la circulació pulmonar dels malalts amb MPOC. Previ al remodelat vascular, s'evidencien processos angiogènics que podrien actuar com iniciadors dels canvis de la paret dels vasos, sovint induïts per inflamació crònica. Per tant, hipotetitzem que l'alliberació de diferents factors de creixement i citocines podrien constituir un microambient angiogènic característic de la malaltia.

2.- La disfunció endotelial pot tenir un paper important en l'inici i evolució de malalties com la MPOC i la HP i és una de les dianes clau en el tractament actual de la HAP. Tot i així, el diagnòstic d'ambdues malalties no reflexa de forma directa la funció endotelial. No obstant això hipotetitzem que l'anàlisi de l'estat endotelial podria ser un bon biomarcador de l'evolució d'aquestes malalties. L'estat endotelial pot evaluar-se mitjançant l'anàlisi dels nivells circulants de cèl·lules progenitores (CPs), com índex de reparació vascular, i les micropartícules endotelials (EMPs), com índex de dany vascular.

2.1.- Hipotetitzem que el dany vascular dels malalts amb HAP o HPTEC de nou diagnòstic i, per tant, sense tractament específic previ per la HP produirà una alteració dels nivells circulants de CPs respecte als controls. En aquest sentit hipotetitzem que el tractament dirigit a millorar la funció endotelial mitjançant l'alliberació de mediadors endotelials es veurà reflexat en un canvi dels nivells de CPs dels malalts, possiblement assolint valors similars als dels controls.

2.2.- Hipotetitzem que el dany endotelial dels malalts amb MPOC produirà una alteració de l'equilibri dels nivells d'EMPs i CPs i, per tant, de la relació dany/reparació vascular (competència vascular). Per tant, pensem que factors associats a la disfunció endotelial com el consum de tabac i la presència d'hipertensió pulmonar associada a la MPOC, però també factors poblacionals (com el sexe, edat, risc cardiovascular, etc) podrien tenir efectes sobre els nivells d'ambdós biomarcadors.

OBJECTIUS

Objectiu general:

D'acord amb les hipòtesis esmentades, l'objectiu global d'aquesta Tesi Doctoral és l'estudi de factors angiogènics, cèl·lules progenitores i micropartícules endotelials circulants com a marcadors de malaltia vascular pulmonar.

Amb aquest objectiu general s'han dut a terme 3 estudis diferents que fomenten aquesta Tesi Doctoral, els objectius dels quals han estat:

1.- Objectiu del primer estudi: Perfil d'expressió gènica de factors angiogènics en artèries pulmonars de pacients amb MPOC: relació amb el remodelat vascular.

Estudiar el perfil d'expressió gènica de gens relacionats amb el procés d'angiogènesi i/o relacionats amb la proliferació de CMLs en artèries pulmonars aïllades de subjectes no fumadors, fumadors i malalts amb MPOC, i relacionar-ho amb el grau de remodelat vascular.

2.- Objectiu del segon estudi: Efecte de la teràpia específica sobre els nivells de cèl·lules progenitores circulants en la hipertensió pulmonar precapilar.

Estudiar si els pacients amb HAP o HPTEC de nou diagnòstic i, per tant encara no tractats, tenen nivells circulants de CPs alterats respecte els controls i estudiar el possible efecte de la teràpia específica de la HAP sobre els nivells circulants de les CPs.

3.- Objectiu del tercer estudi: Anàlisi de la competència vascular a la MPOC

Estudiar si els pacients amb MPOC tenen una alteració de la competència vascular avaluada mitjançant els nivells circulants d'EMPs i CPs.

RESULTATS

PUBLICACIONS

A continuació es presenten els articles publicats i en revisió que fonamenten la present Tesi Doctoral i dels quals la doctoranda n'és primera autora:

Primer article:

García-Lucio J, Argemi G, Tura-Ceide O, Díez M, Paul T, Bonjoch C, Coll-Bonfill N, Blanco I, Barberà JA, Musri MM, Peinado VI.

Gene expression profile of angiogenic factors in pulmonary arteries in COPD: relationship with vascular remodeling. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2016 Apr 1;310(7):L583-92. doi: 10.1152/ajplung.00261.2015. Epub 2016 Jan 22.

Factor d'impacte: 4,721

Segon article:

García-Lucio J, Tura-Ceide O, Del Pozo R, Blanco I, Pizarro S, Ferrer E, Díez M, Coll-Bonfill N, Piccari L, Peinado VI, Barberà JA.

Effect of targeted therapy on circulating progenitor cells in precapillary pulmonary hypertension. Int J Cardiol. 2017 Feb 1;228:238-243. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.11.175. Epub 2016 Nov 9.

Factor d'impacte: 6,189

Tercer article:

García-Lucio J, Peinado VI, de Jover LI, del Pozo R, Blanco I, Bonjoch C, Coll-Bonfill N, Paul T, Tura-Ceide O, Barberà JA

Imbalance between endothelial damage and repair capacity in COPD. Thorax. (actualment en revisió).

Factor d'impacte: 8.272

Resultats

Primer estudi:

**Gene expression profile of angiogenic factors in pulmonary arteries in COPD:
relationship with vascular remodeling.**

Jéssica García-Lucio, Gemma Argemi, Olga Tura-Ceide, Marta Diez, Tanja Paul, Cristina Bonjoch, Núria Coll-Bonfill, Isabel Blanco, Joan Albert Barberà, Melina Mara Musri,
Víctor Ivo Peinado.

Article publicat a American Journal of Physiology Lung Cellular Molecular Physiology:

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2016 Apr 1;310(7):L583-92.

Factor d'impacte: 4,721

Resultats

Objectiu general:

Estudiar el perfil d'expressió gènica de gens relacionats amb el procés d'angiogènesi i/o relacionats amb la proliferació de CMLs en artèries pulmonars aïllades de subjectes no fumadors, fumadors i malalts amb MPOC, i relacionar-ho amb el grau de remodelat vascular.

Objectius específics:

1. Caracteritzar el microambient angiogènic de les artèries pulmonars, tant les obtingudes quirúrgicament com les obtingudes mitjançant microdissecció làser, durant el procés de remodelat vascular mitjançant l'estudi de l'expressió gènica dels principals factors de creixement, receptors i metaloproteïnases en les artèries pulmonars dels pacients amb MPOC.
2. Estudiar els nivells plasmàtics del/s factor/s de creixement i/o citocines que els resultats revelin importants en una altra cohort de pacients amb MPOC, amb o sense HP associada.

Resum de la metodologia:

De 29 subjectes candidats a lobectomia o pneumonectomia degut a carcinoma (9 subjectes no fumadors, 9 fumadors i 11 malalts amb MPOC) es van aïllar segments de les artèries pulmonars (1-2 mm de diàmetre) de regions llunyanes de tumors. D'aquestes artèries pulmonars es van realitzar estudis de morfometria, immunohistoquímica i d'expressió gènica mitjançant TLDA's (TaqMan low-density arrays).

A partir de l'estudi de morfometria, es va obtenir un valor de remodelat vascular per cada subjecte que va permetre la classificació dels 29 subjectes en tercils segons els gruix de la capa íntima de les artèries pulmonars: grup R1 (subjectes amb el grau de remodelat més baix), grup R2 (subjectes amb grau de remodelat mig) i grup R3 (subjectes amb el grau de remodelat més alt)

Les artèries intrapulmonars de 0,25-0,5 mm de diàmetre es van aïllar a partir de teixit pulmonar mitjançant microdissecció làser.

Els factors de creixement i/o citoquines que les TLDA's van revelar importants en el remodelat vascular es van avaluar mitjançant l'assaig ELISA en una altra cohort

Resultats

de pacients amb MPOC (n=62; 17 fumadors actius i 45 ex-fumadors) i controls (n= 48; 27 no fumadors i 21 fumadors actius). Els pacients amb MPOC es van subdividir en 2 subgrups més: MPOC amb HP (n= 16; 2 fumadors actius i 14 ex-fumadors) i MPOC sense HP (n= 46; 14 fumadors actius i 32 ex-fumadors).

Resultats principals:

Dels 46 gens estudiats mitjançant les TLDA, només l'expressió gènica d'ANGPT-2 estava incrementada de manera significativa en les artèries pulmonars dels grups R2 i R3 (artèries pulmonars amb grau de remodelat mig i molt remodelades, respectivament) comparat amb les artèries del grup R1 (poc remodelades). És a dir, a major grau de remodelat vascular, major expressió gènica d'ANGPT-2. No es van observar diferències significatives en la resta dels gens estudiats.

L'expressió gènica d'ANGPT-2 de les artèries pulmonars de tamany mitjà obtingudes quirúrgicament correlacionava amb l'expressió gènica d'ANGPT-2 de les artèries pulmonars de petit tamany obtingudes mitjançant microdissecció làser, reflectint concordància en els diferents segments arterials.

Les artèries pulmonars dels grups R2 i R3 tenien una major expressió protèica d'ANGPT-2 en les cèl·lules que conformen la capa íntima comparat amb les artèries menys remodelades R1. Aquesta expressió protèica d'ANGPT-2 correlacionava positivament amb el grau de remodelat, corroborant així els resultats obtinguts amb les TLDA.

L'anàlisi multivariant va demostrar que la combinació de 10 dels 46 gens estudiats pot classificar les artèries pulmonars dels subjectes segons el grau de remodelat amb una eficiència del 96.6%. D'aquests 10 gens, 5 gens (ANGPT-2, MMP-2, VEGF, TEK i CTNNB-1) mostraven correlació múltiple entre ells i expliquen el 52% de la variabilitat de l'engruiximent de la capa íntima. A més, l'anàlisi de la xarxa gènica va mostrar una connexió entre l'engruiximent de la capa íntima i la MMP-2, indicant l'influència de MMP-2 en el vascular remodelat.

En una altra població de subjectes, els nivells plasmàtics d'ANGPT-2 estaven incrementats en pacients amb MPOC comparat amb els controls no fumadors. En l'anàlisi fet només amb els malalts amb MPOC, els malalts amb MPOC fumadors o amb HP associada tenien nivells plasmàtics d'ANGPT-2 incrementats respecte els malalts amb MPOC no fumadors o sense HP, respectivament. A més, els nivells d'ANGPT-2 correlacionaven amb la carga tabàquica.

Resultats

CALL FOR PAPERS | *Biomarkers in Lung Diseases: from Pathogenesis to Prediction to New Therapies*

Gene expression profile of angiogenic factors in pulmonary arteries in COPD: relationship with vascular remodeling

Jéssica García-Lucio,¹ Gemma Argemi,¹ Olga Tura-Ceide,^{1,2} Marta Diez,¹ Tanja Paul,¹ Cristina Bonjoch,¹ Nuria Coll-Bonfill,¹ Isabel Blanco,^{1,2} Joan A. Barberà,^{1,2} Melina M. Musri,^{1*} and Victor I. Peinado^{1,2*}

¹Department of Pulmonary Medicine, Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain; and ²Biomedical Research Networking Center on Respiratory Diseases (CIBERES), Madrid, Spain

Submitted 30 July 2015; accepted in final form 15 January 2016

García-Lucio J, Argemi G, Tura-Ceide O, Diez M, Paul T, Bonjoch C, Coll-Bonfill N, Blanco I, Barberà JA, Musri MM, Peinado VI. Gene expression profile of angiogenic factors in pulmonary arteries in COPD: relationship with vascular remodeling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 310: L583–L592, 2016. First published January 22, 2016; doi:10.1152/ajplung.00261.2015.—Pulmonary vessel remodeling in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) involves changes in smooth muscle cell proliferation, which are highly dependent on the coordinated interaction of angiogenic-related growth factors. The purpose of the study was to investigate, in isolated pulmonary arteries (PA) from patients with COPD, the gene expression of 46 genes known to be modulators of the angiogenic process and/or involved in smooth muscle cell proliferation and to relate it to vascular remodeling. PA segments were isolated from 29 patients and classified into tertiles, according to intimal thickness. After RNA extraction, the gene expression was assessed by RT-PCR using TaqMan low-density arrays. The univariate analysis only showed upregulation of angiopoietin-2 (*ANGPT-2*) in remodeled PA ($P < 0.05$). The immunohistochemical expression of *ANGPT-2* correlated with intimal enlargement ($r = 0.42$, $P < 0.05$). However, a combination of 10 factors in a multivariate discriminant analysis model explained up to 96% of the classification of the arteries. A network analysis of 46 genes showed major decentralization. In this network, the metalloproteinase-2 (*MMP-2*) was shown to be the bridge between intimal enlargement and fibrogenic factors. In COPD patients, plasma levels of *ANGPT-2* were higher in current smokers or those with pulmonary hypertension. We conclude that an imbalance in *ANGPT-2*, combined with related factors such as VEGF, β -catenin, and *MMP-2*, may partially explain the structural derangements of the arterial wall. *MMP-2* may act as a bridge channeling actions from the main fibrogenic factors.

angiopoietin; pulmonary artery; COPD; vascular remodeling; gene expression profile

PULMONARY VASCULAR REMODELING is a frequent feature in smokers and patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD), mainly consisting of thickening of the intimal coat of pulmonary muscular arteries (3). Vascular remodeling is a dynamic process involving cellular and molecular changes,

such as cell proliferation, cell migration, apoptosis, and changes in the synthesis or degradation of the extracellular matrix (21), which disturb both endothelial and smooth muscle cell homeostasis. These processes are highly dependent on the coordinated interaction of numerous growth factors and their corresponding receptors, which may be locally released or expressed in response to diverse stimuli, such as injury, hypoxia, or shear stress (11). In addition, there is evidence that bone marrow-derived circulating progenitor cells may be recruited at sites of vascular lesions and may take part in angiogenesis or tissue repair (26, 27). Progenitor cell fate is highly dependent on the microenvironment and, therefore, on the release of cytokines and growth factors. The signaling pathways of this phenomenon remain undetermined. Several data suggest that vascular remodeling may be the result of an angiogenic process often induced by chronic inflammation (4). Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the key signaling molecules regulating the recruitment, proliferation, and migration of progenitor and/or endothelial cells and acts through specific receptors (19). Several other signaling systems are also involved in the regulation of the main steps during vessel formation and/or remodeling of preexisting vessels. For instance, matrix metalloproteinases (MMPs) influence angiogenesis by degrading matrix molecules and by activating or releasing growth factors sequestered within the extracellular matrix, such as VEGF, basic fibroblast growth factor (FGF), and insulin growth factor-1 (29). For its part, the formation of the vascular wall is an important step in vessel stabilization and maturation (21). Signaling platelet-derived growth factor system (PDGFB/PDGFR β), as well as angiopoietins (*ANGPT-1*, *ANGPT-2*, and their receptor *TEK*, also called *Tie2*) are involved in recruiting mural cells (pericytes and smooth muscle cells) (7, 37). The transforming growth factor (TGF)- β superfamily, which includes the bone morphogenetic proteins, has also been shown to be a critical regulator of pulmonary vascular remodeling in both secondary and idiopathic pulmonary hypertension (PH) (8, 28). Many of these factors may have effects on the proliferation and apoptosis of endothelial and/or smooth muscle cells. Taken together, the combination of factors/receptors involved in vascular remodeling remains a puzzling question.

Identification of the key molecules involved in the regulation of angiogenesis may provide new possibilities for the devel-

* M. M. Musri and V. I. Peinado contributed equally as senior authors.

Address for reprint requests and other correspondence: V. I. Peinado; Cellex P2A, Facultat de Medicina, Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain (e-mail: vpeinado@clinic.ub.es).

opment of suitable drugs for angiogenesis inhibition or stimulation in respiratory diseases, such as PH and emphysema. The aim of the present study was to examine the gene expression profile of 46 main growth factors, receptors, and key metalloproteinases in muscular pulmonary arteries obtained from lung resected specimens and to relate their expression with the degree of wall remodeling. A univariate analysis showed that remodeling of muscular pulmonary arteries was exclusively associated with higher expression of *ANGPT-2*. Nevertheless, a multivariate analysis showed that *ANGPT-2* gene expression balanced with the expression of *VEGF*, *MMP-2*, and β -catenin (*CTNNB-1*) could partially explain the structural derangements of the arterial wall.

MATERIALS AND METHODS

Tissue Specimens

Surgical lung specimens were obtained from 29 subjects who underwent lobectomy or pneumonectomy for localization of a solitary pulmonary nodule. Subjects had normal lung function ($n = 18$) or criteria for COPD ($n = 11$), defined as a forced expiratory volume in 1 s (FEV_1) $< 80\%$ and a FEV_1 -to-forced vital capacity ratio < 0.7 . Patients with large-sized tumors were excluded from the study. The study was approved by our institution's Committee on Human Research, and all subjects gave written, informed consent.

After lung resection, pulmonary arteries were selected from regions distal to the tumors to ensure that there was not an infiltration of cancer cells in the tissue sample. Pulmonary arteries adjacent to the membranous bronchioles, measuring ~ 2 cm long and with an external diameter within 1–2 mm (distributing arteries), corresponding to a fourth or a fifth segment, were carefully dissected under microscope and cleaned of surrounding parenchyma and connective tissue. The histology of these pulmonary segments revealed the presence of an internal elastic lamina and an artery wall composed mainly of smooth muscle cells (Fig. 1). Two 3-mm-long rings were fixed in 4% paraformaldehyde, cryo-embedded in OCT, and frozen at -80°C for immunohistochemical purposes. The rest of the pulmonary segments were preserved in RNA later solution (Ambion) and frozen at -20°C .

Validation cohort. Additionally, plasma aliquots were obtained from a different set of subjects diagnosed with COPD ($n = 62$), with or without criteria for PH, and from healthy subjects ($n = 48$). Plasma was frozen and stored at -80°C until analysis.

Assessment of Vascular Remodeling

Morphometric characteristics of pulmonary muscular arteries were analyzed in formalin-fixed, paraffin-embedded lung tissue sections processed with elastic orcein stain. At least 10 arteries from each subject with complete elastic laminae were evaluated using a computerized image analysis system (Leica Qwin), as previously described (5). External and internal elastic laminae and the inner aspect of the intima were outlined. The areas occupied by the muscular layer, the intimal layer, and the lumen were expressed as percentages of the total area. A mean value of intimal thickening was obtained for each subject and used as a value of vascular remodeling.

Grouping Variables

According to the intimal thickening of pulmonary arteries, subjects were classified into tertiles: first tertile correspond to subjects with the "lowest degree of remodeling," group R1; second tertile correspond to subjects with "medium degree of remodeling," group R2; third tertile correspond to subjects with the "greatest degree of remodeling," group R3.

RNA Extraction

Total RNA was extracted from arterial segments or lung tissues (~ 10 mg of tissue) using Trizol Reagent (Life Technologies, GIBCO BRL, Gaithersburg, MD), in accordance with the manufacturer's instructions. RNA quality was checked with the LabChip Test kit using the Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA).

Gene Selection and Quantitative RT-PCR

Forty-six genes known to be modulators of the angiogenic process and/or involved in smooth muscle cell proliferation were studied. A list of the genes, grouped by families, is shown in Supplemental Table S1. (Supplemental material for this article is available online at the journal website.) Human β -actin and GAPDH were used as endogenous controls.

Specific TaqMan Gene Expression assays for each gene were selected from the manufacturer's database (Applied Biosystems, Foster City, CA), and gene expression was determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) with TaqMan low-density arrays (TLDA; Applied Biosystems).

TLDA

Each TLDA was configured with 48 genes by duplicate for four samples. Briefly, 2 ng of DNase-treated RNA from each sample were used for reverse transcription into 100 μl of cDNA. For each sample, 40 μl of synthesized cDNA were mixed with 210 μl of TaqMan universal PCR master mix (PE Applied Biosystems, New Jersey, NJ) and 170 μl of PCR water to form the reaction mix. Four hundred microliters of this mix were inserted on the microfluidic cards into mini-wells containing primers and probes of genes in duplicate. For each 384-well card, two matched cDNA samples were included at the same time for qRT-PCR reaction and analysis. qRT-PCR reaction and laser scanning were performed on an ABI 7900HT genotyper with SDS2.1 software. Expression level of each gene was analyzed from the mean of its duplicates, and genes with reproducible amplification curves of both duplicates were analyzed and presented.

Array Validation by qRT-PCR

Selected genes underwent qRT-PCR for independent confirmation of relative expression levels in a Chromo 4 Real Time PCR detector (Bio-Rad, Hercules, CA) using the sensiMix dt kit (Quantace, San Mateo, CA) based on the DNA double-strand-specific SYBR green I dye for detection. Results were normalized to the means of both GAPDH and β -actin expression levels, and relative gene expression was analyzed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (cycle threshold) method. Primers were designed in accordance with human sequence database (Genome Browser).

Laser-Assisted Microdissection and Gene Amplification

Intrapulmonary arteries with diameters of 250–500 μm adjacent to the respiratory bronchioles were selected from lung tissue ($n = 18$) cryo-sections (16 μm thick) mounted on glass slides, and microdissected under optical control using a Laser Microbeam System (LEICA, Wetzlar, Germany). Briefly, after hemalaun staining for 45 s, the sections were immersed in 70% and 96% ethanol and stored in 100% ethanol until use. No more than 10 sections were prepared at once to reduce the storage time. Fifty arteries from each subject were identified and extracted. The external elastic lamina was outlined, and the arteries were then transferred into a reaction tube containing 65 μl of cold RNA lysis buffer.

Total RNA from microdissected arteries was purified using the RNeasy Micro Kit (Applied Biosystems), quantified with ND-2000 (Nanodrop), and qualified with 2100 bioanalyzer Agilent (xip picco). RNA was then reverse-transcribed using 0.25 μl of random primers in

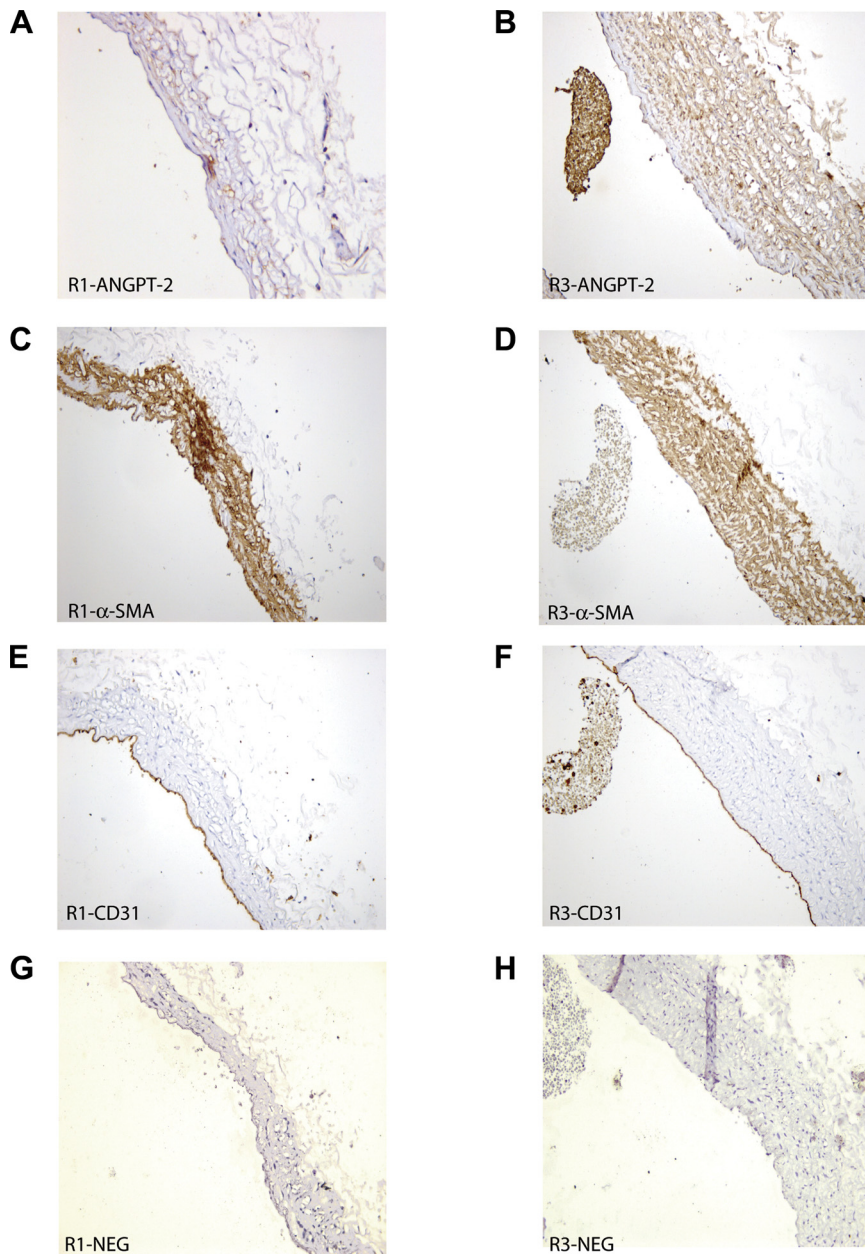


Fig. 1. Immunohistochemical staining of transverse sections of pulmonary arteries >1 mm obtained surgically from a patient with low remodeled arteries (R1; A, C, E, and G) and a patient with highly remodeled walls (R3; B, D, F, and H). A and B: pulmonary artery showing intense immunoreactivity to angiopoietin-2 (ANGPT-2). C and D: transverse sections stained with α -smooth muscle actin (SMA). E and F: immunohistochemistry against CD31 localized in the endothelium. G and H: negative controls.

20 μ l of final volume reaction. Ten nanograms of cDNA were preamplified according to commercial guidelines using the TaqMan Gene Expression Assay Kit (Applied Biosystems) and the *ANGPT-2* primer designed by TaqMan (Hs01048042_m1, Applied Biosystems). After 14 cycles of preamplification, the resulting product was diluted in Tris-EDTA buffer (1:20). PCR was performed with 2.5 μ l of cDNA mixed with 0.5 μ l of PCR Primers (20 \times) and 10 μ l of TaqMan gene expression master mix. PCR was performed with 2.5 μ l of cDNA in a GeneAmp 7900TH PCR cyclor (Applied Biosystems).

Immunohistochemistry

Serial 2- μ m-thick sections were cut from formalin-fixed OCT-embedded tissue blocks containing pulmonary artery rings. One slide from each series was stained with hematoxylin-eosin for light microscopic examination and artery location.

Sections were immunostained with different monoclonal antibodies using the avidin-biotin complex/horseradish peroxidase (HRP)

method (K355; Dako, Glostrup, Denmark). Briefly, to inhibit peroxidase activity, sections were incubated with 0.5% hydrogen peroxide in methanol. After three washouts with phosphate-buffered saline (PBS), nonspecific binding was suppressed with normal goat serum followed by incubation of the following primary monoclonal antibodies: anti-human ANGPT-2 (R&D Systems), anti-smooth muscle α -actin (Dako), and anti-CD31 (Dako). After three washouts in PBS, sections were incubated with biotinylated rabbit anti-mouse immunoglobulin (E0354; Dako) followed by treatment with the avidin-biotin complex/HRP. Negative controls were done with nonimmune serum. Immunopositive cells were visualized by a solution of diaminobenzidine and hydrogen peroxide (Dako). The positive area and the intensity were evaluated by an analysis software (Image-Pro, Media Cybernetics, Buckinghamshire, UK) on 20 randomly selected fields of each subject ($n = 29$). The stained areas for each individual were normalized by the total area. An "Integrated Intensity Value" was calculated by multiplying the percentage of stained area by their intensity value in each image.

ANGPT-2 Plasma Levels in COPD Patients

ANGPT-2 was assessed by sandwich ELISA (DuoSet, R&D Systems, Abingdon, UK) in plasma obtained from a cohort of patients diagnosed with COPD ($n = 62$; 17 current smokers and 45 former smokers) and compared with healthy controls ($n = 48$; 27 nonsmokers and 21 current smokers). Patients with COPD were subsequently divided in two subgroups: COPD with PH [COPD-PH(+); $n = 16$, 2 current smokers and 14 former smokers] and COPD without PH [COPD-PH(-); $n = 46$, 14 current smokers and 32 former smokers]. Briefly, R&D ELISA plates were incubated overnight with 100 μ l of diluted capture antibody for ANGPT-2 in PBS (pH 7.2). This was followed by three washes with buffer (PBS, pH 7.2 and 0.05% Tween 20). Antigen blocking was done by 1% bovine serum albumin in PBS for 1 h. Recombinant proteins were serially diluted as recommended, to obtain a seven-point standard curve. All of the samples were diluted 1:2 in reagent diluent (R&D Systems). Samples and standards were incubated for 1 h at room temperature on a shaker at 500 rpm, followed by washing and addition of detection antibodies, which were incubated for 1 h. After four washes, streptavidin-HRP was added and incubated for 20 min. The substrate tetramethylbenzidine/H₂O₂ (Bangalore, Genie, India) was added, and plates were incubated at room temperature in the dark for 20 min. Fifty microliters of stop solution (2N H₂SO₄) were then added to each well, and optical density was assessed at 450 nm.

Statistics

Data analysis was performed using Real-Time StatMiner software from Integromics (<https://www.integromics.com>). Relative quantification (RQ) was based on the comparative Ct method using *GAPDH* and β -actin as endogenous controls. For differential expression analysis between groups, a limma modified *t*-test (33) was used to calculate $\Delta\Delta$ Ct quantities [$\Delta\Delta$ Ct = mean Δ Ct value (target samples) – mean Δ Ct value (control samples)]. RQ values were calculated from these $\Delta\Delta$ Ct quantities ($RQ = 2^{-\Delta\Delta Ct}$) and used for fold-change computations. In parallel to this analysis, conventional statistical assessments of the data (RQ values) were also conducted for statistical tests by means of Sigmaplot (version 11.0; Systat Software, Chicago, IL) and SPSS (version 13.0; SPSS, Chicago, IL) packages.

Univariate analysis. Data are expressed as means \pm SD for normally distributed data or as medians and interquartile range for skewed distribution (Kolmogorov-Smirnov test). Statistical differences for each gene were assessed using the Kruskal-Wallis analysis of variance, and post hoc comparisons between groups were performed with the Dunn test.

Correlations. Correlations between variables were analyzed with Pearson's coefficient. Probability values lower than 0.05 were considered as significant.

Multivariate analysis. DISCRIMINANT ANALYSIS. A linear discriminant function analysis with cross-validation was used to determine which variables best discriminate between groups. We assumed the degree of remodeling as the categorical variable, obtained by classifying pulmonary arteries into three groups according to the intimal thickness using the tertiles as cutoff values. The performance of the analysis was evaluated by leave-one-out cross-validations. Post hoc, the relative strength of selected variables in this analysis was checked by multiple linear regression analysis.

Multiple linear regression. We performed a regression analysis using as explanatory variables the $-Ct$ values of genes resulting from the previous discriminant analysis variables and the percentage of intima as the independent variable. In this analysis, each gene was previously evaluated for outliers and removed before running the test.

After the multiple regression analysis of genes selected from discriminant analysis, the explanatory variables (genes) used were evaluated for multicollinearity using the variance inflation factor and removed from the equation if they were above 4. Lastly, no significant variables ($P > 0.05$) on the model were removed from the equation.

Network analysis. A network was constructed using the gene expression matrix correlation obtained after a Pearson analysis between each pair of genes. The network generated was compiled in simple interaction format amenable to Cytoscape for further topological analysis (32). In this network, nodes represent the genes, and the network edges (connecting lines) are depicted when P denotes a significant correlation ($P < 0.05$) with each other. The size of nodes is proportional to the betweenness centrality, whereas the thickness of edges is constructed from the edge betweenness value between each pair of genes. The betweenness centrality of a node reflects the amount of control that this node exerts over the interactions of other nodes in the network, while edge centrality represents a bridge-like connector between two parts of a network, the removal of which may affect the communication between many pairs of nodes through the shortest paths between them.

RESULTS

Subjects

Eleven patients with COPD and 18 subjects with normal lung function (9 nonsmokers and 9 smokers) were enrolled in the study (Table 1). Patients with COPD had significantly lower FEV₁, forced vital capacity-to-FEV₁ ratio, and diffusing capacity for carbon monoxide than healthy controls. Groups formed according to their degree of remodeling were matched for subjects with COPD and subjects with normal lung function. There were no differences in respiratory variables between groups.

The histology of these pulmonary segments revealed the presence of an internal elastic lamina and an artery wall composed mainly of smooth muscle cells (Fig. 1).

After RNA extraction, we studied the expression profile of 46 genes, including growth factors, their receptors, MMPs, and cytokines in 29 subjects, according to the degree of remodeling by means of TLDA, which were run in parallel to the 48 qPCRs. After normalization of gene expression, we performed several bioinformatics approaches to analyze the data in relation to the degree of pulmonary vascular remodeling by grouping the subjects into tertiles, according to their intimal thickness.

Univariate Analysis

Table 2 shows the fold change in all genes studied according to their degree of remodeling. Results of the TLDA showed that *ANGPT-2* gene expression increased significantly in both group R2 and R3 pulmonary arteries compared with the ones

Table 1. General characteristics of the population (nonsmokers, smokers, and COPD)

	Nonsmokers	Smokers	COPD
<i>n</i>	9	9	11
Age, yr	66 \pm 7	64 \pm 8	62 \pm 5
Tobacco, packs/yr	0	63 \pm 32 [†]	66 \pm 32 [†]
Smoking status (current/former)	N/A	6/3	8/3
FEV ₁ , %predicted	100 \pm 15	92 \pm 11	66 \pm 12* [†]
FEV ₁ /FVC, %	74 \pm 5	77 \pm 5	56 \pm 8* [†]
DL _{CO} , %predicted	92 \pm 14	77 \pm 18	74 \pm 12*
PaO ₂ , mmHg	88 \pm 15	88 \pm 9	75 \pm 9
Intimal thickness, %total area	19 \pm 6	24 \pm 7	23 \pm 9
R1/R2/R3 distribution	4/2/3	2/4/3	3/4/4

Values are means \pm SD; *n*, no. of subjects. COPD, chronic obstructive pulmonary disease; FEV₁, forced expiratory volume in 1 s; FVC, forced vital capacity; DL_{CO}, diffusing capacity for carbon monoxide; PaO₂, arterial O₂ partial pressure; R1, R2, and R3: subjects with the lowest, medium, and greatest degree of remodeling, respectively; N/A, nonapplicable. * $P < 0.05$ vs. nonsmokers. [†] $P < 0.05$ vs. smokers.

Table 2. Univariate analysis: differential expressions for the main pairwise comparisons

Gene	R2-R1		Gene	R3-R1	
	P value	Fold change (log10 RQ)		P value	Fold change (log10 RQ)
ANGPT-2	0.0153	0.47	ANGPT-2	0.0247	0.43
TEK	0.0810	-0.16	MMP2	0.0650	0.29
MMP12	0.1114	0.79	TEK	0.1447	-0.13
CTNNB1	0.1634	-0.06	MMP7	0.1550	-0.47
FBLN5	0.1997	-0.07	CASP3	0.2690	0.15
MMP2	0.2028	0.20	ACVRL1	0.2936	-0.12
BMPR1A	0.2758	0.06	EDNRA	0.3458	0.10
EDNRA	0.2809	0.12	MMP12	0.3767	0.43
BMPR2	0.2811	-0.05	BMPR1B	0.4409	-0.06
PDGFRB	0.3087	0.08	IGF1	0.4551	0.10

RQ, relative quantification.

with low remodeling (*group R1*). *TEK* gene expression was lower and *MMP-2* gene expression was higher in remodeled arteries, although the differences were not statistically significant (Table 2). Immunohistochemistry results also showed that in both R3 and R2, *ANGPT-2* expression was significantly higher in cells lying in the intima and within the endothelium of pulmonary artery rings (Fig. 1) than in the R1 group (integrated intensity value for R3: 3,593 ± 940; R2: 3,291 ± 1,617; R1: 1,713 ± 887; ANOVA, *P* = 0.01).

Correlations

Protein expression of *ANGPT-2* assessed by immunohistochemistry correlated directly with the degree of remodeling assessed by planimetry (Fig. 2A). Moreover, gene expression of *ANGPT-2* in arteries of middle size (1- to 2-mm diameter) obtained surgically correlated directly with those narrower

arteries (0.2- to 0.5-mm diameter) obtained by laser microdissection, thus reflecting a concordance in two different size segments of the pulmonary vascular tree (Fig. 2, B and C). Gene expression of *ANGPT-2*, in both middle- and small-sized arteries, also correlated with the intimal enlargement (*r* = 0.54 and *r* = 0.49, respectively; *P* < 0.05).

Multivariate Analysis

Discriminant analysis. We used discriminant analysis to study the specific distribution pattern of 46 growth factors and receptors, according to the degree of remodeling of the pulmonary arteries. The analysis revealed three distinct clusters of growth factor distribution: less remodeled (R1), medium remodeled (R2), and highly remodeled (R3) pulmonary arteries (Fig. 3). Figure 3A shows the coefficients of 10 genes in the two canonical functions generated by the analysis: *ANGPT-2*,

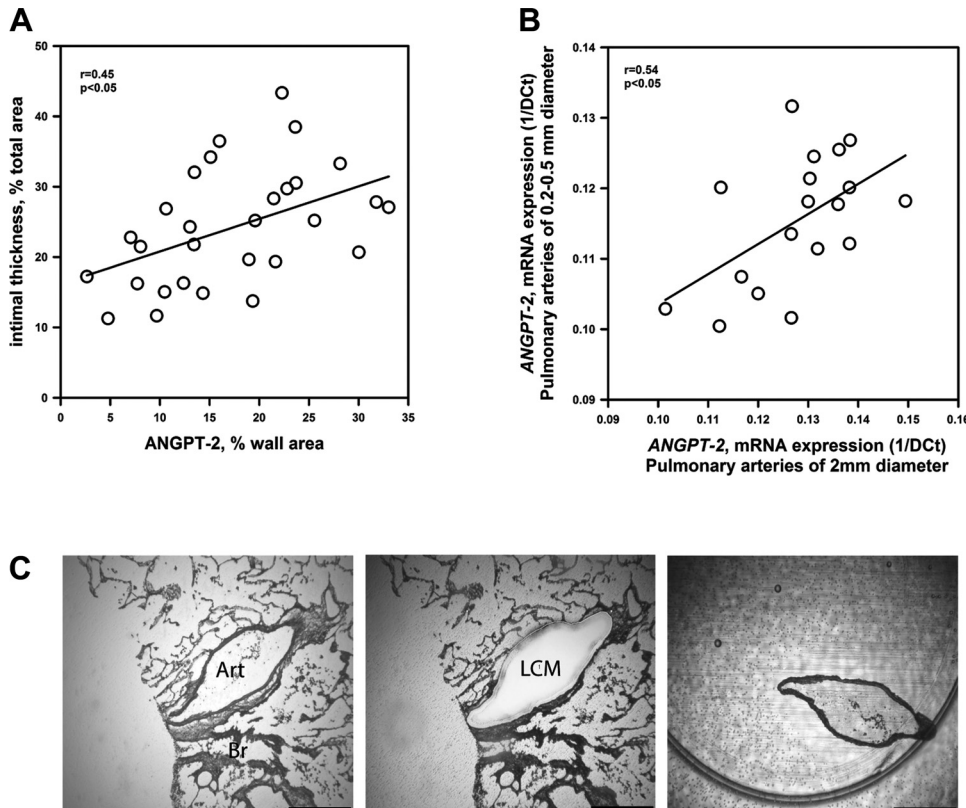


Fig. 2. A: relationship between the integrated intensity value of *ANGPT-2* and the intimal thickness (*n* = 29). B: relationship between gene expression of *ANGPT-2* from greatest arteries (>1 mm) obtained surgically and smallest muscular arteries (0.2- to 0.5-mm diameter) obtained by laser capture microscopy (LCM; *n* = 18; Pearson correlation). Ct, cycle threshold. C: microphotographs of LCM process in a typical muscular artery (Art) close to their bronchiole (Br). Scale bar: 250 μm.

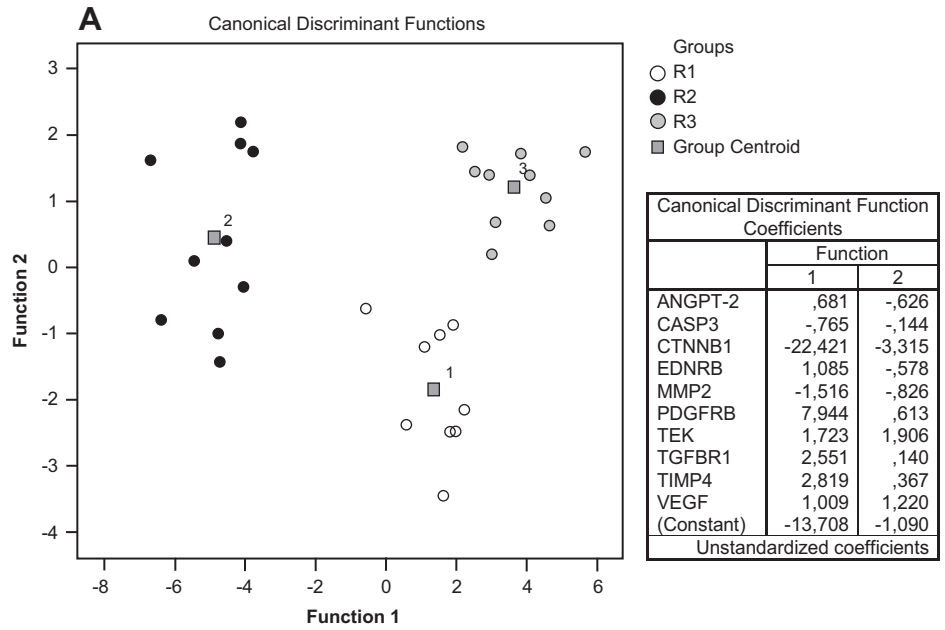


Fig. 3. Discriminant analysis. A: graphic representation of the discriminant functions 1 and 2. The values for discriminant functions 1 and 2 (D_1 in X-axis; D_2 in Y-axis) for each individual were obtained as a linear function of 10 variables [*ANGPT-2*, *CASP3* (caspase-3), *CTNNB-1* (β -catenin), *EDNRB* (endothelin receptor B), *MMP-2* (metalloproteinase-2), *PDGFRB* (platelet-derived growth factor receptor B), *TEK*, *TGFBR-1* (transforming growth factor B receptor-1), *TIMP4* (tissue inhibitor of metalloproteinase-4), and *VEGF* (vascular endothelial growth factor)], where $D = u_1X_1 + u_2X_2 + \dots + u_{10}X_{10}$. The coordinates of centroid's group are calculated, resolving the equations with the mean values of each variable in each group. B: table with leave-one-out, cross-validation values. R2, group with medium degree of remodeling.

	Groups	Predicted Group Membership			Total	
		1	2	3		
Original	Count	R1	9	0	0	9
		R2	0	10	0	10
		R3	0	0	10	10
	%	R1	100	0	0	100
		R2	0	100	0	100
		R3	0	0	100	100
Cross-validated ^a	Count	R1	9	0	0	9
		R2	0	10	0	10
		R3	1	0	9	10
	%	R1	100	0	0	100
		R2	0	100	0	100
		R3	10	0	90	100

a. Cross validation is done only for those cases in the analysis. In cross validation, each case is classified by the functions derived from all cases other than that case.
 b. 100% of original grouped cases correctly classified.
 c. 96.6% of cross-validated grouped cases correctly classified.

CASP3 (caspase-3), *CTNNB-1*, *EDNRB* (endothelin receptor B), *MMP-2*, *PDGFRB* (platelet-derived growth factor receptor B), *TEK*, *TGFBR-1* (transforming growth factor B receptor-1), *TIMP4* (tissue inhibitor of metalloproteinase-4), and *VEGF*. Figure 3B shows the leave-one-out cross-validation, which gives 96.6% accuracy for cases classified by the degree of remodeling. In this cross-validation, the cluster of highly remodeled arteries (group R3) was less reliable. In particular, one case of group R3 was misclassified and was assessed as group R1. The causes of the misclassification may require further investigation. As shown in Fig. 3B, the total rate of correct classification was 96.6%, indicating that 96.6% of total subjects were classified into the correct groups (100% correct for less remodeled, 100% for medium remodeled, and 96.6% for highly remodeled).

Multiple linear regression analysis. A multiple linear regression analysis was performed using the data obtained in the discriminant analysis. After a first round, independent variables with $P > 0.05$ were removed from the equation. The test with

significant variables was then run again. The subsequent analysis did not show multicollinearity among significant independent variables, and the residuals did not indicate any unusual patterns. In this model, *ANGPT-2*, *MMP-2*, *VEGF*, *TEK*, and *CTNNB-1* explained 52.0% of the variability of the intimal thickness ($R^2 = 0.520$), showing a significant improvement over smaller linear models. The regression coefficient for the independent variable *CTNNB-1* represented the greatest contribution in the equation (Table 3).

Network Analysis

To better understand the underlying mechanism of intimal thickening, a gene network was built using the matrix correlation of gene expression for each pair of genes. This network inference and its simple parameters are shown in Fig. 4. The network constructed from 46 genes showed substantial decentralization. However, the notable edge betweenness (proportional to the edge thickness) connecting the intimal enlarge-

Table 3. Multiple regression analysis of genes selected from discriminant analysis

$$\% \text{ INT.} = 47.269 + (2.290 \times \text{ANGPT2}) + (2.607 \times \text{MMP2}) + (18.799 \times \text{CTNNB1}) - (6.342 \times \text{TEK}) - (3.984 \times \text{VEGFA})$$

$N = 30, R = 0.772, R^2 = 0.595, \text{ adjusted } R^2 = 0.511, \text{ standard error of estimate} = 6.200$

	Coefficient	Standard Error	t	P	Variance Inflation Factor
Constant	47.269	9.525	4.963	<0.001	
ANGPT2	2.290	0.820	-2.792	0.010	1.264
MMP2	2.607	1.117	-2.334	0.028	1.283
CTNNB1	18.799	5.263	-3.572	0.002	3.424
TEK	-6.342	2.187	2.900	0.008	2.043
VEGFA	-3.984	1.452	2.744	0.011	2.247

All independent variables appear to contribute to predicting percent intimal thickness (% INT), as % total area. ($P < 0.05$).

ment and MMP-2 indicates the influence of the latter on vascular remodeling.

Determination of ANGPT-2 Plasma Levels

Analysis of ANGPT-2 plasma levels in another cohort of patients with COPD revealed higher values in this group than in nonsmokers (Table 4). In the COPD group, current smokers showed increased levels of ANGPT-2 than former smokers (Fig. 5A). Interestingly, in a subsequent analysis, COPD patients with PH showed higher values of ANGPT-2 ($P < 0.05$) than those without (Fig. 5, B and C). Moreover, in COPD patients without PH, plasma levels of current smokers were higher than those of former smokers (Fig. 5C). In addition, we found a significant correlation of ANGPT-2 plasma levels and the number of packs/year (Fig. 5D).

DISCUSSION

In this study, we evaluated the gene expression profile of a selected family of growth factors and receptors in muscular pulmonary artery segments obtained from lung resected specimens. We related their expression with the degree of vessel wall remodeling.

The univariate analysis revealed few changes in the gene expression pattern of growth factors in remodeled and nonremodeled arteries. The most significant change observed was in ANGPT-2, whose level of expression increased almost threefold in the medium and highly remodeled arteries. The precise role of increased ANGPT-2 in the remodeled arteries in these subjects is unknown. Usually, this protein is considered as an antagonist of the angiogenic factor, ANGPT-1, acting as a stabilizer of the endothelium (11, 34). Therefore, the effects observed in remodeled vessels may be due to a deficit of ANGPT-1 rather than a direct effect of ANGPT-2. The in vivo effects of elevated ANGPT-2 have been studied in animal models (10, 24). In these studies, when ANGPT-2 was overexpressed, a reversion of vasculature was observed toward a more plastic state, providing stabilization signals to promote sprouting and remodeling (24, 35). These signals may loosen the vessel structures, reducing endothelial cell contacts with the extracellular matrix (31) and disassociating the peri-endothelial support cells. Interestingly, these findings are in accordance with the instability of the endothelium and proliferating intimas observed in PA of subjects with COPD (27, 30), as well as in advanced atherosclerotic lesions in coronary arteries (9). However, in addition to the inhibition of ANGPT-1-dependent responses in endothelial cells, ANGPT-2 may act as a real agonist in smooth muscle cells mediated by the same

TEK receptor. Pulmonary artery smooth muscle cell treated in vitro with ANGPT-2 showed an increase in the expression of α -actin and greater survival of these cells in accordance with a greater muscularization of pulmonary arteries (data not shown). Also, Yuan et al. (38) demonstrated in vitro that ANGPT-2 is able to induce phosphorylation of TEK, causing downstream effects in endothelial cell, although these effects may be weaker than those produced by ANGPT-1.

The multivariate analysis demonstrated that a combination of 10 factors explained up to 96% of the classification of arteries, according to the degree of vascular remodeling. Of these 10 factors, five showed a multiple correlation between them, ANGPT-2, MMP-2, VEGF, TEK, and CTNNB-1 explained 52.0% of the variability of the intimal thickness, and β -catenin was the factor with the most weight in the equation. Although individually these factors have been related in some way with vascular remodeling, the combination of several factors may be of greater physiological relevance for revealing potential synergistic actions. For instance, it has been suggested that the loss of vessel structures might make endothelial cells more accessible and responsive toward the angiogenic inducer VEGF (and probably to other inducers as well) (18). It is possible then that endothelial cells in the presence of VEGF (or another angiogenesis inducer) may become activated to migrate and proliferate, producing new capillary sprouts and tubule structures. The continuous presence of ANGPT-1 could allow a shift in the local balance of ANGPT-1/ANGPT-2 back in favor of ANGPT-1, affecting the maturation and stabilization of the newly formed vessels. There appears to be a collaboration between VEGF, ANGPT-2, and ANGPT-1 to elicit angiogenesis (35). In contrast, vascular regression is associated with higher levels of ANGPT-2 expression in the absence of the activating (survival) signal from VEGF, which presumably overwhelm the ANGPT-1 signal and thus produce a catastrophic detachment from the matrix and supporting cells, likely resulting in cellular apoptosis. This assumption has been tested in experimental studies of endothelial cell cultures and explanted veins (31) in which exogenous ANGPT-2 caused endothelial cell detachment. Interestingly, in our study, the multiple linear regression analysis revealed an interrelationship between ANGPT-2, VEGF, and TEK, which was suggestive of this scenario. In this model, the increase in ANGPT-2 expression seems to run in parallel to the reduction of TEK and VEGF expression, a situation that suggests inhibition of ANGPT-1. On the other hand, little is known about the potential synergism of angiopoietin and MMP-2. It is recognized that MMPs play a role in the regulation of cyto-

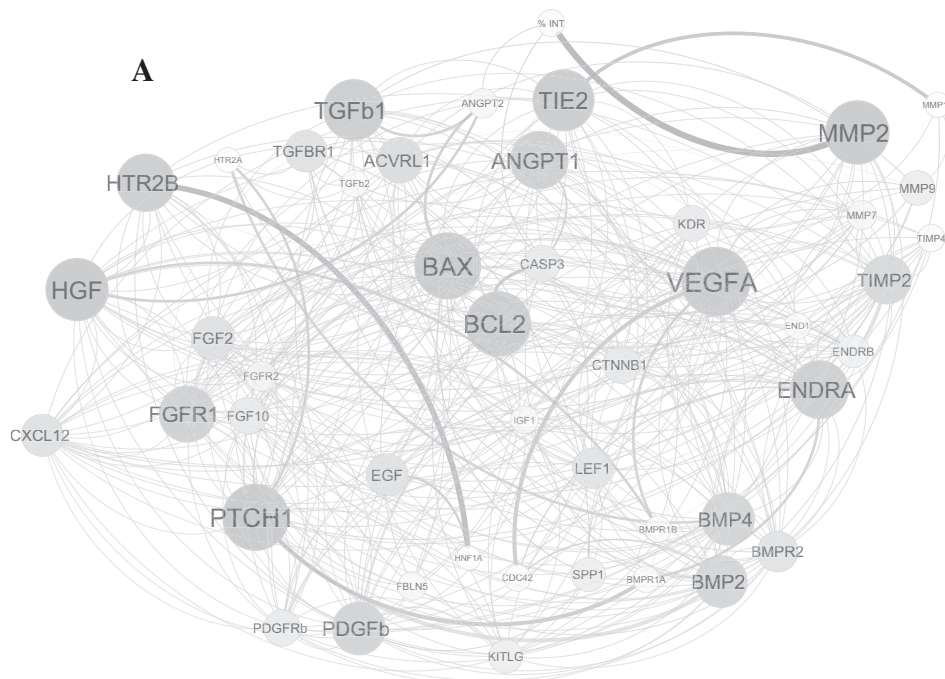


Fig. 4. A: network analysis of 46 genes and the percentage of intima. The edge between variables denotes $P < 0.05$. The size of nodes (variables) is proportional to the betweenness centrality, whereas the thickness of the edges is proportional to the edge centrality. The picture was generated by Cytoscape software (32). B: table showing the simple parameters compared with random networks (Erdos-Renyi and Barabasi-Albert models; generated by random networks, a plugin in Cytoscape).

B

Clustering coefficient	0.606	Number of nodes	47
Connected components	1	Network density	0.385
Network diameter	4	Network heterogeneity	0.517
Network radius	0.302	Isolated nodes	0
Shortest paths	2162 (100%)	Number of self-loops	0
Characteristic path length	1710	Multi-edge node pairs	0
Av. number of neighbors	17.702		

kines, chemokines, and growth factors (4, 17). MMP-2 has been implicated in tissue remodeling, and the present results suggest a positive relationship between these two proteins. The expression of *MMP-2* showed a positive correlation with the enlargement of the intima, stressing the importance of this association in vascular remodeling. Network analysis also revealed that the expression of *MMP-2* was directly linked to the expression of main fibrogenic growth factors, such as *FGF*, *hepatocyte growth factor*, and *bone morphogenetic protein-2*, indicating that this node represents an important bridge in the signaling cascade during vascular remodeling.

VEGF-mediated disruption of cell-cell interactions has been attributed to the dissociation of β -catenin from VE-cadherin (36). Interestingly, this effect may be opposed by ANGPT-1, as it specifically counteracts the ability of VEGF to induce the phosphorylation-dependent redistribution of VE-cadherin, thereby rescuing the endothelial barrier function (15). In fact, the expression of β -catenin was related directly to the expression of TEK receptor. The potential involvement of the Wnt/ β -catenin pathway has also been highlighted in atherosclerosis (13). Interestingly, the analysis of human carotid artery athero-

sclerotic plaques revealed high levels of cell proliferation and active β -catenin in disrupted plaques compared with stable plaques, suggesting a role for β -catenin signaling in smooth muscle cell proliferation within atherosclerotic plaques (6). In our study, *β -catenin* is an important node in the signaling network connecting with multiple growth factors regulating cell proliferation, with *FGF2* presenting the strongest associ-

Table 4. Plasma ANGPT-2 levels in COPD

	Nonsmokers	Smokers	COPD
<i>n</i>	27	21	62
Age, yr	57 ± 8	55 ± 7	60 ± 6*†
Tobacco, packs/yr	3 ± 2	31 ± 24*	64 ± 28*†
Smoking status (current/former)	0/8‡	21/0	17/45
FEV ₁ , %predicted	106 ± 14	101 ± 12	45 ± 21*†
FEV ₁ /FVC, %	78 ± 5	77 ± 5	41 ± 14*†
DL _{CO} , %predicted	91 ± 15	84 ± 9	53 ± 19*†
ANGPT-2, ng/ml	804 ± 362	1,036 ± 533	1,174 ± 706*

Values are means ± SD; *n*, no. of subjects. ‡19 Nonsmokers have never smoked. * $P < 0.05$ vs. nonsmokers. † $P < 0.05$ vs. smokers.

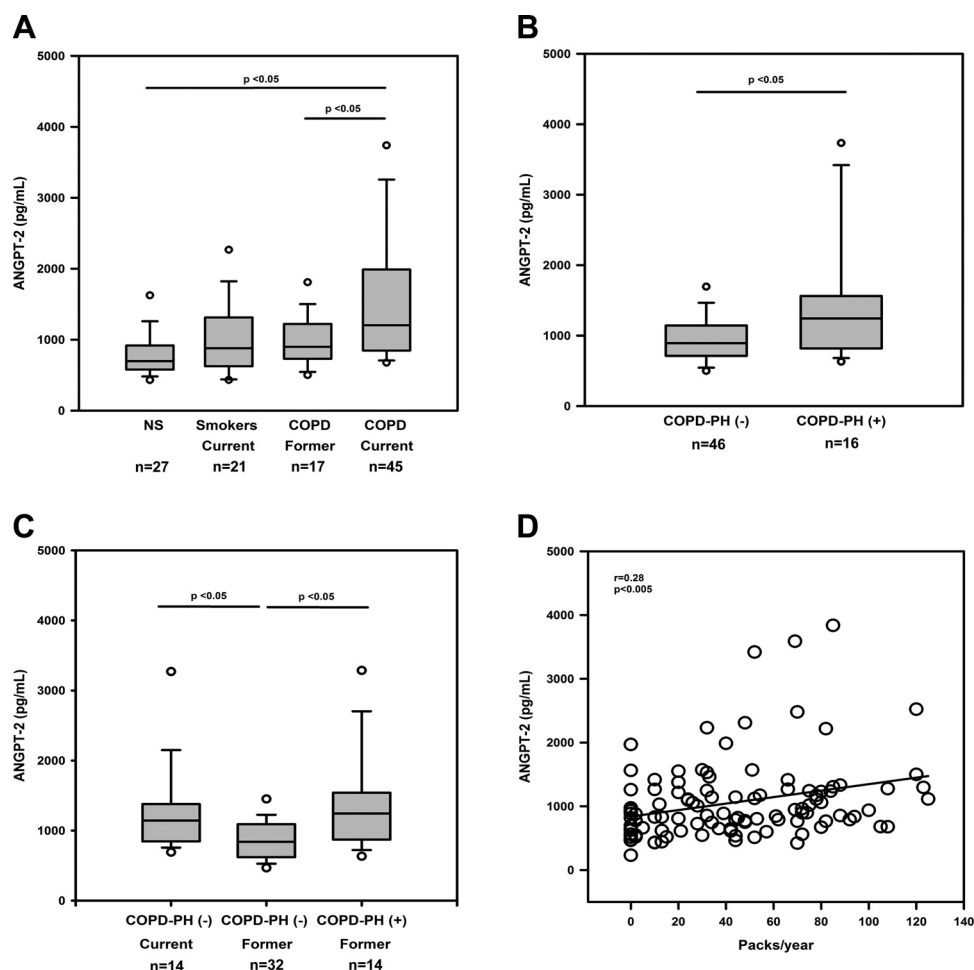


Fig. 5. Values of ANGPT-2 in plasma. *A*: determination in a cohort of chronic obstructive pulmonary disease (COPD) patients according to their smoking status and compared with nonsmokers (NS) and current smokers with normal lung function. *B*: patients grouped according to a trans-tricuspid systolic pressure gradient suggestive of pulmonary hypertension (PH; >31 mmHg), assessed by Doppler echocardiography. +, With PH; -, without PH. *C*: COPD patients grouped according to their smoking status. The box represents the interquartile range. The solid line indicates the median. The whiskers extend from the box to the 90th and 10th percentiles. *D*: linear regression within ANGPT-2 plasma levels and the packs/year in all patients studied ($n = 110$; one-way analysis of variance post hoc pairwise comparisons using the Kruskal-Wallis and Dunn tests).

ation. FGF2 has also been associated with intimal hyperplasia in atherosclerosis (20).

The majority of arteries used in this study were obtained from heavy smokers, and previous studies have associated cigarette smoke exposure with greater remodeling in COPD (30). Also, several studies have shown that COPD is associated with oxidative stress, activation of circulating inflammatory cells, and increased levels of proinflammatory cytokines (1, 2, 5). Interestingly, ANGPT-2 expression was upregulated in skeletal muscles of COPD patients, likely due to oxidative stress (25). In accordance with this, plasma levels of ANGPT-2 in COPD former smokers vs. current smokers showed increased values in the latter, also suggestive of a potential effect of oxidative.

Several studies have related circulating angiopoietins to the outcome and severity of various illnesses and have suggested that they may be prognostic biomarkers for survival. In patients with sepsis and septic shock, ANGPT-2 levels in plasma increased and correlated with disease severity, whereas ANGPT-1 levels fell (16). ANGPT-2 concentrations increase in acute coronary syndromes (12), congestive heart failure (22), and cardiogenic shock (23). Since ANGPT-2 was increased in remodeled pulmonary arteries, we hypothesized that ANGPT-2 could be related to PH in COPD, because this condition is associated with the enlargement of the pulmonary arterial wall. We, therefore, analyzed the plasma levels of ANGPT-2 in a cohort of COPD patients previously diagnosed with PH by echocardiography. The analysis showed a

significantly higher level of this cytokine in patients diagnosed with PH. Taking into account our results, the increased level of this protein may be related to a higher degree of pulmonary vascular remodeling, which might recognize ANGPT-2 as a novel biomarker. Interestingly, the increase in ANGPT-2 in PH associated with COPD contrasts with the high levels of ANGPT-1 found in nonfamilial pulmonary artery hypertension and suggests that different mechanisms occur in each condition (14). This finding indicates the need for longitudinal studies evaluating circulating levels of ANGPT-2 before and after treatment of COPD.

In summary, our findings show that pulmonary vascular remodeling is associated with increased expression of ANGPT-2. Higher plasma levels of ANGPT-2 were associated with PH in COPD and with cigarette smoke. An imbalance of ANGPT-2 with related factors, such as VEGF, CTNNB-1, and MMP-2, may partially explain the structural derangements of the arterial wall. MMP-2 may act as a bridge, channeling actions from the main fibrogenic factors.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jose Ramirez, Susana Maqueda, and Nuria Aventin for expert technical assistance, and Raquel Bermudo from the technical staff of Laser Dissection Laboratories for skillfull support during the study. The authors also thank Michael Maudsley for the English revision of the manuscript. This work was developed at the Centre de Recerca Biomèdica Cellex, Barcelona, Spain.

GRANTS

This study was supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III FIS PI10/02175 and PI13/00836, Fundació la Marató de TV3 081310, and Beca Ferrer FUCAP-2007. J. García-Lucio was the recipient of a predoctoral research fellowship from the Instituto de Salud Carlos III. G. Argemi was the recipient of a predoctoral research fellowship from Hospital Clínic (R5-HCPB). O. Tura-Ceide was the recipient of Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer-Biotrack postdoctoral fellowship.

DISCLOSURES

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

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.G.-L., G.A., O.T.-C., M.D., T.P., C.B., N.C.-B., M.M.M., and V.I.P. performed experiments; J.G.-L., G.A., O.T.-C., M.D., T.P., C.B., I.B., and V.I.P. analyzed data; J.G.-L., G.A., I.B., J.A.B., M.M.M., and V.I.P. interpreted results of experiments; J.G.-L. and V.I.P. prepared figures; J.G.-L. and V.I.P. drafted manuscript; O.T.-C., J.A.B., M.M.M., and V.I.P. edited and revised manuscript; J.A.B., M.M.M., and V.I.P. conception and design of research; M.M.M. and V.I.P. approved final version of manuscript.

REFERENCES

- Agusti AG, Noguera A, Sauleda J, Sala E, Pons J, Busquets X. Systemic effects of chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 21: 347–360, 2003.
- Ardite E, Peinado VI, Rabinovich RA, Fernandez-Checa JC, Roca J, Barbera JA. Systemic effects of cigarette smoke exposure in the guinea pig. *Respir Med* 100: 1186–1194, 2006.
- Barbera JA, Peinado VI, Santos S. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 21: 892–905, 2003.
- Barnes PJ. Mediators of chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol Rev* 56: 515–548, 2004.
- Barreiro E, Peinado VI, Galdiz JB, Ferrer E, Marin-Corral J, Sanchez F, Gea J, Barbera JA. Cigarette smoke-induced oxidative stress: a role in chronic obstructive pulmonary disease skeletal muscle dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med* 182: 477–488, 2010.
- Bedel A, Negre-Salvayre A, Heeneman S, Grazide MH, Thiers JC, Salvayre R, Maupas-Schwalm F. E-cadherin/beta-catenin/T-cell factor pathway is involved in smooth muscle cell proliferation elicited by oxidized low-density lipoprotein. *Circ Res* 103: 694–701, 2008.
- Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodeling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development* 125: 1591–1598, 1998.
- Bertolino P, Deckers M, Lebrin F, ten Dijke P. Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. *Chest* 128: 585S–590S, 2005.
- Calvi C, Dentelli P, Pagano M, Rosso A, Pegoraro M, Giunti S, Garbarino G, Camussi G, Pegoraro L, Brizzi MF. Angiopoietin 2 induces cell cycle arrest in endothelial cells: a possible mechanism involved in advanced plaque neovascularization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24: 511–518, 2004.
- Cao Y, Sonveaux P, Liu S, Zhao Y, Mi J, Clary BM, Li CY, Kontos CD, Dewhirst MW. Systemic overexpression of angiopoietin-2 promotes tumor microvessel regression and inhibits angiogenesis and tumor growth. *Cancer Res* 67: 3835–3844, 2007.
- Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. *Nat Med* 9: 653–660, 2003.
- Chong AY, Caine GJ, Freestone B, Blann AD, Lip GY. Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2, and angiopoietin receptor tie-2 levels in congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 43: 423–428, 2004.
- Christman MA, Goetz DJ, Dickerson E, McCall KD, Lewis CJ, Benencia F, Silver MJ, Kohn LD, Malgor R. Wnt5a is expressed in murine and human atherosclerotic lesions. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294: H2864–H2870, 2008.
- Du L, Sullivan CC, Chu D, Cho AJ, Kido M, Wolf PL, Yuan JX, Deutsch R, Jamieson SW, Thistlethwaite PA. Signaling molecules in nonfamilial pulmonary hypertension. *N Engl J Med* 348: 500–509, 2003.
- Gavard J, Patel V, Gutkind JS. Angiopoietin-1 prevents VEGF-induced endothelial permeability by sequestering Src through mDia. *Dev Cell* 14: 25–36, 2008.
- Giuliano JS Jr, Lahni PM, Harmon K, Wong HR, Doughty LA, Carcillo JA, Zingarelli B, Sukhatme VP, Parikh SM, Wheeler DS. Admission angiopoietin levels in children with septic shock. *Shock* 28: 650–654, 2007.
- Greenlee KJ, Werb Z, Kheradmand F. Matrix metalloproteinases in lung: multiple, multifarious, and multifaceted. *Physiol Rev* 87: 69–98, 2007.
- Hanahan D. Signaling vascular morphogenesis and maintenance. *Science* 277: 48–50, 1997.
- Hoeben A, Landuyt B, Highley MS, Wildiers H, Van Oosterom AT, De Bruijn EA. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev* 56: 549–580, 2004.
- Hughes SE. Localisation and differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal and atherosclerotic human arteries. *Cardiovasc Res* 32: 557–569, 1996.
- Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 9: 685–693, 2003.
- Lee KW, Lip GY, Blann AD. Plasma angiopoietin-1, angiopoietin-2, angiopoietin receptor tie-2, and vascular endothelial growth factor levels in acute coronary syndromes. *Circulation* 110: 2355–2360, 2004.
- Link A, Poss J, Rbah R, Barth C, Feth L, Selejan S, Bohm M. Circulating angiopoietins and cardiovascular mortality in cardiogenic shock. *Eur Heart J* 34: 1651–1662, 2013.
- Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science* 277: 55–60, 1997.
- Mofarrah M, Sigala I, Vassilokopoulos T, Harel S, Guo Y, Debigare R, Maltais F, Hussain SN. Angiogenesis-related factors in skeletal muscles of COPD patients: roles of angiopoietin-2. *J Appl Physiol (1985)* 114: 1309–1318, 2013.
- Murayama T, Asahara T. Bone marrow-derived endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *Curr Opin Mol Ther* 4: 395–402, 2002.
- Peinado VI, Ramirez J, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Barbera JA. Identification of vascular progenitor cells in pulmonary arteries of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34: 257–263, 2006.
- Richter A, Yeager ME, Zaiman A, Cool CD, Voelkel NF, Tudor RM. Impaired transforming growth factor-beta signaling in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med* 170: 1340–1348, 2004.
- Rundhaug JE. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J Cell Mol Med* 9: 267–285, 2005.
- Santos S, Peinado VI, Ramirez J, Melgosa T, Roca J, Rodriguez-Roisin R, Barbera JA. Characterization of pulmonary vascular remodeling in smokers and patients with mild COPD. *Eur Respir J* 19: 632–638, 2002.
- Schappenecker M, Fiedler U, Reiss Y, Augustin HG. The Tie-2 ligand angiopoietin-2 destabilizes quiescent endothelium through an internal autocrine loop mechanism. *J Cell Sci* 118: 771–780, 2005.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13: 2498–2504, 2003.
- Smyth GK, Yang YH, Speed T. Statistical issues in cDNA microarray data analysis. *Methods Mol Biol* 224: 111–136, 2003.
- Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiopoietin-1. *Science* 286: 2511–2514, 1999.
- Visconti RP, Richardson CD, Sato TN. Orchestration of angiogenesis and arteriovenous contribution by angiopoietins and vascular endothelial growth factor (VEGF). *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 8219–8224, 2002.
- Wang X, Studzinski GP. Kinase suppressor of RAS (KSR) amplifies the differentiation signal provided by low concentrations 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J Cell Physiol* 198: 333–342, 2004.
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J. Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature* 407: 242–248, 2000.
- Yuan HT, Khankin EV, Karumanchi SA, Parikh SM. Angiopoietin 2 is a partial agonist/antagonist of Tie2 signaling in the endothelium. *Mol Cell Biol* 29: 2011–2022, 2009.

**Gene expression profile of angiogenic factors in pulmonary arteries of COPD:
Relationship with vascular remodeling.**

Jéssica García-Lucio¹, Gemma Argemi¹, Olga Tura-Ceide^{1,2}, Marta Diez¹, Tanja Paul¹, Cristina Bonjoch¹, Nuria Coll-Bonfill¹, Joan A. Barberà^{1,2}, Melina M. Musri^{1*}, Victor I. Peinado^{1,2*}.

***Equally contribution as senior authors**

¹Department of Pulmonary Medicine, Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain; and ²Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) de Enfermedades Respiratorias, Madrid, Spain.

Address for correspondence: Victor I. Peinado; Cellex P2A, Facultad de Medicina, Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain. E-mail: vpeinado@clinic.ub.es

Supplemental material

Table S1. Summary of proteins involved in the angiogenic process and/or in smooth muscle cell proliferation

Name	Main Functions	Source
Growth factors		
Angiopoietin-1 (ANGPT1)	Promotes vessel integrity, inhibits vascular leakage and inflammation, stimulates migration and proliferation and prevents endothelial death.	Widely expressed and present in periendothelial cells in quiescent vasculature.
Angiopoietin-2 (ANGPT2)	Cell activation, proliferation and migration of endothelial cells.	Expressed in areas of endothelial activation and angiogenesis.
Transforming growth factor beta 1 (TGFβ1)	Antiproliferative, induce differentiation, matrix formation, apoptosis and plays an important role in controlling the immune system.	Proliferative and hypertrophic zones and immune system.
Transforming growth factor-beta 2 (TGFβ2)	Embryonic development and suppressor of the effects of interleukin dependent T-cell tumors.	Alveolar macrophages, epithelial cells and smooth muscle cells of vessels and bronchi of normal lungs and lungs with both inflammatory and fibrotic changes.
Hepatocyte growth factor (HGF)	Stimulates mitogenesis, cell motility, and matrix invasion giving it a central role in angiogenesis, tumorigenesis, organ regeneration and wound healing.	Secreted by mesenchymal cells and acts upon epithelial and endothelial cells, but also acts on haemopoietic progenitor cells.
Insulin-like growth factor 1 (IGF1)	Childhood growth and anabolic effects in adults. Promotes angiogenesis and vasorelaxation.	Liver as an endocrine hormone as well as in target tissues in a paracrine/autocrine fashion
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Increases vascular permeability, inducing angiogenesis, vasculogenesis and endothelial cell growth, promoting cell migration and inhibiting apoptosis.	Mostly on cells of the vascular endothelium
Platelet-derived growth factor subunit B (PDGFB)	Mitogenic factor for cells of mesenchymal origin. Embryonic development, cell proliferation, migration, survival and chemotaxis The synthesis is often increased in response to external stimuli, such as exposure to low oxygen, or stimulation with various growth factors and cytokines.	Different types of cells like fibroblasts, vascular smooth muscle cells and vascular endothelial cells.
Endothelin 1 (EDN1)	Stimulates vasoconstriction and maintenance of vascular tone.	Vascular endothelial cells.
Epidermal growth factor (EGF)	Stimulates cell growth, proliferation and differentiation.	Different types of cells like platelets or macrophages.
Stromal cell-derived factor 1 (SDF1)	Stimulates chemotaxis for different types of leukocytes. In early B cell precursors, induces in vitro migration.	Produced by bone marrow stromal cells in areas of inflammatory bone destruction.
Stem Cell Factor (SCF1)	Hematopoiesis, spermatogenesis and melanogenesis.	Sites where hematopoiesis takes place (fetal liver and bone marrow). Fibroblasts and endothelial cells.
Bone morphogenetic protein 2 (BMP2)	Development of bone and cartilage and involved in epithelial to mesenchymal transition, cardiac cell differentiation, TGF beta signaling pathway and hedgehog pathway.	Osteoblasts.
Bone morphogenetic protein 4 (BMP4)	Muscle development, bone mineralization, and inhibition of tumor angiogenesis.	Early embryonic development in the ventral marginal zone and in the eye, heart blood and otic vesicle.
Fibroblast growth factor (FGF2)	Stimulates angiogenesis and proliferation of fibroblasts. Important role in the regulation of cell survival, cell division, cell differentiation and cell migration.	In the bone, transcripts are found in mesenchymal cells and osteoblasts. Also in basement membranes and in the sub endothelial extracellular matrix of blood vessels.

Fibroblast growth factor 10 (FGF10)	Chemoattractive effect to direct lung distal epithelial buds to their destination. Mitogenic activity, cell survival activities and involved in epithelial to mesenchymal transition.	Expressed dynamically in the mesenchyme adjacent to the distal buds from the earliest stages of lung development.
Receptors		
Kinase insert domain receptor (KDR)	Promotes proliferation, survival, migration and differentiation of endothelial cells, playing an essential role in the regulation of angiogenesis, vascular development, vascular permeability, and embryonic hematopoiesis.	Endothelial cells.
Activin receptor-like kinase 1 (ACVRL1)	Regulator of normal blood vessel development modulating TGFβ1 signalling in the regulation of angiogenesis. Required for the differentiation and recruitment of vascular smooth muscle cells.	Blood vessels.
Endothelin receptor A (ENDRA)	Mediates endothelin-SMC contraction and cell proliferation. Is associated with hypertension and pulmonary artery hypertension	Identified in SMC of many blood vessels with substantial effects in the systemic, renal, pulmonary, coronary and cerebral circulation
Endothelin receptor B (ENDRB)	Mediates the release of relaxing factors such as nitric oxide, prostacyclin and endothelium-derived hyperpolarizing factor, and could also play a role in ET-1 clearance	Identified in SMC of many blood vessels with substantial effects in the systemic, renal, pulmonary, coronary and cerebral circulation
Transforming growth factor, beta receptor I (TGFβR1)	Signals triggered through the TGFβ receptor complex prompt various responses by the cell, proliferation, differentiation, motility and apoptosis. Suppressor of the formation of tumors.	Embryonic tissues and stem cells.
Bone morphogenetic protein receptor, type IA (BMPRI A)	Role in cell differentiation, apoptosis, adipocyte development and extracellular matrix deposition by osteoblasts.	Initially expressed in cartilage condensations, but later decreased within cartilage elements.
Bone morphogenetic protein receptor type-1B (BMPRI B)	Role in regulating bone and cartilage formation and embryogenesis.	Expressed within all cartilages.
Bone morphogenetic protein receptor type II (BMPRII)	Stimulates osteogenesis, cell proliferation, differentiation and apoptosis. Mutations in that gene cause pulmonary arterial hypertension.	Expressed at low levels in the nasal septum and prenasal cartilage and at higher levels in other craniofacial cartilages.
Fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)	Stimulates organ development, cell proliferation, migration, maturation, formation of blood vessels, wound healing, and embryonic development.	Detected in astrocytoma, neuroblastoma and adrenal cortex cell lines. A splice variant is expressed in human lung fibroblasts and several other human cell lines.
Fibroblast growth factor receptor 2 (FGFR2)	Functions as potent mitogen in vitro and regulator of cell proliferation, differentiation, migration, apoptosis and regulation of embryonic development.	Expressed in hepatocellular carcinoma cells, granulosa and cumulus cells.
5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 2 ^a (HTR2A)	Role in intestinal smooth muscle contraction and in arterial vasoconstriction.	Highly expressed in platelets and many cell types of the cardiovascular system.
5-hydroxytryptamine receptor 2B (HTR2B)	Role in the adaptation of pulmonary arteries to chronic hypoxia and in pulmonary vasoconstriction.	Ubiquitous but specially detected in liver, kidney, heart, pulmonary artery and intestine.
Tyrosine-Protein Kinase Receptor (TEK)	Receptor for ANGPT1, ANGPT2 and ANGPT4 that regulates angiogenesis, endothelial cell survival, proliferation, migration, adhesion, cell spreading, reorganization of the actin cytoskeleton, but also maintenance of vascular quiescence. After birth, activates or inhibits angiogenesis, depending on the context. Inhibits angiogenesis and promotes vascular stability in quiescent vessels, where endothelial cells have tight contacts.	Predominantly expressed in endothelial cells and their progenitors, the angioblasts. Also detected in umbilical vein endothelial cells, placenta and lung, with a lower level in umbilical vein endothelial cells, brain and kidney.
Beta-type platelet-derived growth factor receptor	Role in blood vessel development by promoting proliferation, migration and recruitment of pericytes and smooth muscle cells to	Some cells display only one of the PDGFR isoforms while other cells express both isoforms, simultaneously

(PDGFRB)	endothelial cells.	or separately.
Apoptosis-related proteins		
Caspase-3 (CASP3)	Role in the activation cascade of caspases responsible for apoptosis execution. Moreover, plays a role in embryonic and hematopoietic stem cell differentiation.	Highly expressed in lung, spleen, heart, liver, kidney and in cells of the immune system.
BAX	Accelerates programmed cell death. Promotes activation of CASP3 and thereby apoptosis.	Expressed in a wide variety of tissues. Isoform Alpha is expressed in lung and other tissues. Isoform Sigma is expressed in lung and other tissues.
B-cell lymphoma 2 (BCL2)	Suppresses apoptosis in a variety of cell systems inhibiting caspase activity.	Expressed in a variety of tissues.
Metalloproteinases		
Matrix metalloproteinase 2 (MMP2)	Degradation of proteins in extracellular matrix, also involved in remodeling of the vasculature, angiogenesis, tissue repair, tumor invasion, inflammation and atherosclerotic plaque rupture. Role in mesenchymal cell differentiation with inflammatory phenotype, epithelial cell migration and conversion of vasodilator to vasoconstrictor.	Produced by normal skin fibroblasts.
Matrix metalloproteinase 7 (MMP7)	Breakdown of extracellular matrix, involved in vasoconstriction and cell growth, adipocyte differentiation and pro-inflammation.	Commonly expressed in epithelial cells and highly expressed in the luminal surface of dysplastic glands in human colorectal cancers.
Matrix metalloproteinase 9 (MMP9)	Role in local proteolysis of the extracellular matrix and in leukocyte migration. Required for the recruitment of endothelial stem cells, a critical component of angiogenesis and neovascularization. Greatly upregulated during human respiratory epithelial healing.	Produced by normal alveolar macrophages and granulocytes.
Matrix metalloproteinase 12 (MMP12)	Involved in tissue injury and remodeling.	Found in alveolar macrophages but not in peripheral blood monocytes.
TIMP metalloproteinase inhibitor 2 (TIMP2)	Metastasis suppressor and inhibitor of proliferation of endothelial cells and matrix metalloproteinases.	Connective tissue, epithelial cells
Metalloproteinase inhibitor 4 (TIMP4)	Inhibitor of matrix metalloproteinases, involved in regulation of platelet aggregation and endometrial tissue remodeling.	Abundant in heart and present at low levels in many other tissues.
Miscellanea		
Fibulin-5 (FBLN5)	Adhesion of endothelial cells and involved in vascular development and remodeling.	Developing arteries, injured vessels and atherosclerotic lesions, notably in intimal vascular smooth muscle cells and endothelial cells.
Secreted phosphoprotein 1 (SPP1)	Bone remodeling, inflammation and immune functions.	Bone and other tissues, activated immune cells, vascular smooth muscle cells, endothelial cells and other cell types.
Cell division control protein 42 (CDC42)	Cell migration, cytokinesis, phagocytosis, small GTPase involved in functions as morphogenesis, chemotaxis and cell fate determination.	Isoform 1 is expressed ubiquitously, whereas the isoform 2 is restricted to the brain.
Hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A (HNF1A)	Transcription factor that regulates the tissue specific expression of multiple genes, especially in pancreatic islet cells and in liver.	Highly expressed in liver cells.
Beta-catenin (CTNNB1)	Morphogenic change in epithelial cells, inducing them to abandon their tight adhesion and assume a more mobile and loosely associated mesenchymal phenotype.	Expressed in several hair follicles cell types, in colon and in cortical neurons.
Lymphoid enhancer-binding factor 1 (LEF1)	Mediates the proliferation, survival and differentiation of granulocyte progenitor cells. Involved in reducing cellular aggregation, increasing cell migration of pancreatic cancer cells and enhancing proliferation of pancreatic tumor cells.	Highly expressed in colon cancer biopsies and colon cancer cell lines, also expressed in pre-B and T cells.

Protein patched homolog 1 (PTCH1)	Role in formation of embryonic structures, tumor suppressor and receptor for sonic hedgehog.	In the adult, in lung and other tissues. In the embryo, found in all major target tissues of sonic hedgehog.
Housekeeping		
β -ACTIN	Highly conserved protein that is involved in various types of cell motility, structure and integrity.	Constitutively expressed at high levels in most tissues and cells.
GAPDH	Playing a role in glycolysis and nuclear functions.	Stably and constitutively expressed at high levels in most tissues and cells.

Resultats

Segon estudi:

Effect of targeted therapy on circulating progenitor cells in precapillary pulmonary hypertension.

Jéssica García-Lucio, Olga Tura-Ceide, Roberto Del Pozo, Isabel Blanco, Sandra Pizarro, Elisabet Ferrer, Marta Díez, Núria Coll-Bonfill N, Luccilla Piccari, Víctor Ivo Peinado, Joan Albert Barberà.

Article publicat a International Journal of Cardiology

Int J Cardiol. 2017 Feb 1;228:238-243.

Factor d'impacte: 6,189

Resultats

Objectiu general:

Estudiar si els pacients amb HAP o HPTEC de nou diagnòstic i, per tant encara no tractats, tenen nivells circulants de CPs alterats respecte els controls i estudiar el possible efecte de la teràpia específica de la HAP sobre els nivells circulants de les CPs.

Objectius específics:

1. Caracteritzar els nivells circulants basals de CPs en pacients amb HAP o HPTEC de nou diagnòstic, sense tractament previ.
2. Avaluar després d'un període de 6 a 12 mesos, l'efecte de la teràpia específica de la HAP sobre els nivells circulants de les CPs en pacients amb HAP o HPTEC.
3. Estudiar les relacions entre els nivells circulants de les CPs i els paràmetres clínics i/o hemodinàmics de la malaltia.

Resum de la metodologia:

Els nivells de CPs van ser determinats en 30 subjectes control, 33 malalts amb HAP i 11 malalts amb HPTEC, ambdós grups de malalts sense tractament previ. Després d'un període de 6 a 12 mesos de tractament, es van tornar a reavaluar els nivells de CPs de 18 malalts amb HAP i 9 malalts amb HPTEC.

Les CPs es van mesurar per citometria de flux a partir de les cèl·lules mononuclears sanguínees obtingudes a partir del gradient de Ficoll de la sang venosa perifèrica dels subjectes. Les CPs es van definir com cèl·lules CD45⁺CD34⁺ i CD45⁺CD34⁺CD133⁺.

Resultats principals:

Estudi transversal:

Els pacients amb HAP de nou diagnòstic sense tractament previ específic per la HAP presentaven nivells significativament més reduïts de CPs, definides com CD45⁺CD34⁺ i CD45⁺CD34⁺CD133⁺, respecte els controls.

Per contra, els pacients amb HPTEC de nou diagnòstic sense tractament previ no presentaven diferències significatives en els nivells circulants de cap de les dues combinacions de CPs, ni comparat amb els controls ni amb els malalts amb HAP.

Resultats

Estudi longitudinal:

Després d'un període de 6 a 12 mesos de tractament específic per la HAP, els nivells de BNP tendien a disminuir tant en els malalts amb HAP com en els malalts amb HPTEC. Paral·lelament es va observar una reducció significativa de la resistència vascular pulmonar i un augment de l'índex cardíac.

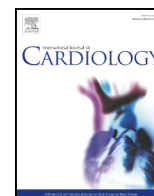
Amb el tractament, els malalts amb HAP presentaven un increment significatiu dels nivells circulants d'ambdues combinacions de CPs comparat amb els corresponents nivells basals. Aquest increment dels nivells circulants de CPs després del període de tractament va ocasionar que els malalts amb HAP assolissin nivells circulants de CPs similars als dels controls.

En canvi, el tractament no va provocar cap alteració significativa en els nivells circulants de CPs en els malalts amb HPTEC. Per tant, els nivells d'ambdues combinacions de CPs en els malalts amb HPTEC no presentaven diferències significatives amb els nivells de CPs ni dels controls ni dels malalts amb HAP, ni abans ni després del tractament.

Relació dels nivells circulants de cèl·lules progenitores amb l'estat clínic

Els malalts amb HAP o HPTEC sense tractament amb una millor prova de distància recorreguda durant 6 minuts, presentaven nivells més elevats de CPs comparat amb els que caminaven per sota la mitjana. És a dir, contra més metres caminats, més CPs presenten.

Per contra, no es va trobar cap correlació entre els canvis en els nivells circulants de CPs i els canvis en els paràmetres clínics i hemodinàmics de la HP, ni abans ni després del tractament.



Effect of targeted therapy on circulating progenitor cells in precapillary pulmonary hypertension[☆]



Jéssica García-Lucio, BsC^a, Olga Tura-Ceide, PhD^{a,b,*}, Roberto del Pozo, MD^a, Isabel Blanco, MD^{a,b}, Sandra Pizarro, MD^a, Elisabet Ferrer, PhD^a, Marta Díez, PhD^a, Núria Coll-Bonfill, BsC^a, Lucilla Piccari, MD^a, Víctor I. Peinado, PhD^{a,b}, Joan Albert Barberà, MD^{a,b}

^a Department of Pulmonary Medicine, Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona, Barcelona, Spain

^b Biomedical Research Networking Center on Respiratory Diseases (CIBERES), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 September 2016

Accepted 6 November 2016

Available online 09 November 2016

Keywords:

Circulating progenitor cells

Treatment-naïve patients

PAH-targeted therapy

ABSTRACT

Background: Endothelial dysfunction is key in the development of pulmonary hypertension (PH) and is associated with reduced number of circulating progenitor cells. Studies to date evaluating levels of circulating progenitor cells in PH have provided conflicting results. Current treatment of pulmonary arterial hypertension (PAH) and medical treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH) targets endothelium dependent signalling pathways. The effect of PAH-targeted therapy on circulating progenitor cells has not been clearly established.

Objectives: To investigate whether levels of circulating progenitor cells in treatment-naïve patients with PAH or CTEPH differ from healthy subjects and to assess the effect of PAH-targeted therapy on the circulating levels of these progenitors.

Methods: Thirty controls, 33 PAH and 11 CTEPH treatment-naïve patients were studied. Eighteen patients with PAH and 9 with CTEPH were re-evaluated 6–12 months after starting PAH-targeted therapy. Levels of progenitors were measured by flow cytometry as CD45⁺CD34⁺ and CD45⁺CD34⁺CD133⁺ cells.

Results: Compared with controls, the number of circulating progenitor cells was reduced in PAH but not in CTEPH. After 6–12 months of treatment, levels of circulating progenitors increased in PAH and remained unchanged in CTEPH. Patients with lower exercise tolerance presented lower levels of circulating progenitors. No other relation was found between levels of progenitors and clinical or hemodynamic parameters.

Conclusions: Patients with PAH, but not those with CTEPH, present reduced levels of circulating progenitor cells. PAH-targeted therapy increases levels of progenitors in PAH but not in CTEPH, suggesting different involvement of progenitor cells in the pathobiology of these pulmonary hypertensive disorders.

© 2016 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Background

Despite advances in our understanding of the pathophysiology and pathogenesis of pulmonary hypertension (PH), patients with PH continue to demonstrate high morbidity and mortality [1]. Endothelial dysfunction plays a relevant role in the development of PH and is a major target of current therapy [2]. However, the present evaluation of PH severity and response to treatment does not focus on endothelial function [1,2], probably because of the lack of adequate tools for its assessment.

Circulating progenitor cells are immature precursor cells derived from the bone marrow that are mobilized into the circulation in response to vascular injury [3]. It is considered that numbers of circulating progenitor cells reflect the ability of the organism to repair the endothelium [3–5], although it is possible that they could participate in the progression of vascular remodeling [6–9]. Therefore, circulating progenitor cells could act as a potential biological marker of vascular dysfunction. Their presence in peripheral circulation offers the opportunity to monitor their number as a marker of disease state, and importantly, as a marker of response to therapy [10]. Reduced numbers of circulating progenitor cells have been established as an independent prognostic risk factor associated with endothelial dysfunction and increased cardiovascular risk [11–17].

In PH, studies to date have provided conflicting results. While some investigators have observed increased numbers of circulating progenitor cells [18–22], others have found a reduced number [23–25] or no

[☆] All authors take responsibility for all aspects of the reliability and freedom from bias of the data presented and their discussed interpretation.

* Corresponding author at: Department of Pulmonary Medicine, Hospital Clínic, Villarroel, 170, Barcelona 08036, Spain.

E-mail address: tura@clinic.ub.es (O. Tura-Ceide).

differences [26], when compared with controls. Differences in patient selection, underlying treatment, markers used to detect progenitor cells, type of PH, and disease severity may account for the differences observed between studies [27–30].

In the present study, we hypothesized that the number of circulating progenitor cells is altered in treatment-naïve patients with precapillary PH, either pulmonary arterial hypertension (PAH) or chronic thromboembolic pulmonary hypertension (CTEPH), compared with healthy control subjects. We also hypothesized that improvement in endothelium-derived mediator imbalance with PAH-targeted therapy would be associated with changes in the number of circulating progenitor cells. Accordingly, the present study was addressed to evaluate the number of circulating progenitor cells in treatment-naïve patients with PAH or CTEPH, as compared with healthy control subjects, and assess the effects of targeted-PAH therapy on circulating progenitor cell numbers.

2. Methods

2.1. Subjects

In the cross-sectional study, thirty-three treatment-naïve patients with PAH, 11 with CTEPH not candidates to pulmonary endarterectomy, and 30 healthy control subjects were evaluated. Characteristics of subjects are shown in Tables 1 and 2. The study was approved by the ethics committee on clinical research of Hospital Clinic (RE2008/4467) and all subjects gave written informed consent. The study protocol conforms to the ethical guidelines of the 1975 Declaration of Helsinki. Importantly, all patients were included in the study before starting PAH-targeted therapy and 27 (18 PAH, 9 CTEPH) of them were reevaluated after a follow-up period of 6–12 months of initiating treatment. PAH treatment was established by the attending physicians according to international guidelines [2] and it was not influenced by participation in the study. Subjects with secondary forms of PH, left heart disease or respiratory disorders were excluded. Patients were treated with calcium channel blockers, phosphodiesterase-5 inhibitors, endothelin receptor antagonists or prostanoids (Table 3).

In control subjects, the absence of lung diseases was confirmed by clinical evaluation and lung function tests. Heart diseases were also ruled out by clinical history and electrocardiogram.

Table 1
Clinical and hemodynamic characteristics.

	Control n = 30	PAH n = 33	CTEPH n = 11
Age, years	51 ± 14	50 ± 15	59 ± 14
Gender: Women, n (%)	19 (63)	23 (70)	7 (64)
Body mass index, (kg/m ²)	25 ± 4	26 ± 6	27 ± 6
Functional class-NYHA I/II/III/IV			
n	30/0/0/0	0/14/19/0	0/2/9/0
(%)	100/0/0/0	0/42/58/0	0/18/82/0
BNP, pg/mL	19 ± 16	220 ± 322*	383 ± 365*
6MWD, m	ND	404 ± 125	341 ± 174
Pulmonary function			
FVC, % predicted	98 ± 10	86 ± 16*	86 ± 21*
FEV ₁ , % predicted	103 ± 9	81 ± 19*	83 ± 20*
FEV ₁ /FVC ratio	1.1 ± 0.1	0.95 ± 0.1*	0.96 ± 0.1
TLC, % predicted	100 ± 14	94 ± 15	98 ± 23
DLCO, % predicted	88 ± 12	59 ± 22*	63 ± 24*
PaO ₂ , mm Hg	93 ± 11	72 ± 14*	60 ± 14*#
Pulmonary hemodynamics			
mPAP, mm Hg	ND	41 ± 10	51 ± 9#
PAWP, mm Hg	ND	10.3 ± 10.3	9.2 ± 3.8
RAP, mm Hg	ND	8.4 ± 5.5	9.9 ± 5.3
Cardiac index, L/min/m ²	ND	2.4 ± 0.7	1.6 ± 0.3#
PVR, dyn·seg·cm ⁻⁵	ND	754 ± 450	1252 ± 535#

Data are shown as mean ± SD.

PAH: pulmonary arterial hypertension; CTEPH: chronic thromboembolic pulmonary hypertension; NYHA: New York Heart Association; BNP: brain natriuretic peptide; 6MWD: 6 min walk distance; FVC: forced vital capacity; FEV₁: forced expiratory volume in 1 s; TLC: total lung capacity; DLCO: diffusing capacity for carbon monoxide; PaO₂: arterial partial oxygen pressure; mPAP: mean pulmonary arterial pressure; PAWP: pulmonary artery wedge pressure; RAP: right atrial pressure; PVR: pulmonary vascular resistance; ND: not determined.

p < 0.05 compared with patients with PAH.

* p < 0.05 compared with controls.

Table 2
Distribution of patients with pulmonary arterial hypertension (PAH) by etiology.

PAH subgroup	n (%)
Idiopathic	11 (33)
Hereditary	3 (9)
Associated with connective tissue disease	11 (33)
HIV infection	4 (13)
Congenital heart disease	2 (6)
Portal hypertension	1 (3)
Schistosomiasis	1 (3)

HIV: human immunodeficiency virus.

2.2. Measurements

At baseline, subjects underwent standard evaluation by means of medical history, clinical examination, electrocardiogram and lung function tests. Pulmonary hypertension was diagnosed by right heart catheterization and defined by a mean pulmonary arterial pressure ≥25 mm Hg, pulmonary artery wedge pressure ≤15 mm Hg and pulmonary vascular resistance ≥250 dyn·s·cm⁻⁵. Patients with PH were also evaluated by means of functional class, six minute walk distance (6MWD) and brain natriuretic peptide (BNP). These measurements were assessed at baseline and at follow-up. In 14 patients (7 PAH, 7 CTEPH) follow-up measurements also included right heart catheterization.

2.3. Evaluation of circulating progenitor cells

Venous blood samples were obtained after fasting overnight by peripheral venipuncture into tubes with EDTA. Methodology for the assessment of circulating progenitor cells has been previously described [31]. Briefly, circulating progenitor cells were isolated from peripheral blood by Ficoll density gradient separation, washed once with phosphate buffered saline supplemented with 2% of fetal calf serum and resuspended at 2 × 10⁶ cells (control tube) and at 4 × 10⁶ cells (sample tube). Cells were stained and analyzed by flow cytometry for phenotypic expression of surface markers using pre-conjugated anti-human monoclonal antibodies anti-CD45-FITC (pan-leukocyte marker), anti-CD34-PECy7 (mature and progenitor endothelial marker) and anti-CD133-PE (sub-population of hematopoietic stem cell marker) [30]. The fluorescence minus one technique was employed to provide negative controls [32]. After 45 min of incubation, cells were washed, resuspended into 500 µL of phosphate buffered saline supplemented with 2% of fetal calf serum and proceeded to flow cytometry analysis. A total of 75,000 events were run through the flow cytometer and analyzed by Cytomation Summit software. Circulating progenitor cells were defined as CD45⁺CD34⁺ and CD45⁺CD34⁺CD133⁺ cells and were corrected by the total number of lymphomonocytes.

2.4. Statistical analysis

Data are expressed as mean ± SD for normally distributed data or as median and interquartile range for skewed distributions. Group comparisons were performed using *t*-student test or one way ANOVA and *post-hoc* pairwise comparisons using the Student Newman-Keuls test for normally distributed variables, or Mann–Whitney Rank Sum Test and Kruskal–Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks test for non-normally distributed variables. Before and after comparisons were assessed by Paired *t*-test for normally distributed variables and Signed Test for non-normally distributed variables. A *p* value <0.05 was considered statistically significant.

3. Results

3.1. Study population

PAH, CTEPH and control groups were matched for age, gender and body mass index (Table 1). Sixteen of the patients with PH (36%) were in functional class II and 28 (64%) in functional class III. Patients with PAH and CTEPH had lower forced vital capacity, forced expiratory volume in the first second and diffusing capacity for carbon monoxide;

Table 3
Drugs used in patients evaluated before and after starting PAH-targeted therapy.

Treatment, n (%)	PAH (n = 18)	CTEPH (n = 9)
PDE-5 inhibitors	8 (44)	5 (56)
ERAs	5 (28)	3 (33)
Prostanoids	2 (11)	0 (0)
Combination therapy	2 (11)	1 (11)
Calcium channel blockers	1 (6)	0 (0)

PAH: pulmonary arterial hypertension; CTEPH: chronic thromboembolic pulmonary hypertension; PDE-5: phosphodiesterase type 5 and ERA: endothelin receptor antagonist.

and higher levels of BNP than control subjects (Table 1). Other baseline characteristics are shown in Table 1. Distribution of patients with PAH by etiology is shown in Table 2.

3.2. Baseline measurements

Circulating progenitor cells, defined as CD45⁺CD34⁺ cells, were significantly reduced in treatment-naïve patients with PAH as compared with healthy control subjects (0.08% (0.07–0.12) vs 0.13% (0.08–0.17), respectively; $p < 0.05$) (Fig. 1A). Levels of CD45⁺CD34⁺ in patients with CTEPH did not differ neither from control subjects nor from PAH patients (0.10% (0.07–0.14)) (Fig. 1A). Similarly, levels of CD45⁺CD34⁺CD133⁺ circulating progenitor cells were significantly reduced in patients with PAH compared with control subjects (0.06% (0.03–0.07) vs 0.08% (0.05–0.12), respectively; $p < 0.05$). No significant differences were found in the levels of these progenitor cells between patients with CTEPH and healthy subjects or patients with PAH (0.06% (0.03–0.09)) (Fig. 1B).

3.3. Follow-up measurements

Twenty-seven patients (18 PAH, 9 CTEPH) underwent a second assessment 6–12 months after initiating treatment. At follow-up, BNP decreased, although not significantly, in both groups. Similarly, patients with PAH tended to cover longer distance in the six-minute walk test than at baseline (Table 4). Hemodynamic measurements were repeated in 14 patients, showing a significant increase in cardiac index and a reduction of pulmonary vascular resistance (Table 4).

In patients with PAH, the levels of CD45⁺CD34⁺ and CD45⁺CD34⁺CD133⁺ cells increased significantly after starting treatment, as compared with baseline levels (13% and 41% of increase, respectively) (Fig. 2A and B). In contrast, in patients with CTEPH, no significant differences were observed in the levels of progenitor cells after the treatment period (Fig. 2C and D). Thus, after receiving PAH-targeted therapy, patients with PAH reached levels of CD45⁺CD34⁺ and CD45⁺CD34⁺CD133⁺ circulating progenitor cells similar to healthy control subjects (0.11% (0.08–0.16) vs 0.13% (0.08–0.17), respectively) (Fig. 3A) and 0.07% (0.05–0.12) vs 0.08% (0.05–0.11) (Fig. 3B), respectively). Levels of both circulating progenitor cells in patients with CTEPH did not differ from healthy controls neither before treatment nor after treatment (Fig. 3A and B).

3.4. Relationship between circulating progenitor cells and disease severity

Treatment-naïve patients with PAH and with CTEPH who walked longer in the six-minute walk test showed greater numbers of CD45⁺CD34⁺CD133⁺ progenitor cells compared with those who walked below the median value (Fig. 4).

Other changes in clinical and hemodynamic assessments, before and after treatment, did not correlate with changes in circulating progenitor cell number.

4. Discussion

Results of the present study showed that treatment-naïve patients with PAH have reduced levels of circulating progenitor cells (CD45⁺CD34⁺ and CD45⁺CD34⁺CD133⁺ cells) compared with healthy control subjects, whereas levels of circulating progenitor cells in CTEPH patients did not differ from controls. We further analyzed the effect of PAH-targeted therapy on the levels of circulating progenitor cells in both PAH and CTEPH patients. Our results indicate that, after 6–12 months receiving PAH-targeted therapy, the number of progenitor cells in PAH increased, reaching values similar to healthy controls. In CTEPH the number of progenitor cells remained unaltered.

Previous studies investigating the numbers of progenitor cells in PAH, showed conflicting results [18–26]. Whereas some studies have shown reduced numbers of circulating progenitor cells in PAH compared with healthy controls [23–25], others have shown no differences [26] or even increased numbers [18–22]. The origin of these divergences is unclear, but could be explained by variations in PAH-treatment received, patient selection, sample size, and in the methodology and markers used to identify and quantify progenitor cells [27–30]. One of the strengths of this study is that we excluded subjects that were previously treated with PAH-targeted therapy to identify whether PAH or CTEPH itself were associated with variations in the numbers of circulating progenitor cells, eliminating possible confounding treatment effects on circulating progenitor cell levels.

It has been shown that low progenitor cell levels correlate with worse prognosis in some cardiovascular disorders such as coronary artery disease and diabetes [11–17]. In our series, treatment-naïve patients with PAH showed reduced levels of circulating progenitor cells when compared with healthy control subjects, potentially contributing to endothelial dysfunction and disease progression. Our findings are in

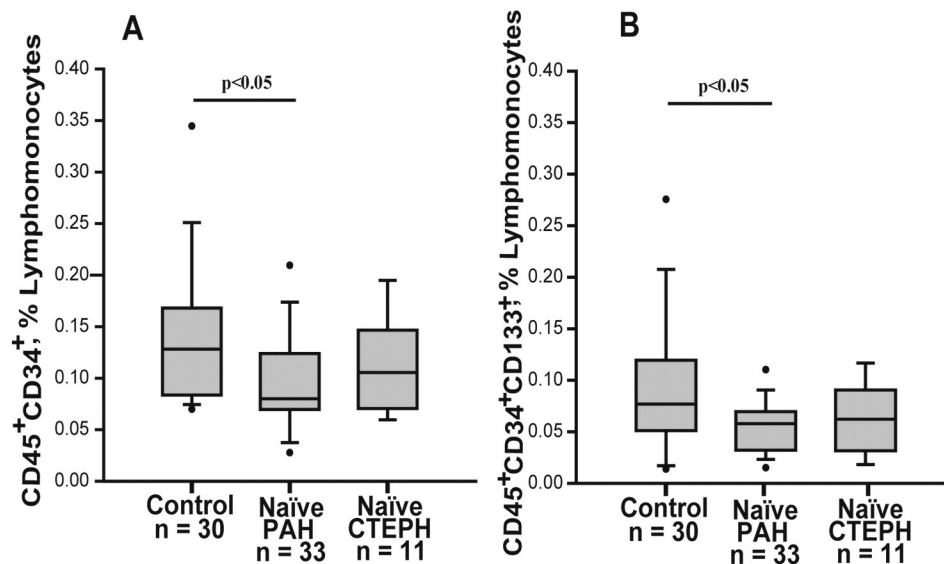


Fig. 1. Number of circulating progenitor cells in control subjects, treatment-naïve patients with (PAH) and (CTEPH). Number of (A) CD45⁺CD34⁺ and (B) CD45⁺CD34⁺CD133⁺ labelled cells expressed as percent of lymphomonocytes. The box represents the interquartile range and the solid line indicates the median. The whiskers extend from the box to the 90th and 10th percentiles. Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks.

Table 4
Measurements at baseline and at follow-up.

	PAH (n = 18)		CTEPH (n = 9)	
	Baseline	Follow-up	Baseline	Follow-up
BNP, pg/mL	232 ± 363	104 ± 113	354 ± 313	304 ± 219
6MWD, m	383 ± 142	422 ± 156	374 ± 149	378 ± 145
Hemodynamics (n = 14) ^a				
mPAP, mm Hg	50 ± 5.5	45 ± 10	56 ± 6.3	51 ± 8.02*
PAWP, mm Hg	6.6 ± 2.4	5.7 ± 3.5	7.9 ± 3.9	9.8 ± 4.1
mRAP, mm Hg	7.9 ± 4.5	5.4 ± 4.1	10.6 ± 5.9	10.9 ± 3.6
Cardiac index, L/min/m ²	1.76 ± 0.55	2.02 ± 0.55*	1.62 ± 0.31	2.02 ± 0.39*
PVR, dyn·seg·cm ⁻⁵	1237 ± 458	940 ± 230*	1455 ± 498	1012 ± 391*

Data are shown as mean ± SD.
PAH: pulmonary arterial hypertension; CTEPH: chronic thromboembolic pulmonary hypertension; BNP: brain natriuretic peptide; 6MWD: 6 min walk distance; mPAP: mean pulmonary arterial pressure; PAWP: pulmonary artery wedge pressure; mRAP: mean right atrial pressure; PVR: pulmonary vascular resistance.
* p < 0.05 compared to baseline.
^a PAH: n = 7; CTEPH: n = 7.

agreement with previous reports showing reduced levels of circulating progenitor cells in patients with PAH [23–25]. The mechanisms by which circulating progenitor cells might be reduced in PAH are not apparent. Low levels of circulating progenitor cells could be a consequence of depletion of progenitor cells derived from the bone marrow [15,33], or result from an enhanced homing and recruitment of these cells to damaged pulmonary vessels [19,21,34,35]. In this line, Toshner et al.

[19] demonstrated an up-regulation of progenitor cells markers in plexiform lesions of remodeled arteries from patients with PAH [19]. Other studies have described mobilization of bone marrow-derived progenitor cells and recruitment of endogenous cells in the lung and pulmonary vasculature in experimental hypoxia-induced PH [22,34]. Our group has previously described the presence of progenitor cells in pulmonary arteries of patients with chronic obstructive pulmonary disease as a response of tissue damage [6]. Therefore, circulating progenitor cells in PAH could be released from the bone marrow upon an endothelial damage and could be mobilized to the lung vasculature acquiring endothelial or smooth muscle like cell phenotypes. This could explain the depletion of circulating progenitors in peripheral blood.

The levels of progenitor cells in treatment-naïve patients with CTEPH did not differ from either control healthy subjects or patients with PAH. Although PAH and CTEPH may share potential common mechanisms, including endothelial cell dysfunction and distal pulmonary artery remodeling, they entail two different determinants of increased PAP and that does not imply that the two disorders are associated with the same degree of pulmonary endothelial dysfunction. Interestingly, our results indicate that in CTEPH, circulating progenitor cells might not have the same repair/mobilization capacity reflected by the levels of circulating progenitor cells in circulation. It is also important to note that in our study, patients with CTEPH had significant worse hemodynamic parameters compared to patients with PAH. Accordingly, high pulmonary pressure is not the single triggering factor responsible to increase progenitor cell tissue recruitment and reduction of circulating progenitor cell numbers. A recent study published by Smatja et al. [26] suggested that compared to controls, circulating endothelial

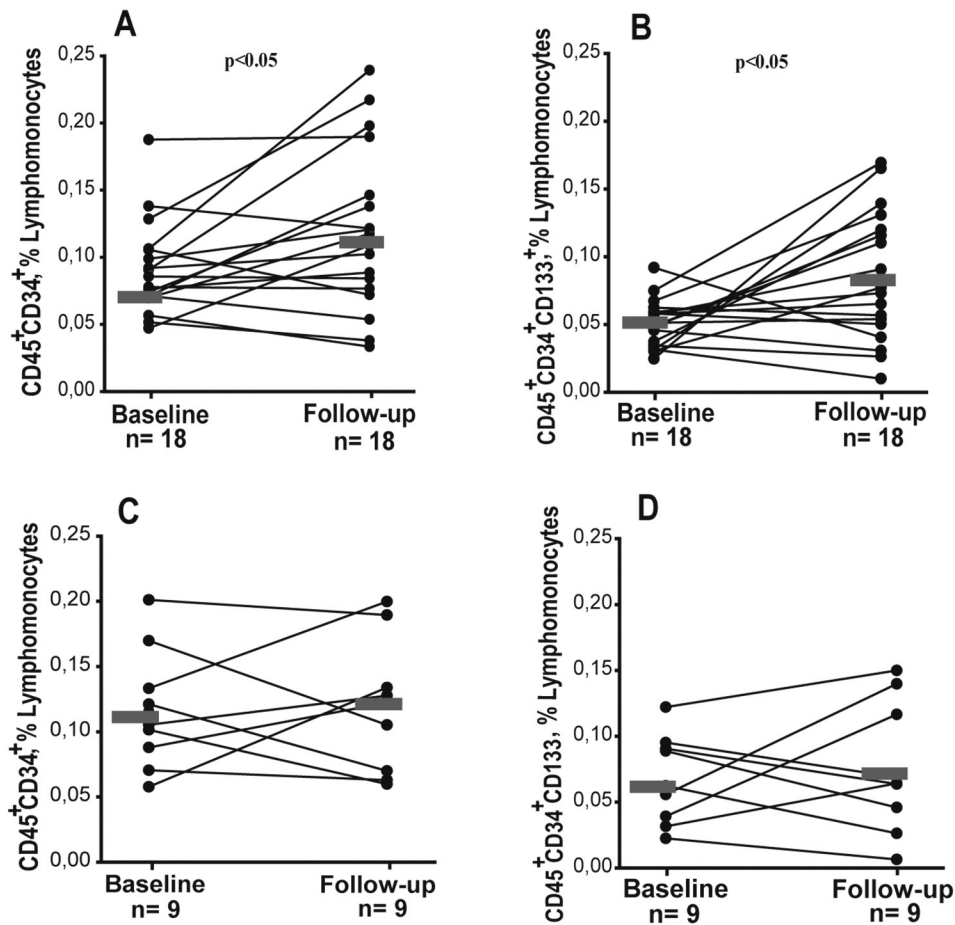


Fig. 2. Number of circulating progenitor cells in patients with PAH and CTEPH at baseline and follow-up. Number of (A) CD45⁺ CD34⁺ and (B) CD45⁺ CD34⁺ CD133⁺ labelled cells in patients with PAH, respectively. Number of (C) CD45⁺ CD34⁺ and (D) CD45⁺ CD34⁺ CD133⁺ labelled cells in patients with CTEPH, respectively. Results were expressed as percent of lymphomonocytes. Grey line indicates the mean of each group. Paired t-test.

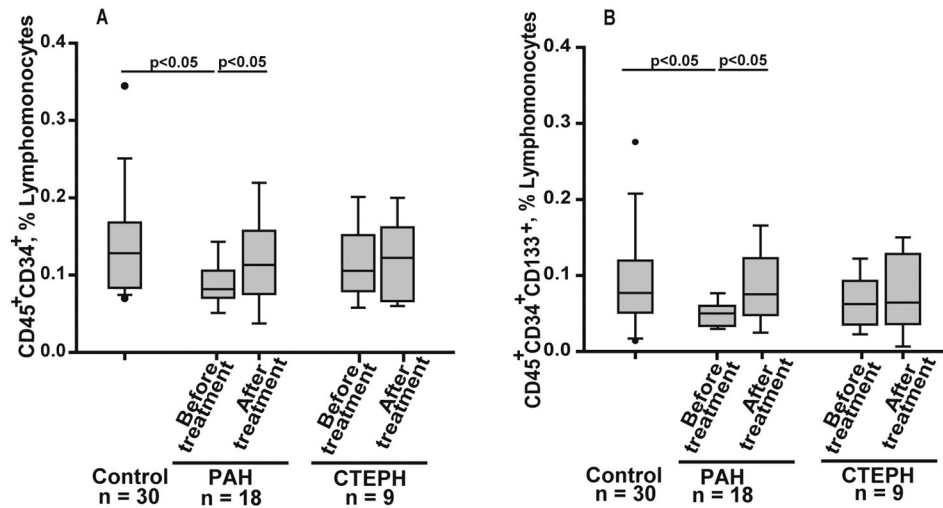


Fig. 3. Number of circulating progenitor cells in control subjects, before and after treatment in patients with PAH and CTEPH. Number of (A) CD45⁺CD34⁺ and (B) CD45⁺CD34⁺CD133⁺ labelled cells, respectively, expressed as percent of lymphomonocytes. The box represents the interquartile range and the solid line indicates the median. The whiskers extend from the box to the 90th and 10th percentiles. Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks and Paired *t*-test.

cell numbers were significantly increased in PAH but not in CTEPH concluding that PAH but not CTEPH is associated with markers of vascular injury [26]. It is important to highlight that, compared to subjects of the study by Smatja et al. [26] in which patients were under treatment, in our series, patients were treatment-naïve.

Treatment with specific PAH-targeted therapy increased the levels of circulating progenitor cells in patients with PAH. This result is in accordance with the findings by Diller et al. [24] that patients with PAH treated with the phosphodiesterase-5 inhibitor sildenafil exhibited a selective and dose-dependent increase in circulating progenitor cells. This increase was not observed when patients were treated with bosentan or prostacyclin analogues [24]. Foresta et al. [36] also found that sildenafil increased circulating progenitor cell number and the ability to generate colonies in vitro [36]. One could then speculate that restoration of endothelial mediator imbalance is associated with less progenitor cell mobilization/recruitment at the sites of injury, and hence increase the

number of circulating progenitor cells. Although, further studies are required to understand the therapeutic implications of PAH-targeted therapy in the number and function of circulating progenitor cells, measurement of circulating biomarkers could be a potential non-invasive tool to assess treatment effect on vascular injury.

In patients with CTEPH no changes were observed in levels of circulating progenitor cells after receiving PAH-targeted therapy. This study was conducted before riociguat was approved for the treatment of CTEPH [37] and therefore the effects of riociguat on circulating levels of progenitor cells could not be investigated. Nevertheless, the lack of differences on the number of circulating progenitor cells before starting treatment as compared with controls, and the lack of changes with treatment suggest that the role of bone marrow-derived progenitor cells in CTEPH is different to PAH [26,38].

Patients with precapillary PH with lower exercise tolerance, as assessed by the 6MWD, presented lower levels of circulating CD45⁺CD34⁺CD133⁺ cells. The same relationship between progenitor cells and 6MWD was observed by Junhui et al. [25], while Diller et al. [24] did not find any correlation between progenitor cells and 6MWD in idiopathic PAH. No other relationship between levels of circulating progenitor cells and hemodynamic or clinical parameters could be established. Such lack of relationship between circulating progenitor cells and clinical or hemodynamic parameters could be explained because the latter are more likely related to changes in cardiac function, whereas progenitor cells could be associated to changes in microcirculation.

5. Study limitations

This study has limitations. Firstly, the group of patients diagnosed with CTEPH has a small size. Secondly, some patients were lost for follow-up on the time frame of 6–12 months and only 27 out of the 46 patients with PH were reevaluated after starting treatment. Finally, the reduced sample size precluded a detailed analysis of potential differences between drugs in the effects on circulating progenitors.

6. Conclusions

In conclusion, treatment-naïve patients with PAH, but not CTEPH patients, show reduced levels of circulating progenitor cells, appearing to be disease specific. Treatment with PAH-targeted therapy increases the number of circulating progenitor cells in PAH but not in CTEPH. This increase equates levels of circulating progenitor cells to the levels of healthy control subjects, reflecting increased repair potential of

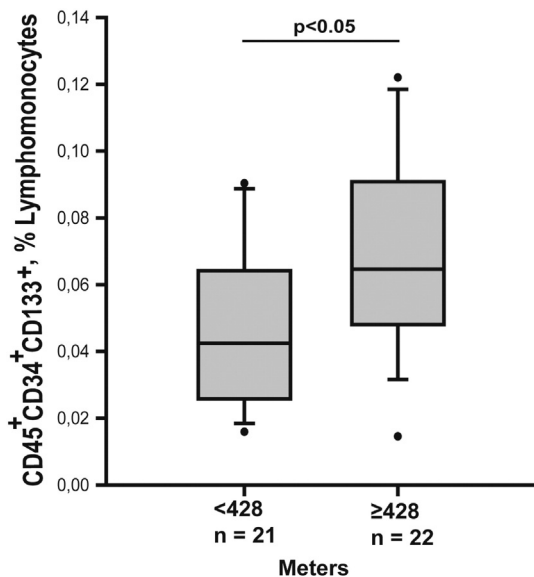


Fig. 4. Relationship between the number of circulating CD45⁺CD34⁺CD133⁺ labelled cells and 6MWD. Patients with PAH and CTEPH grouped according to 6MWD above or below the corresponding median value. The box represents the interquartile range and the solid line indicates the median. The whiskers extend from the box to the 90th and 10th percentiles. Mann-Whitney Rank Sum Test.

vascular damage. These results highlight that although PAH and nonsurgical CTEPH share similarities in terms of hemodynamic impairment, involvement of progenitor cells in the pathobiology of increased pulmonary vascular resistance might be different.

Author contributions

Conceived and designed the experiments: JGL, RDP, SP, EF, MD, VIP, JAB.

Performed the experiments: JGL, RDP, SP, MD, NCB.

Analyzed the data: JGL, OTC, IB, EF, LP, JAB.

Contributed reagents/materials/analysis tools: JGL, SP, MD, NCB, LP, JAB.

Contributed to the writing of the manuscript: JGL, OTC, IB, VIP, JAB.

All authors read and approved the final manuscript.

Funding information

This study was supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PI12/00510), SEPAR (885/2008), SOCAP (SOCAP-TL-2008) and an unrestricted research grant from GlaxoSmithKline (GSK) (CP040511). JGL was the recipient of a predoctoral research fellowship (PFIS) from the ISCIII; SP was the recipient of a predoctoral research fellowship from Hospital Clínic; and OTC was the recipient of Marie Curie Post-Doctoral Fellowship Award BIOTRACK: IDIBAPS.

Conflict of interest statements

JAB received personal fees (advisory board, consulting and speaker) from Actelion, Bayer and GlaxoSmithKline and personal fees (speaker) from Pfizer. He also received grants through institution from Actelion, Bayer, GlaxoSmithKline and Pfizer. All of this outside the submitted work.

The rest of authors have no competing interests to declare.

All authors have approved the final article.

Acknowledgments

We thank Dr. Jordi Petriz and Dr. Pedro Marin for their expert technical assistance with flow cytometry.

References

- [1] M. Humbert, N. Galie, The Ten Commandments for 2015 European Society of Cardiology-European Respiratory Society Guidelines on Pulmonary Hypertension, *Eur. Heart J.* 37 (1) (Jan. 1 2016) 5.
- [2] N. Galie, M.M. Hoeper, M. Humbert, et al., Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: the Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS), endorsed by the International Society of Heart and Lung Transplantation (ISHLT), *Eur. Heart J.* 30 (20) (Oct. 2009) 2493–2537.
- [3] D. Burger, R.M. Touyz, Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells, *J. Am. Soc. Hypertens.* 6 (2) (Mar. 2012) 85–99.
- [4] C.C. De, C. Rossini, A. Tincani, et al., Effect of antihypertensive treatment with lercanidipine on endothelial progenitor cells and inflammation in patients with mild to moderate essential hypertension, *Blood Press.* 19 (May 2016) 1–7.
- [5] A.J. Melchiorri, L.G. Bracaglia, L. Kimerer, N. Hibino, J.P. Fisher, In vitro endothelialization of biodegradable vascular grafts via endothelial progenitor cell seeding and maturation in a tubular perfusion system bioreactor, *Tissue Eng. Part C Methods* 20 (May 2016).
- [6] V.I. Peinado, J. Ramirez, J. Roca, R. Rodriguez-Roisin, J.A. Barbera, Identification of vascular progenitor cells in pulmonary arteries of patients with chronic obstructive pulmonary disease, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 34 (3) (Mar. 2006) 257–263.
- [7] K. Hayashida, F. Fujita, Y. Miyake, et al., Bone marrow-derived cells contribute to pulmonary vascular remodeling in hypoxia-induced pulmonary hypertension, *Chest* 127 (5) (May 2005) 1793–1798.
- [8] F. Dierick, T. Hery, B. Hoareau-Coudert, et al., Resident PW1+ progenitor cells participate in vascular remodeling during pulmonary arterial hypertension, *Circ. Res.* 118 (5) (Mar. 4 2016) 822–833.
- [9] L. Yan, X. Chen, M. Talati, et al., Bone marrow-derived cells contribute to the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 193 (8) (Apr. 15 2016) 898–909.
- [10] V. Foris, G. Kovacs, M. Tscherner, A. Olschewski, H. Olschewski, Biomarkers in pulmonary hypertension: what do we know? *Chest* 144 (1) (Jul. 2013) 274–283.
- [11] R. Minhajat, D. Nilasari, S. Bakri, The role of endothelial progenitor cell in cardiovascular disease risk factors, *Acta Med. Indones.* 47 (4) (Oct. 2015) 340–347.
- [12] P.S. Lee, K.K. Poh, Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases, *World J. Stem Cells* 6 (3) (Jul. 26 2014) 355–366.
- [13] M. Koutroumpi, S. Dimopoulos, K. Psarra, T. Kyprianou, S. Nanas, Circulating endothelial and progenitor cells: evidence from acute and long-term exercise effects, *World J. Cardiol.* 4 (12) (Dec. 26 2012) 312–326.
- [14] C. Schmidt-Lucke, L. Rossig, S. Fichtlscherer, et al., Reduced number of circulating endothelial progenitor cells predicts future cardiovascular events: proof of concept for the clinical importance of endogenous vascular repair, *Circulation* 111 (22) (Jun. 7 2005) 2981–2987.
- [15] J.M. Hill, G. Zalos, J.P. Halcox, et al., Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk, *N. Engl. J. Med.* 348 (7) (Feb. 13 2003) 593–600.
- [16] N. Werner, S. Kosiol, T. Schiegl, et al., Circulating endothelial progenitor cells and cardiovascular outcomes, *N. Engl. J. Med.* 353 (10) (Sep. 8 2005) 999–1007.
- [17] C. Briguori, U. Testa, R. Riccioni, et al., Correlations between progression of coronary artery disease and circulating endothelial progenitor cells, *FASEB J.* 24 (6) (Jun. 2010) 1981–1988.
- [18] V. Foris, G. Kovacs, L.M. Marsh, et al., CD133+ cells in pulmonary arterial hypertension, *Eur. Respir. J.* 21 (Apr. 2016).
- [19] M. Toshner, R. Voswinkel, M. Southwood, et al., Evidence of dysfunction of endothelial progenitors in pulmonary arterial hypertension, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 180 (8) (Oct. 15 2009) 780–787.
- [20] K. Asosingh, M.A. Aldred, A. Vasanji, et al., Circulating angiogenic precursors in idiopathic pulmonary arterial hypertension, *Am. J. Pathol.* 172 (3) (Mar. 2008) 615–627.
- [21] S. Farha, K. Asosingh, W. Xu, et al., Hypoxia-inducible factors in human pulmonary arterial hypertension: a link to the intrinsic myeloid abnormalities, *Blood* 117 (13) (Mar. 31 2011) 3485–3493.
- [22] N.J. Davie, J.T. Crossno Jr., M.G. Frid, et al., Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 286 (4) (Apr. 2004) L668–L678.
- [23] G.P. Fadini, M. Schiavon, F. Rea, A. Avogaro, C. Agostini, Depletion of endothelial progenitor cells may link pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 176 (7) (Oct. 1 2007) 724–725.
- [24] G.P. Diller, E.S. van, D.O. Okonko, et al., Circulating endothelial progenitor cells in patients with Eisenmenger syndrome and idiopathic pulmonary arterial hypertension, *Circulation* 117 (23) (Jun. 10 2008) 3020–3030.
- [25] Z. Junhui, W. Xingxiang, F. Guosheng, S. Yunpeng, Z. Furong, C. Junzhu, Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension, *Respir. Med.* 102 (7) (Jul. 2008) 1073–1079.
- [26] D.M. Smadja, L. Mauge, O. Sanchez, et al., Distinct patterns of circulating endothelial cells in pulmonary hypertension, *Eur. Respir. J.* 36 (6) (Dec. 2010) 1284–1293.
- [27] R.M. Tuder, S.L. Archer, P. Dorfmueller, et al., Relevant issues in the pathology and pathobiology of pulmonary hypertension, *J. Am. Coll. Cardiol.* 62 (25 Suppl.) (Dec. 24 2013) D4–12.
- [28] D.A. Ingram, N.M. Caplice, M.C. Yoder, Unresolved questions, changing definitions, and novel paradigms for defining endothelial progenitor cells, *Blood* 106 (5) (Sep. 1 2005) 1525–1531.
- [29] M.C. Yoder, D.A. Ingram, Endothelial progenitor cell: ongoing controversy for defining these cells and their role in neovascularization in the murine system, *Curr. Opin. Hematol.* 16 (4) (Jul. 2009) 269–273.
- [30] F. Timmermans, J. Plum, M.C. Yoder, D.A. Ingram, B. Vandekerckhove, J. Case, Endothelial progenitor cells: identity defined? *J. Cell. Mol. Med.* 13 (1) (Jan. 2009) 87–102.
- [31] S. Pizarro, J. Garcia-Lucio, V.I. Peinado, et al., Circulating progenitor cells and vascular dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease, *PLoS One* 9 (8) (2014), e106163.
- [32] K. Feher, J. Kirsch, A. Radbruch, H.D. Chang, T. Kaiser, Cell population identification using fluorescence-minus-one controls with a one-class classifying algorithm, *Bioinformatics* 30 (23) (Dec. 1 2014) 3372–3378.
- [33] M. Teraa, R.W. Sprengers, P.E. Westerweel, et al., Bone marrow alterations and lower endothelial progenitor cell numbers in critical limb ischemia patients, *PLoS One* 8 (1) (2013), e55592.
- [34] K. Satoh, Y. Kagaya, M. Nakano, et al., Important role of endogenous erythropoietin system in recruitment of endothelial progenitor cells in hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice, *Circulation* 113 (11) (Mar. 21 2006) 1442–1450.
- [35] S. Balaji, M. LeSaint, S.S. Bhattacharya, et al., Adenoviral-mediated gene transfer of insulin-like growth factor 1 enhances wound healing and induces angiogenesis, *J. Surg. Res.* 190 (1) (Jul. 2014) 367–377.
- [36] C. Foresta, T.L. De, M.A. Di, A. Garolla, A. Ferlin, D. Zuccarello, The PDE5 inhibitor sildenafil increases circulating endothelial progenitor cells and CXCR4 expression, *J. Sex. Med.* 6 (2) (Feb. 2009) 369–372.
- [37] H.A. Ghofrani, A.M. D'Armini, F. Grimminger, et al., Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension, *N. Engl. J. Med.* 369 (4) (Jul. 25 2013) 319–329.
- [38] M. Humbert, Pulmonary arterial hypertension and chronic thromboembolic pulmonary hypertension: pathophysiology, *Eur. Respir. Rev.* 19 (115) (Mar. 2010) 59–63.

Tercer estudi:

Imbalance between endothelial damage and repair capacity in COPD.

Jéssica García-Lucio, Victor I. Peinado, Lluís de Jover, Roberto del Pozo, Isabel Blanco, Cristina Bonjoch, Núria Coll-Bonfill, Tanja Paul, Olga Tura-Ceide, Joan Albert Barberà.

Article enviat a Thorax

Factor d'impacte: 8.272

Resultats

Objectiu general:

Estudiar si els pacients amb MPOC tenen una alteració de la competència vascular avaluada mitjançant els nivells circulants d'EMPs i CPs.

Objectius específics:

1. Estudiar si els nivells circulants individuals d'EMPs i CPs, així com la relació EMPs/CPs en pacients amb MPOC difereixen respecte els controls.
2. Estudiar l'efecte del tabac sobre els nivells circulants d'EMPs, CPs i la relació EMPs/CPs en subjectes amb o sense MPOC.
3. Estudiar l'efecte de l'hipertensió pulmonar associada a la MPOC sobre els nivells circulants d'EMPs, CPs i la relació EMPs/CPs.
4. Estudiar el possible efecte de les variables confusores amb rellevància biològica (sexe, edat, risc cardiovascular, etc) sobre els nivells circulants d'EMPs i CPs.
5. Estudiar les relacions entre els nivells circulants d'EMPs, CPs i la relació EMPs/CPs i els paràmetres clínics de la malaltia.

Resum de la metodologia:

Els nivells d'EMPs i CPs circulants van ser determinats en 27 subjectes control no fumadors, 20 fumadors i 61 malalts amb MPOC. Les EMPs es van determinar per citometria de flux a partir de mostres de plasma pobre en plaquetes obtingudes després d'una sèrie de centrifugacions sequencials de la sang venosa perifèrica obtinguda dels subjectes. La identificació de les EMPs es va fer segons l'expressió d'antígens específics de membrana: CD31+CD42b- per les EMPs totals, CD31+CD42b-Annexin V+ per les EMPs d'origen apoptòtic i CD31+CD42b-CD62E+ per les EMPs d'origen activat.

Les CPs també es van mesurar per citometria de flux a partir de les cèl·lules mononuclears sanguínees obtingudes a partir del gradient de Ficoll de la sang venosa perifèrica dels subjectes. Les CPs es van definir com cèl·lules CD34+CD45+CD133+.

Degut a que tant el recompte d'EMPs com de CPs segueix una distribució esbiaixada, els valors van ser transformats a ln per millorar la normalitat. Es van utilitzar models de regressió lineal per ajustar les dades per les possibles variables biològiques confusores basant-se en la plausibilitat biològica.

Resultats

Resultats principals:

Nivells circulants de micropartícules endotelials

Els malalts amb MPOC presentaven nivells circulants d'EMPs totals (CD31⁺CD42b⁻) i EMPs derivades de cèl·lules endotelials en apoptosi (CD31⁺CD42b⁻Annexina-V⁺) significativament més elevats que el grup control de no fumadors, tant en l'anàlisi ajustat per les variables confusores com el no ajustat.

El grup de fumadors sense MPOC va presentar nivells d'EMPs totals i apoptòtiques en una posició intermitja entre el grup dels controls no fumadors i els malalts amb MPOC. En el cas de l'anàlisi estadístic no ajustat per les covariables confusores, l'increment dels nivells d'ambdues combinacions d'EMPs va ser significatiu respecte els controls no fumadors. Per contra, quan es van corregir les dades per les variables confusores, tot i que es mantenia la tendència a l'increment, es perd la significància. En ambdós tests estadístics no es van trobar diferències significatives entre els fumadors sense MPOC i els malalts amb MPOC.

En els nivells d'EMPs derivades de cèl·lules endotelials activades/inflamades (CD31⁺CD42b⁻CD62E⁺) no s'observaven diferències significatives entre els diferents grups amb cap dels dos mètodes estadístics.

Nivells circulants de cèl·lules progenitores

L'anàlisi de covariàncies va revelar l'efecte del gènere en els nivells circulants de CPs (CD34⁺CD133⁺CD45⁺). Les dones presentaven nivells basals de CPs més baixos que els homes.

En l'anàlisi no ajustat per les variables confusores, els nivells de CPs estaven reduïts de manera significativa en les dones amb MPOC comparat amb els grups de dones control no fumadores i fumadores. A més, les dones amb MPOC també presentaven nivells de CPs més baixos que els homes amb MPOC. Per la seva banda, els nivells circulants de CPs en els homes no presentaven diferències significatives entre els diferents grups.

En l'anàlisi ajustat per les variables confusores, ambdós gèneres presentaven la mateixa dinàmica: els malalts amb MPOC tenien nivells reduïts de CPs comparat amb els fumadors.

Avaluació de la relació EMPs/CPs

Els malalts amb MPOC presentaven una major relació EMPs/PCs comparat amb els controls no fumadors, mentre que el grup de fumadors ocupava una posició intermitja que no diferia significativament ni dels controls ni dels malalts amb MPOC. En l'anàlisi posterior per gènere, les dones amb MPOC presentaven un major quocient EMPs/PCs comparat amb els grups controls, mentre que no s'observaven diferències significatives en els homes.

Efecte del tabac en els nivells d'EMPs, CPs i la relació EMPs/CPs

Els malalts amb MPOC, independentment de si eren fumadors o no, presentaven nivells d'EMPs totals i apoptòtiques incrementats respecte els controls.

En quant als nivells de CPs, l'anàlisi inicial va mostrar que els malalts amb MPOC que seguien fumant tenien nivells reduïts de CPs comparat amb la resta de grups. Quan l'anàlisi es va fer per gènere, les dones amb MPOC presentaven nivells reduïts de CPs independentment del tabac; mentre que en homes no s'observaven diferències clares.

La relació EMPs/PCs es va trobar incrementada en els malalts amb MPOC, tant si seguien fumant com si ho havien deixat, comparat amb els controls no fumadors. Resultats similars s'observaven en les dones amb MPOC, mentre que el homes només presentaven un augment significatiu del quocient en el grup de malalts amb MPOC que seguien fumant, respecte els controls no fumadors.

Relació dels nivells d'EMPs, CPs i el quocient EMPs/CPs amb la funció pulmonar i marcadors plasmàtics vasculars

Els nivells circulants d'EMPs i CPs no correlacionaven entre si, ni tampoc amb els nivells de marcadors plasmàtics, ni la presència/absència d'hipertensió pulmonar associada a la MPOC. Però en dones, la relació EMPs/CPs estava associada amb la funció pulmonar, tenint un quocient més elevat aquelles dones amb valors baixos de DL_{CO} i FEV₁.

Thorax

Imbalance between endothelial damage and repair capacity in chronic obstructive pulmonary disease

Journal:	<i>Thorax</i>
Manuscript ID	thoraxjnl-2017-211209
Article Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	24-Oct-2017
Complete List of Authors:	García-Lucio, Jéssica ; Hospital Clinic de Barcelona, Pulmonary Medicine Peinado, Víctor; Hospital Clinic de Barcelona, Pulmonary Medicine; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES) de Jover, Lluís; Biostatistics Unit, University of Barcelona, Department of Public Health, Del Pozo, Roberto; Hospital Clinic de Barcelona, Pulmonary Medicine Blanco, Isabel; Hospital Clinic de Barcelona, Pulmonary Medicine; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES) Bonjoch, Cristina; Hospital Clinic de Barcelona, Pulmonary Medicine Coll-Bonfill, Núria; Hospital Clinic de Barcelona, Pulmonary Medicine Paul, Tanja; Hospital Clinic de Barcelona, Pulmonary Medicine Tura-Ceide, Olga; Hospital Clinic de Barcelona, Pulmonary Medicine; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES) Barbera, Joan; Hospital Clinic de Barcelona, Pulmonary Medicine; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Respiratorias (CIBERES)
Keywords:	COPD Pathology, Lung Physiology

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3 **Imbalance between endothelial damage and repair capacity in chronic obstructive pulmonary**
4
5 **disease**
6
7

8
9 Jéssica García-Lucio¹, Victor I. Peinado¹⁻², Lluís de Jover³, Roberto del Pozo¹, Isabel Blanco¹⁻², Cristina
10
11 Bonjoch¹, Núria Coll-Bonfill¹, Tanja Paul¹⁻², Olga Tura-Ceide^{1-2*} and Joan Albert Barberà^{1-2*}
12
13

14
15 * Both authors contributed equally to this work.
16
17

18
19 ¹Department of Pulmonary Medicine, Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i
20
21 Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona; Spain. ²Centro de Investigación Biomédica en Red de
22
23 Enfermedades Respiratorias (CIBERES); Spain. ³Biostatistics Unit, Department of Public Health, School
24
25 of Medicine, University of Barcelona; Spain
26
27

28
29
30 **Corresponding author:** Joan Albert Barberà. Servei de Pneumologia. Hospital Clínic. Villarroel, 170.
31
32 Barcelona 08036. Spain. Phone 34-93-227-5747; FAX 34-93-227-5455; E-mail: jbarbera@clinic.ub.es.
33
34

35
36
37 **Word count: 3020**
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

KEYWORDS

Endothelial microparticles; endothelial progenitor cells; endothelial dysfunction; cigarette smoking;
pulmonary hypertension.

Confidential: For Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

ABSTRACT

Circulating endothelial microparticles (EMPs) and progenitor cells (PCs) are biological markers of endothelial function and endogenous repair capacity.

The study was aimed to investigate whether COPD patients have an imbalance between EMPs to PCs compared to controls and to evaluate the effect of cigarette smoke on these circulating markers.

Circulating EMPs and PCs were determined in 27 nonsmokers, 20 smokers and 61 COPD patients. We compared total EMPs (CD31⁺CD42b⁻), apoptotic if they co-expressed Annexin-V⁺ or activated if they co-expressed CD62E⁺, circulating PCs (CD34⁺CD133⁺CD45⁺) and the EMPs/PCs ratio between groups.

COPD patients presented increased levels of total and apoptotic circulating EMPs, and an increased EMPs/PCs ratio, compared with nonsmokers. Women had less circulating PCs than men through all groups and those with COPD showed lower levels of PCs than both control groups. In smokers, circulating EMPs and PCs did not differ from nonsmokers, being the EMPs/PCs ratio in an intermediate position between COPD and nonsmokers.

We conclude that COPD patients present an imbalance between endothelial damage and repair capacity that might explain the frequent concurrence of cardiovascular disorders. Factors related to the disease itself and gender, rather than cigarette smoking, may account for this imbalance.

Word count: 194 (max 200)

INTRODUCTION

Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is a life-threatening lung disease with systemic impact [1]. The primary cause of COPD is cigarette smoking, which is known to also produce endothelial dysfunction [2]. Previously, we demonstrated that COPD patients show endothelial impairment in both the pulmonary and the systemic circulation that may predispose to pulmonary hypertension (PH) and/or cardiovascular events [3–5]. Circulating biomarkers have emerged as promising non-invasive surrogates which may provide insights on endothelial function status and reveal mechanisms of endothelial derangement. Cellular biomarkers such as endothelial microparticles and progenitor cells have recently been related to endothelial health [6].

Circulating endothelial microparticles (EMPs) are small membrane-bound vesicles (0.1-1 μ m diameter) shed from the endothelium in response to cell activation, injury and/or apoptosis [6–8]. As they circulate in the vasculature, they not only act on their local environment but also on sites far from their origin, serving as a cell-to-cell communication network [9]. In plasma of healthy subjects, EMPs are present at low levels, reflecting normal endothelial turnover [10]. Increased levels of EMPs have been reported in a variety of vascular-related disorders [7] and their levels are inversely correlated with endothelial function [11]. Cigarette smoke may alter the levels of circulating EMPs [12–15]. In COPD, elevated EMPs levels have been reported [16,17]. Higher EMPs levels with activated phenotype may denote COPD patients susceptible to an exacerbation episode [18], and to be predictive of rapid FEV₁ decline [19]. Recently, a negative correlation between EMPs in sputum and FEV₁ has been described in COPD [20].

Circulating progenitor cells (PCs) are adult stem cells derived from the bone marrow that are mobilized into the circulation in response to vascular injury [21]. They are involved in maintenance of the endothelium and restoration of its normal function [21]. However, it has also been reported that PCs could participate in the progression of pre-existing lesions [22]. In a recent study, we showed that COPD patients have lower levels of circulating PCs which appear to be a consequence of the disease itself and not related to smoking habit [5]. In this line, other studies also showed lower PCs

1
2
3 levels in COPD [23–28], while others did not find significant differences [29,30]. Decreasing number
4
5 of circulating PCs has been established as an independent prognostic risk factor associated with
6
7 endothelial dysfunction and higher cardiovascular risk [31].
8

9
10 As the magnitude of endothelial damage may result from an imbalance between injury and repair
11
12 capacity, the combined assessment of circulating EMP and PC levels may be used to evaluate the
13
14 status of vascular health in different disorders [32–34].
15

16
17 Based on this background, we hypothesized that in COPD, alterations of endothelial function are
18
19 associated with changes in the number of circulating EMPs and PCs. Accordingly, the present study
20
21 aims to investigate whether COPD patients have an imbalance between EMPs to PCs compared to
22
23 nonsmokers and current smokers, and the relationship with COPD severity and the presence of PH.
24
25

26 **METHODS**

27 **Study population**

28
29 Sixty-one patients with COPD and 47 control subjects (27 nonsmokers and 20 current smokers) with
30
31 normal lung function were enrolled in the study. Patients were recruited from the outpatient clinic
32
33 and nonsmokers and current smokers were volunteers. The study was approved by the internal
34
35 review board and all subjects gave written informed consent.
36
37

38
39 All subjects underwent standard evaluation by means of medical history, clinical examination, lung
40
41 function tests and electrocardiogram. COPD was defined by compatible symptoms and airflow
42
43 obstruction on forced spirometry (post-bronchodilator forced expiratory volume in the first second
44
45 (FEV_1)/forced vital capacity (FVC) <70%). COPD patients underwent additional diagnostics for the
46
47 assessment of associated PH; defined on the basis of right heart catheterization (mean pulmonary
48
49 arterial pressure ≥ 25 mmHg and pulmonary artery occlusion pressure ≤ 15 mmHg) or by Doppler
50
51 echocardiography (tricuspid regurgitation velocity ≥ 2.8 m/s).
52
53
54

55 **Blood sampling and measurements**

56
57 Venous blood samples were obtained after fasting overnight by peripheral venipuncture and
58
59
60

1
2
3 collected in vacutainers to measure circulating EMPs, PCs and inflammatory and vascular markers.
4
5 Two of the tubes were centrifuged immediately 10 min (800g, 4°C) and, after centrifugation, plasma
6
7 was aliquoted and stored at -80°C until analysis. Plasma markers were determined by ELISA using
8
9 commercially available kits.
10

11 12 13 *Assessment of circulating endothelial microparticles*

14
15 Preparation of EMP samples and measurements using flow cytometry were performed as previously
16
17 described [12] and as detailed in the supplementary material. Total circulating EMPs were assessed
18
19 as CD31⁺ (normally found on endothelial cells) and CD42b⁻ (platelet surface membrane glycoprotein)
20
21 (Figures S1A-S1B) [12,13,15]. To evaluate whether EMPs were derived from apoptotic or activated
22
23 endothelial cells, EMPs were also assessed by annexin-V staining (apoptotic cells) (Figure S1C) [8,12]
24
25 and CD62E (E-selectin; expressed on cells activated by cytokines) staining (Figure S1D) [8,16],
26
27 respectively.
28
29

30 31 32 *Assessment of circulating progenitor cells*

33
34 Preparation of PCs samples and measurements were performed as previously described [5] and as
35
36 detailed in the supplementary material. The number of circulating PCs was evaluated by flow
37
38 cytometry using antibodies against CD45 (pan-leukocyte marker), CD133 (subpopulation of
39
40 hematopoietic stem cells) and CD34 (mature and progenitor endothelial cells) (Figures S2A-S2D).
41
42
43

44 45 **Statistical Analysis**

46
47 In the non-adjusted analysis, data are expressed as mean±SD for normally distributed data or as
48
49 median with interquartile range for skewed distributions. Group comparisons were performed using
50
51 one or two way ANOVA and post hoc pairwise comparisons using the Student Newman-Keuls test for
52
53 normally distributed variables or the Dunn's test for non-normally distributed variables. Correlations
54
55 between variables were analyzed with Pearson's or Spearman's coefficient depending on data
56
57 distribution.
58
59
60

In the statistical adjusted model, as EMP and PC counts were skewed in distribution, values were ln-transformed to improve normality. Linear regression models were used to adjust for potential confounders, which were selected based on biologic plausibility such as age, gender, body mass index (BMI) and Framingham risk score [35].

A p-value <0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

Population characteristics

Anthropometric, clinical and functional characteristics of subjects are shown in Table 1. Nonsmokers and current smokers were matched for age, gender and BMI. COPD patients were older and with a higher proportion of men. All healthy smokers and 26% of COPD patients were current smokers. The COPD group had higher Framingham risk score compared with the other groups. Three patients with COPD (5%) were in spirometric GOLD stage 1, 17 (28%) in stage 2, 18 (29%) in stage 3, and 23 (38%) in stage 4. Patients with COPD had moderate to severe airflow obstruction, air trapping, reduction of CO diffusing capacity and mild to moderate hypoxemia (Table 1). Characteristics of subjects by gender are shown in Table S1.

Table 1. Clinical characteristics, lung function, cardiovascular and laboratory measurements

	Nonsmokers (n=27)	Current smokers (n=20)	COPD patients (n=61)
Age, years	56 ± 8	54 ± 8	63 ± 7*#
Male gender, n (%)	12 (44)	9 (45)	51 (84)*#
BMI, kg/m ²	27 ± 3	27 ± 5	27 ± 4
Smoking status			
Current smokers, n (%)	0 (0)	20 (100)*	16 (26)*#
Former-smokers, n (%)	0 (0)	0 (0)	45 (74)*#
Smoking history, pack-years	0	30 ± 24*	64 ± 28*#
Framingham risk score ‡	5 ± 5	7 ± 6	11 ± 6*#
Spirometric GOLD stage 1/2/3/4			
n	NA	NA	3 /17 /18 /23
(%)			5 /28 /29 /38
FEV ₁ , % predicted	107 ± 12	103 ± 10	44 ± 19*#
FVC, % predicted	106 ± 11	104 ± 12	79 ± 19*#

FEV ₁ /FVC	0.78 ± 0.05	0.77 ± 0.05	0.41 ± 0.14* [#]
TLC, % predicted	105 ± 8	106 ± 9	115 ± 20* [#]
RV, % predicted	108 ± 18	110 ± 23	184 ± 58* [#]
DL _{CO} , % predicted	92 ± 15	85 ± 9	53 ± 20 * [#]
PaO ₂ , mmHg	NA	NA	70 ± 11
PaCO ₂ , mmHg	NA	NA	44 ± 8
Systolic blood pressure, mmHg	124 ± 18	123 ± 16	131 ± 20
Diastolic blood pressure, mmHg	75 ± 9	73 ± 8	76 ± 11
Total Cholesterol, mg/dL	205 ± 26	218 ± 39	195 ± 34 [#]
HDL, mg/dL	57 ± 14	68 ± 15*	58 ± 18
LDL, mg/dL	129 ± 22	132 ± 32	113 ± 30* [#]
Mellitus diabetes, n (%)	1 (4)	0 (0)	7 (11) * [#]
Lymphomonocytes, x10 ⁵ events	8.8 ± 1.4	9.2 ± 2.5	8.4 ± 2.5

Data are shown as mean ± SD.

COPD: chronic obstructive pulmonary disease; BMI: body mass index, GOLD: global initiative for chronic obstructive lung disease, FEV₁: forced expiratory volume in the first second; FVC: forced vital capacity; TLC: total lung capacity; RV: residual volume; DL_{CO}: diffusing capacity of the lung for carbon monoxide; PaO₂: arterial partial oxygen pressure; PaCO₂: arterial partial carbon dioxide pressure; HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein and NA: not applicable.

‡The Framingham risk score can range from -6 to 19, with higher scores indicating greater cardiovascular risk.

* p < 0.05 compared with control nonsmokers; # p < 0.05 compared with current smokers.

Circulating EMPs levels

In the non-adjusted model, the number of total circulating EMPs was significantly increased in COPD patients and current smokers compared with nonsmokers (Table 2 and Figure 1A). In the adjusted model, where levels of EMPs were corrected by age, gender, BMI and Framingham risk score, COPD patients also showed significantly increased levels of total circulating EMPs compared with nonsmokers. However, while in current smokers, adjusted levels of EMPs were also higher than in nonsmokers, differences did not reach statistical significance (Table 2). Similarly, levels of EMPs derived from apoptotic origin were increased in both COPD patients and smokers compared with nonsmokers in the non-adjusted analysis (Table 2 and figure S3A). In the adjusted model, only patients with COPD showed significantly higher number of these EMPs compared to nonsmokers. No statistical differences were found in the levels of EMPs derived from activated endothelial cells between groups, either using the non-adjusted or the adjusted models (Table 2 and figure S3B).

Table 2. Circulating endothelial microparticles counts

	Nonsmokers (n= 27)	Current smokers (n= 20)	COPD (n= 61)
CD31 ⁺ CD42b ⁻ EMPs/ μ L PPP			
<u>Non-adjusted model</u>	410	622*	668*
Mean, (95% CI)	(330 - 490)	(442 - 801)	(552 - 785)
<u>Adjusted model[†]</u>	357	526	549 *
Predicted mean, (95% CI)	(284 - 448)	(404 - 686)	(471 - 639)
CD31 ⁺ CD42b ⁻ Annexin V ⁺ EMPs/ μ L PPP			
<u>Non-adjusted model</u>	290	448*	535*
Mean, (95% CI)	(230 - 351)	(311 - 584)	(430 - 640)
<u>Adjusted model[†]</u>	242	365	414*
Predicted mean, (95% CI)	(186 - 317)	(268 - 498)	(346 - 494)
CD31 ⁺ CD42b ⁻ CD62E ⁺ EMPs/ μ L PPP			
<u>Non-adjusted model</u>	14	17	9
Mean, (95% CI)	(6 - 21)	(8 - 26)	(5 - 14)
<u>Adjusted model[†]</u>	5	7	5
Predicted mean, (95% CI)	(3 - 8)	(4 - 13)	(3 - 7)

* p<0.05 compared to nonsmokers

† Model adjusted for age, gender, BMI and Framingham risk score. Values are expressed as the anti-In.

EMPs: endothelial microparticles, COPD: chronic obstructive pulmonary disease, PPP: platelet poor plasma, BMI: body mass index and CI: confidence interval.

Circulating PCs levels

Initial analysis of circulating levels of CD34⁺CD133⁺CD45⁺ PCs showed no significant differences between the different groups (Figure 1B). However, analysis of covariates revealed that gender had a significant effect on the levels of circulating PCs. Accordingly; the subsequent assessment of circulating PC levels was performed dividing all groups by gender.

Among women, those with COPD showed significantly lower levels of circulating PCs than both nonsmokers and smokers in the non-adjusted analysis (Table 3 and figure S3C). Similar findings were observed using CD34+CD133+ and CD34+CD45+ combinations of PCs (data not shown). In men, no significant differences were found in the number of PCs between groups (Table 3 and figure S3D). In the adjusted model, levels of circulating PCs were reduced in COPD compared to smokers in both

men and women (Table 3). No statistical differences were found between the nonsmoker and smoker groups in the number of circulating PCs (Table 3).

Interestingly, women showed reduced levels of PCs compared to men throughout all groups, primarily in COPD subjects ($p=0.031$) (Table 3).

Table 3. Circulating progenitor cell counts

	Nonsmokers (n= 27)		Current smokers (n= 20)		COPD (n= 61)	
	Men (n= 12)	Women (n= 15)	Men (n= 9)	Women (n= 11)	Men (n= 51)	Women (n= 10)
CD34 ⁺ CD133 ⁺ CD45 ⁺ % lymphomonocytes						
<u>Non-adjusted model</u> Mean, (95% CI)	0.050 (0.035 – 0.067)	0.044 (0.032 – 0.056)	0.062 (0.028 – 0.097)	0.053 (0.029 – 0.078)	0.048 (0.039 – 0.057)	0.017* ^{##} (0.011 – 0.023)
<u>Adjusted model</u> [†] Predicted mean, (95% CI)	0.062 (0.045 – 0.085)	0.038 (0.029 – 0.050)	0.076 (0.053 – 0.106)	0.047 (0.034 – 0.063)	0.045 [§] (0.038 – 0.053)	0.028 [#] (0.020 – 0.038)

† Model adjusted for age, gender, BMI and Framingham risk score. Values are expressed as the anti-ln.

* $p<0.05$ compared with women nonsmokers; [§] $p<0.05$ compared with men smokers; [#] $p<0.05$ compared with women smokers; [‡] $p<0.05$ compared with men COPD.

COPD: chronic obstructive pulmonary disease, CI: confidence interval and BMI: body mass index.

Assessment of EMPs/PCs ratio

We assessed the ratio of EMPs to PCs as a measure of the balance between endothelial damage and repair capacity. In our series, the EMPs/PCs ratio was increased in COPD patients compared to nonsmokers; being the smokers in an intermediate position that did not significantly differ neither from the nonsmoker nor from the COPD groups (Figure 1C). Further analysis considering the gender, revealed that women with COPD had greater EMPs/PCs ratio compared to control groups (Figure S3E), while no significant differences were found in men (Figure S3F).

Effect of cigarette smoking on circulating EMP and PC levels

Within the COPD group there were both current and ex-smokers. To assess whether smoking status

could influence the levels of circulating EMPs and PCs, group comparisons were re-analysed according to smoking status. Our results show that levels of total and apoptotic circulating EMPs were increased in COPD compared to nonsmokers irrespective of smoking status (Figures 2A and S4A).

Regarding circulating PCs, COPD patients that were current smokers had less circulating PCs than the other groups (Figure 2B). When we divided subjects by gender, women with COPD showed a significant reduction of PC levels compared with the other groups, irrespective of the smoking status (Figure S4B), whereas no differences were found in men (Figure S4C).

The EMPs/PCs ratio was higher in COPD patients compared to nonsmokers irrespective of the smoking status (Figure 2C). Similar results were obtained in women (Figure S4D), while in men only COPD patients that were current smokers showed higher EMPs/PCs ratio than nonsmokers (Figure S4E).

Inflammatory and vascular markers

Compared with nonsmokers and smokers, COPD patients had higher plasma levels of hsPCR, fibrinogen, HGF and siCAM. In the COPD group, VEGF was lower than in the nonsmokers and sTNF α higher than in the smokers (Table 4). No relationship was found between plasma levels of the different biomarkers and the severity of airflow obstruction.

Table 4. Vascular and systemic inflammatory markers in the study population

	Nonsmokers (n= 27)	Current smokers (n= 20)	COPD (n= 61)
VEGF, % detectable	44	60	47
VEGF, pg/mL	47 (23 - 85)	13 (10 - 33)	17 (5 - 32)*
IL-6, pg/mL	1.7 (0,9 - 5.2)	2.5 (0.9 - 8.0)	1.7 (0.8 - 3.1)
hsPCR, mg/dL	0.15 (0,05 - 0.24)	0.09 (0.05 - 0.32)	0.38 (0.13 - 0.86) *#
TGF- β , ng/ml	2.3 (1,4 - 3.4)	2.1 (1.5 - 5.6)	2.8 (2.0 - 3.6)
BNP, pg/mL	13.7 (4,2 - 23.4)	12 (8.2 - 27.7)	15.5 (7.9 - 27.3)
Fibrinogen, g/L	3.4 (3,1 - 3.7)	3.3 (2.9 - 3.8)	3.9 (3.3 - 4.8) *#
HGF, pg/ml	274 (219 - 450)	257 (218 - 365)	338 (308 - 418) * #
Leptine, ng/ml	11 (8.5 - 17.1)	13.9 (6.6 - 17.4)	11.9 (8.5 - 21.3)
Adiponectin, ng/ml	1046 (786 - 1517)	1118 (859 - 1628)	905 (689 - 1202)

cGMP, nmol/ml	2.5 (1.9 – 3.2)	2.2 (1.8 – 3.0)	2.3 (1.8 - 321)
sTNF α , pg/ml	1039 (705 - 411)	897 (691 - 1159)	1185 (860 - 1441) [#]
sICAM, ng/ml	77 (59 - 95)	86 (67 - 145)	96 (81 – 203)*
sAXL, ng/ml	38 (15 - 71)	42 (21 - 69)	37 (21 - 60)

Data are shown as median (interquartile range).

VEGF: vascular endothelial growth factor; IL-6: interleukin-6; hsCRP: high sensitive C-reactive protein; TGF- β : transforming growth factor- β ; BNP: brain natriuretic peptide; HGF: hepatocyte growth factor, cGMP: cyclic guanosine monophosphate, sTNF α : soluble tumor necrosis factor α ; sICAM: soluble intracellular adhesion molecule-1 and sAXL: soluble AXL.

* $p < 0.05$ compared to nonsmokers; [#] $p < 0.05$ compared to smokers

Relationship among circulating EMPs and PCs vs lung function and cardiovascular parameters

There was no significant correlation between the number of circulating EMPs and PCs, in both the whole population or when divided by gender (Figures S5A-S5C). Circulating EMPs, PCs and the EMPs/PCs ratio were not related to the levels of inflammatory or vascular biomarkers. In the COPD group, no differences in EMP and PC levels or the ratio were observed between those with and without PH.

In women, the EMPs/PCs ratio was higher in those with CO diffusing capacity (DL_{CO}) (Figure 3A), and those with forced expiratory volume in the first second (FEV_1) below the median (Figure 3B).

DISCUSSION

In the present study we assessed comprehensively the balance between endothelium injury and repair capacity, which is critical for the maintenance of vascular homeostasis, in patients with COPD. Our results show elevated levels of circulating EMPs, an indicator of endothelial cell damage, and reduced numbers of bone marrow-derived PCs able to maintain and repair the endothelium. The ratio between these two factors was significantly disturbed in COPD suggesting a phenotype of vascular incompetence in those patients [6,33]. Interestingly, while cigarette smoking was not related to this vascular incompetence, gender appears to play a key role on endothelial repair capacity.

1
2
3 In our study the levels of total and apoptotic circulating EMPs were elevated in COPD patients, in
4 agreement with previous observations [16–18]. Since COPD patients showed increased
5 cardiovascular risk factors compared with the other groups, particularly systemic hypertension, and
6 increased cardiovascular risk is associated with greater numbers of circulating EMPs [36], we
7 analysed EMP levels by using an adjusted statistical model to compensate for potential confounding
8 factors. EMP levels in COPD remained significantly higher in the adjusted model, suggesting that
9 increased EMP levels are related to the disease itself rather than to other factors of cardiovascular
10 risk. Interestingly, smokers without COPD also showed significantly higher levels of circulating EMPs
11 than nonsmokers in the non-adjusted analysis but not in the adjusted model. Accordingly,
12 differences in circulating EMPs between smokers and nonsmokers appear to be related to other
13 influencers, i.e. cardiovascular risk factors, rather than to the smoking habit.
14
15

16
17
18 In our study, the number of circulating EMPs was not related to indices of COPD severity, suggesting
19 that endothelial damage might be associated with the presence of COPD rather than to its
20 progression. Our results concur with those of Thomashow et al [16] who showed increased numbers
21 of apoptotic EMPs in COPD patients that did not differ among a wide range of COPD severity.
22 Circulating EMPs may act as signalling elements capable of producing endothelial damage in systemic
23 vessels and explain, at least in part, the frequent association between COPD and cardiovascular
24 disease.
25

26
27
28 Bone marrow-derived circulating PCs are key to endothelial repair [21]. In a recent study, we showed
29 that COPD patients present reduced numbers of circulating PCs [5]. In the present study, COPD
30 patients showed numerically lower numbers of circulating PCs, but differences did not reach
31 statistical significance. Unlike some previous studies in which there was no matching for age and/or
32 gender between groups [24,28], we statistically corrected the data for confounder parameters. Our
33 results revealed that gender had an effect on the levels of circulating PCs in all groups, highlighting
34 the importance of gender matching in PCs studies. In the adjusted model, levels of circulating PCs
35 were reduced in both men and women with COPD. Interestingly, women showed reduced levels of
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 PCs compared to men throughout all groups, primarily in COPD patients. Recent evidence suggests
4
5 gender-related differences in COPD patients [37]. Women develop more severe COPD at younger
6
7 ages than men and with lower levels of cigarette smoke exposure [37]. Accordingly, it has been
8
9 suggested that men and women may be phenotypically different in their response to cigarette smoke
10
11 [38]. Progenitor cells are actively involved in cardiovascular homeostasis and provide in basal
12
13 conditions a pool of circulating cells able to repair ongoing endothelial damage. We hypothesize that
14
15 reduced levels of circulating PCs in women, as compared to men, may result in lower repair capacity
16
17 and higher susceptibility to the effects of cigarette smoke. In recent years the concept of impaired
18
19 endothelial cell survival has emerged as a relevant factor in the pathogenesis of emphysema [39].

20
21 Although we did not assess the severity of emphysema, in our study a higher EMPs/PCs ratio was
22
23 associated with lower DLCO. Such impairment in the repair capacity of vascular endothelium might
24
25 explain the more rapid progression of emphysema observed in women [40]. Levels of PCs fluctuate
26
27 throughout lifetime in women and decline dramatically after menopause, coupled to hormonal
28
29 mechanisms and endometrial vascular turnover [41]. All women involved in this study were above 45
30
31 years old which could further explain the decline in circulating PCs. Other factors such as genetic
32
33 predisposition, anatomic, social or hormonal differences might also explain the influence of gender in
34
35 COPD development [38].

36
37 In our study, we did not find any relationship between the levels of circulating EMPs and PCs,
38
39 suggesting that both markers may reflect different but complementary physiologic cellular
40
41 mechanisms of action. However, both markers measured together may characterize a phenotype of
42
43 vascular competence [6,33]. Our study assesses for the first time such vascular competence in COPD
44
45 patients by the combined measurement of markers of vascular integrity and repair capacity in the
46
47 same subjects. Our results show a phenotype of disturbed vascular competence in COPD patients,
48
49 being smokers without COPD in an intermediate position between COPD and nonsmokers. Our
50
51 findings in COPD are in line with those reported in hypercholesterolemia, psoriasis or Sjögren
52
53 syndrome [32–34], suggesting a common background for the frequent development of
54
55
56
57
58
59
60

1
2
3 cardiovascular disease in these different conditions. In our study, COPD patients with concomitant
4
5 pulmonary hypertension did not show differences in EMPs or PCs count, or in the EMPs/PCs ratio,
6
7 suggesting that such vascular incompetence is insufficient to produce pulmonary hypertension and
8
9 that additional factors may concur for its development.
10

11
12 Some studies have reported that cigarette smoke increases the levels of circulating MPs [12–15],
13
14 suggesting early development of emphysema in healthy smokers. The effect of cigarette smoke on
15
16 PCs is controversial [30,42]. We and others have reported similar numbers of circulating PCs in
17
18 current smokers and nonsmokers [5,25]. In the present study, there were no differences between
19
20 total and apoptotic circulating EMPs between former or current smokers. Since differences shown in
21
22 the present study in COPD patients in circulating levels of EMPs and PCs and in the EMPs/PCs ratio
23
24 were independent of the current smoking status, we consider that the impairment of vascular
25
26 competence in COPD appears to be a consequence of the disease itself rather than to an effect of
27
28 cigarette smoking.
29
30

31
32
33 In our study we did not find any relationship between circulating EMPs and PCs and any of the
34
35 plasmatic markers assessed. This is consistent with recent studies [24] and denotes the complex
36
37 interactions between markers of systemic inflammation and vascular impairment. In the same line,
38
39 most of the correlations of EMPs and PCs levels with conventional pulmonary function or
40
41 demographic parameters were weak or absent.
42
43

44
45 The study has some limitations. Firstly, as we sampled EMPs in peripheral venous blood we cannot
46
47 be certain that the elevation of EMPs is from pulmonary origin. Secondly, we did not perform CT
48
49 scans to assess pulmonary emphysema, therefore we were unable to relate the presence of
50
51 circulating apoptotic EMPs with emphysematous destruction of lung parenchyma. And thirdly, there
52
53 is no worldwide exclusive procedure to isolate and analyse circulating MPs and PCs from plasma.
54

55
56 In conclusion, COPD patients present disturbed vascular competence, as reflected by an imbalance
57
58 between increased endothelial damage and reduced repair capacity, which might explain the
59
60

1
2
3 frequent concurrence of cardiovascular disorders. Factors related to the disease itself and gender,
4
5 rather than the smoking habit, may account for this imbalance.
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Confidential: For Review Only

ACKNOWLEDGMENTS

We are indebted to the Citomics core facility of the Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), specially Dr. Isabel Crespo and Dr. Cristina López, for their technical help.

Sources of support: Supported by grants from the Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) (PS09/00536) and (PI12/00510). JGL was the recipient of a predoctoral research fellowship (PFIS) from the ISCIII, and OTC was the recipient of Marie Curie Post-Doctoral Fellowship Award BIOTRACK: IDIBAPS.

REFERENCES

- 1 Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet Lond Engl* 2012;**379**:1341–51. doi:10.1016/S0140-6736(11)60968-9
- 2 Celermajer DS, Sorensen KE, Georgakopoulos D, *et al*. Cigarette smoking is associated with dose-related and potentially reversible impairment of endothelium-dependent dilation in healthy young adults. *Circulation* 1993;**88**:2149–55.
- 3 Peinado VI, Barbera JA, Ramirez J, *et al*. Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild COPD. *Am J Physiol* 1998;**274**:L908-913.
- 4 Barberà JA, Peinado VI, Santos S, *et al*. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in pulmonary arteries of smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2001;**164**:709–13. doi:10.1164/ajrccm.164.4.2101023
- 5 Pizarro S, García-Lucio J, Peinado VI, *et al*. Circulating progenitor cells and vascular dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 2014;**9**:e106163. doi:10.1371/journal.pone.0106163
- 6 Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, *et al*. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *J Cell Mol Med* 2009;**13**:454–71. doi:10.1111/j.1582-4934.2008.00639.x
- 7 Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, *et al*. Endothelial microparticles in diseases. *Cell Tissue Res* 2009;**335**:143–51. doi:10.1007/s00441-008-0710-9
- 8 Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, *et al*. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res* 2003;**109**:175–80.
- 9 Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res* 2010;**107**:1047–57. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.226456
- 10 Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, *et al*. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost* 2001;**85**:639–46.
- 11 Amabile N, Guérin AP, Leroyer A, *et al*. Circulating endothelial microparticles are associated with vascular dysfunction in patients with end-stage renal failure. *J Am Soc Nephrol JASN* 2005;**16**:3381–8. doi:10.1681/ASN.2005050535
- 12 Gordon C, Gudi K, Krause A, *et al*. Circulating endothelial microparticles as a measure of early lung destruction in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;**184**:224–32. doi:10.1164/rccm.201012-2061OC
- 13 Serban KA, Rezanian S, Petrusca DN, *et al*. Structural and functional characterization of endothelial microparticles released by cigarette smoke. *Sci Rep* 2016;**6**:31596. doi:10.1038/srep31596
- 14 Mobarrez F, Antoniewicz L, Bosson JA, *et al*. The effects of smoking on levels of endothelial progenitor cells and microparticles in the blood of healthy volunteers. *PLoS One* 2014;**9**:e90314. doi:10.1371/journal.pone.0090314

- 1
2
3 15 Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, *et al.* Differences in the released endothelial microparticle
4 subtypes between human pulmonary microvascular endothelial cells and aortic endothelial cells
5 in vitro. *Exp Lung Res* 2013;**39**:155–61. doi:10.3109/01902148.2013.784932
6
- 7 16 Thomashow MA, Shimbo D, Parikh MA, *et al.* Endothelial microparticles in mild chronic
8 obstructive pulmonary disease and emphysema. The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis
9 Chronic Obstructive Pulmonary Disease study. *Am J Respir Crit Care Med* 2013;**188**:60–8.
10 doi:10.1164/rccm.201209-1697OC
11
- 12 17 Strulovici-Barel Y, Staudt MR, Krause A, *et al.* Persistence of circulating endothelial microparticles
13 in COPD despite smoking cessation. *Thorax* 2016;**71**:1137–44. doi:10.1136/thoraxjnl-2015-
14 208274
15
- 16 18 Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, *et al.* Increased circulating endothelial microparticles in COPD
17 patients: a potential biomarker for COPD exacerbation susceptibility. *Thorax* 2012;**67**:1067–74.
18 doi:10.1136/thoraxjnl-2011-201395
19
- 20 19 Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, *et al.* Annual FEV1 changes and numbers of circulating
21 endothelial microparticles in patients with COPD: a prospective study. *BMJ Open*
22 2014;**4**:e004571. doi:10.1136/bmjopen-2013-004571
23
- 24 20 Lacedonia D, Carpagnano GE, Trotta T, *et al.* Microparticles in sputum of COPD patients: a
25 potential biomarker of the disease? *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2016;**11**:527–33.
26 doi:10.2147/COPD.S99547
27
- 28 21 Burger D, Touyz RM. Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial
29 progenitor cells, and circulating endothelial cells. *J Am Soc Hypertens JASH* 2012;**6**:85–99.
30 doi:10.1016/j.jash.2011.11.003
31
- 32 22 Peinado VI, Ramírez J, Roca J, *et al.* Identification of vascular progenitor cells in pulmonary
33 arteries of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*
34 2006;**34**:257–63. doi:10.1165/rcmb.2005-0255OC
35
- 36 23 Fadini GP, Schiavon M, Cantini M, *et al.* Circulating progenitor cells are reduced in patients with
37 severe lung disease. *Stem Cells Dayt Ohio* 2006;**24**:1806–13. doi:10.1634/stemcells.2005-0440
38
- 39 24 Huertas A, Testa U, Riccioni R, *et al.* Bone marrow-derived progenitors are greatly reduced in
40 patients with severe COPD and low-BMI. *Respir Physiol Neurobiol* 2010;**170**:23–31.
41 doi:10.1016/j.resp.2009.10.003
42
- 43 25 Janssen WJ, Yunt ZX, Muldrow A, *et al.* Circulating hematopoietic progenitor cells are decreased
44 in COPD. *COPD* 2014;**11**:277–89. doi:10.3109/15412555.2013.841668
45
- 46 26 Palange P, Testa U, Huertas A, *et al.* Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells
47 are decreased in COPD. *Eur Respir J* 2006;**27**:529–41. doi:10.1183/09031936.06.00120604
48
- 49 27 Yang Y, Gan Y, Cao J, *et al.* Decreased and dysfunctional circulating endothelial progenitor cells in
50 patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chin Med J (Engl)* 2013;**126**:3222–7.
51
- 52 28 Salter BM, Manzoor F, Beaudin S, *et al.* Dysregulation of Vascular Endothelial Progenitor Cells
53 Lung-Homing in Subjects with COPD. *Can Respir J* 2016;**2016**:1472823.
54 doi:10.1155/2016/1472823
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 29 Caramori G, Rigolin GM, Mazzone F, *et al.* Circulating endothelial stem cells are not decreased in
4 pulmonary emphysema or COPD. *Thorax* 2010;**65**:554–5. doi:10.1136/thx.2009.121640
5
6 30 Brittan M, Hoogenboom MM, Padfield GJ, *et al.* Endothelial progenitor cells in patients with
7 chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013;**305**:L964–969.
8 doi:10.1152/ajplung.00183.2013
9
10 31 Minhajat R, Nilasari D, Bakri S. The Role of Endothelial Progenitor Cell in Cardiovascular Disease
11 Risk Factors. *Acta Medica Indones* 2015;**47**:340–7.
12
13 32 Bartoloni E, Alunno A, Bistoni O, *et al.* Characterization of circulating endothelial microparticles
14 and endothelial progenitor cells in primary Sjögren's syndrome: new markers of chronic
15 endothelial damage? *Rheumatol Oxf Engl* 2015;**54**:536–44. doi:10.1093/rheumatology/keu320
16
17 33 Pirro M, Stingeni L, Vaudo G, *et al.* Systemic inflammation and imbalance between endothelial
18 injury and repair in patients with psoriasis are associated with preclinical atherosclerosis. *Eur J*
19 *Prev Cardiol* 2015;**22**:1027–35. doi:10.1177/2047487314538858
20
21 34 Pirro M, Schillaci G, Paltriccia R, *et al.* Increased ratio of CD31+/CD42- microparticles to
22 endothelial progenitors as a novel marker of atherosclerosis in hypercholesterolemia.
23 *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;**26**:2530–5. doi:10.1161/01.ATV.0000243941.72375.15
24
25 35 Pourhoseingholi MA, Baghestani AR, Vahedi M. How to control confounding effects by statistical
26 analysis. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench* 2012;**5**:79–83.
27
28 36 Lee S-T, Chu K, Jung K-H, *et al.* Circulating CD62E+ microparticles and cardiovascular outcomes.
29 *PLoS One* 2012;**7**:e35713. doi:10.1371/journal.pone.0035713
30
31 37 Han MK, Postma D, Mannino DM, *et al.* Gender and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am*
32 *J Respir Crit Care Med* 2007;**176**:1179–84. doi:10.1164/rccm.200704-553CC
33
34 38 Aryal S, Diaz-Guzman E, Mannino DM. Influence of sex on chronic obstructive pulmonary disease
35 risk and treatment outcomes. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis* 2014;**9**:1145–54.
36 doi:10.2147/COPD.S54476
37
38 39 Voelkel NF, Gomez-Arroyo J, Mizuno S. COPD/emphysema: The vascular story. *Pulm Circ*
39 2011;**1**:320–6. doi:10.4103/2045-8932.87295
40
41 40 Coxson HO, Dirksen A, Edwards LD, *et al.* The presence and progression of emphysema in COPD
42 as determined by CT scanning and biomarker expression: a prospective analysis from the ECLIPSE
43 study. *Lancet Respir Med* 2013;**1**:129–36. doi:10.1016/S2213-2600(13)70006-7
44
45 41 Masuda H, Kalka C, Takahashi T, *et al.* Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and
46 kinetics for physiological postnatal vasculogenesis. *Circ Res* 2007;**101**:598–606.
47 doi:10.1161/CIRCRESAHA.106.144006
48
49 42 Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, *et al.* Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor
50 cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;**24**:1442–7.
51 doi:10.1161/01.ATV.0000135655.52088.c5
52
53
54
55
56
57
58
59
60

FIGURE LEGENDS**Figure 1**

Number of circulating endothelial microparticles (EMPs), progenitor cells (PCs) and the ratio EMPs/PCs in nonsmokers, current smokers, COPD patients. Number of (A) CD31⁺CD42b⁻ EMPs expressed per μ L of poor platelet plasma (PPP), (B) CD34⁺CD133⁺CD45⁺ labelled cells expressed as percent of lymphomonocytes and (C) CD31⁺CD42b⁻ EMPs/ CD34⁺CD133⁺CD45⁺ PCs expressed as the ln. The whiskers extend from the box to the 90th and 10th percentiles. Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks.

Figure 2

Number of circulating endothelial microparticles (EMPs), progenitor cells (PCs) and the ratio EMPs/PCs in nonsmokers, current smokers, ex-smokers with COPD and current smokers with COPD. Number of (A) CD31⁺CD42b⁻ EMPs expressed per μ L of poor platelet plasma (PPP), (B) CD34⁺CD133⁺CD45⁺ labelled cells expressed as percent of lymphomonocytes and (C) CD31⁺CD42b⁻ EMPs/ CD34⁺CD133⁺CD45⁺ PCs expressed as the ln. The whiskers extend from the box to the 90th and 10th percentiles. Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks.

Figure 3

Relationship between the EMPs/PCs ratio and DLCO and FEV₁ in women. Subjects were grouped according to (A) DLCO and (B) FEV₁ above or below the corresponding median value. The box represents the interquartile range and the solid line indicates the median. The whiskers extend from the box to the 90th and 10th percentiles. Ratio values are expressed as ln. Mann-Whitney Rank Sum Test.

1
2
3 **Imbalance between endothelial damage and repair capacity in chronic obstructive pulmonary**
4 **disease**
5
6
7
8
9

10 Jéssica García-Lucio¹, Víctor I. Peinado¹⁻², Lluís de Jover³, Roberto del Pozo¹, Isabel Blanco¹⁻², Cristina
11 Bonjoch¹, Núria Coll-Bonfill¹, Tanja Paul¹⁻², Olga Tura-Ceide¹⁻² * and Joan Albert Barberà^{1-2*}
12
13
14

15
16 * Both authors contributed equally to this work.
17
18

19
20
21 ¹Department of Pulmonary Medicine, Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i
22 Sunyer (IDIBAPS), University of Barcelona; Spain. ²Centro de Investigación Biomédica en Red de
23 Enfermedades Respiratorias (CIBERES); Spain. ³Biostatistics Unit, Department of Public Health, School
24 of Medicine, University of Barcelona; Spain
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

SUPPLEMENTARY MATERIAL**METHODS****Study population**

Sixty-one patients with COPD and 47 control subjects (27 nonsmokers and 20 current smokers) with normal lung functional test were enrolled in the study. Patients were recruited from the outpatient clinic. The study was approved by the internal review board and all subjects gave written informed consent. Patients with left ventricle dysfunction in echocardiography were excluded. Patients were clinically stable at the time of the study without exacerbation episodes or oral steroid treatment for the previous 4 months. All patients were on regular bronchodilator treatment and most of them received inhaled corticosteroids. In control subjects, the absence of lung disease was confirmed by clinical evaluation and lung function tests.

COPD was diagnosed according to current guidelines [1]. All subjects underwent standard evaluation by means of medical history, clinical examination, lung function tests and electrocardiogram. COPD was defined by clinical history compatible and evidence of chronic airflow limitation on spirometry (post-bronchodilator forced expiratory volume in the first second (FEV_1) / forced vital capacity (FVC) < 70%). COPD patients underwent additional diagnostics for the assessment of associated PH; defined on the basis of right heart catheterization (mean pulmonary arterial pressure ≥ 25 mmHg and pulmonary artery occlusion pressure ≤ 15 mmHg) or by Doppler echocardiography (tricuspid regurgitation velocity ≥ 2.8 m/s).

Blood sampling and measurements

Venous blood samples were obtained after fasting overnight peripheral venipuncture into two 4.5mL sodium citrate tubes (Becton Dickinson, Plymouth, UK) to measure circulating EMPs, into two 4mL tubes with EDTA (Becton Dickinson, Plymouth, UK) to measure circulating PCs and into two 4mL tubes with EDTA for other biochemical determinations. The latter were centrifuged immediately

1
2
3 10min (800g, 4°C) and, after centrifugation, plasma was aliquoted and stored at -80°C until analysis.
4
5 Plasma levels of vascular endothelial growth factor (VEGF), interleukin-6 (IL-6), ultra-sensible C-
6
7 reactive protein (hsCRP), transforming growth factor beta (TGF-β), brain natriuretic peptide (BNP),
8
9 fibrinogen, hepatocyte growth factor (HGF), leptine, adiponection, cyclic guanosine monophosphate
10
11 (cGMP), soluble tumor necrosis factor-α receptor type I (sTNFα-RI), soluble intercellular adhesion
12
13 molecule-1 (sICAM-1) and soluble tyrosine kinase receptor Axl (sAXL) were determined by ELISA
14
15 using commercially available kits (DuoSet, R&D Systems, Abingdon, UK).
16
17
18
19

20 *Assessment of circulating endothelial microparticles*

21
22 Circulating EMPs were assessed by flow cytometry by the expression of the platelet endothelium
23
24 adhesion molecule-1 (PECAM-1) marker CD31 in the absence of the platelet-specific glycoprotein Ib
25
26 marker CD42b (Figures S1A-S1B) [2]. To further evaluate whether EMPs were derived from apoptotic
27
28 or activated endothelial cells, EMPs were also assessed by annexin V staining for the presence of
29
30 phosphatidylserine, a marker linked to apoptosis (Figure S1C) [2–4] or assessed by CD62E (E-selectin)
31
32 staining, a cell adhesion molecule expressed only on endothelial cells activated by cytokines (Figure
33
34 S1D) [3,5,6]. Briefly, peripheral blood was collected and within 1 hour was centrifuged 10 minutes
35
36 (800g, 4°C) to prepare platelet rich plasma. Within 5 minutes, the supernatant was subsequently
37
38 centrifuged 10 minutes (300g, 23°C) to discard cells, 10 minutes (2.000g, 23°C) to discard dead cells
39
40 and finally 30 minutes (10.000g, 23°C) to discard cell debris and to obtain platelet-poor plasma (PPP).
41
42 EMP phenotype analysis was performed based on size and fluorescence (Figure S1A). Events less
43
44 than 1 μm were identified in forward (size) and side (density) light scatter plots using size calibration
45
46 microspheres (FluoSpheres®carboxylate-modified microspheres 1.0μm, yellow-green fluorescent
47
48 (505/515), Invitrogen, Oregon, EEUU). MPs levels were assessed by comparison with calibrator beads
49
50 (Perfect Count Microspheres, Cytognos, Salamanca, Spain) with a known concentration, using 2.000
51
52 events beads-PE as a stop time. Then 100.000 MPs/μL for fluorescent minus one (FMO) tubes and
53
54 500.000 MPs/μL for each phenotype were stained 45 minutes at room temperature using pre-
55
56 conjugated anti-human monoclonal antibodies: anti-CD31-FITC (BD Pharmingen™, San Jose, CA),
57
58
59
60

1
2
3 anti-CD42b-PE (BD Pharmingen™, San Jose, CA) and anti-CD62E-APC (BD Pharmingen™, San Jose,
4 CA) for the activated phenotype. For the apoptotic phenotype, MPs without anti-CD62E-APC were
5
6 additionally labeled using annexin V-APC (BD Pharmingen™, San Jose, CA) in the presence of CaCl₂
7
8 (25mM) according to manufacturer's recommendation. The fluorescence minus one technique was
9
10 employed to provide negative controls [7]. Samples were analyzed by two- or three-color
11
12 fluorescence histograms as CD31⁺CD42b⁻ (Figure S1B), CD31⁺CD42b⁻AnnexinV⁺ (Figure S1C) or
13
14 CD31⁺CD42b⁻CD62E⁺ (Figure S1D) microparticles. Single antibody conjugates and compensation
15
16 fluorochrome beads were used for compensation assessment. Samples were acquired at band pass
17
18 filters: 530 nm (FITC), 585 nm (PE/PI), and 661 nm (APC) with FL4 option. EMPs were quantified by
19
20 flow cytometry using LRSFortessa (BD Bioscience, San Jose, CA) and 100.000 MPs/ events were
21
22 acquired. The data were analyzed using FACSDIVA (Tree Star, OR).
23
24
25
26
27
28

29 *Assessment of circulating progenitor cells*

30
31
32 The number of circulating progenitor cells was evaluated by flow cytometry using antibodies against
33
34 CD45 (pan-leukocyte marker), CD133 (sub-population of hematopoietic stem cells) and CD34 (mature
35
36 and progenitor endothelial cells) as previously described [8]. In brief, circulating progenitor cells were
37
38 isolated from fresh peripheral blood by Ficoll density gradient centrifugation, washed once with
39
40 phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 2% of fetal calf serum (FCS) and resuspended at
41
42 2x10⁶ cells for FMO tubes and at 4x10⁶ cells for sample tubes. Circulating PCs were stained and
43
44 analyzed by flow cytometry for phenotypic expression of surface markers using pre-conjugated anti-
45
46 human monoclonal antibodies anti-CD45-FITC (BD Pharmingen™, San Jose, CA), anti-CD34-PECy7
47
48 (eBiosciences, San Diego, CA) and anti-CD133-PE (MACS Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach,
49
50 Germany). The fluorescence minus one technique was employed to provide negative controls [7].
51
52 After 45 minutes of incubation, cells were washed, resuspended into 500 µL of PBS + 2%FCS and
53
54 proceeded to flow cytometry analysis. A total of 750.000 CD45⁺ events were run through the
55
56 LRSFortessa (BD Bioscience, San Jose, CA). The data were analyzed using FACSDIVA (Tree Star, OR)
57
58
59
60

following ISHAGE (International Society of Hematotherapy and Graft Engineering) gating strategy (Figure S2) [9].

RESULTS

Population characteristics

Anthropometric, clinical and functional characteristics of subjects divided by sex are shown in Table S1. Nonsmokers and current smokers were matched for age and BMI in both sexes, however both subsets of COPD patients were older than the respective control groups. All healthy smokers and 23% of men with COPD and 40% of women with COPD were current smokers. Men had higher Framingham risk score compared to women throughout all groups. (Table 1S).

Table S1. Clinical characteristics, lung function, cardiovascular and laboratory measurements by gender

	Nonsmokers (n= 27)		Current smokers (n= 20)		COPD (n= 61)	
	Men (n= 12)	Women (n= 15)	Men (n= 9)	Women (n= 11)	Men (n= 51)	Women (n= 10)
Age, years	57 ± 7	56 ± 9	56 ± 10	53 ± 6	63 ± 7* [§]	62 ± 5 [‡]
BMI, kg/m ²	29 ± 3	25 ± 3*	28 ± 5	26 ± 6	28 ± 4	25 ± 4 [°]
Smoking status						
Current smokers, n (%)	0 (0)	0 (0)	9 (100)*	11 (100) [#]	12 (23)* [§]	4 (40) ^{#‡}
Former-smokers, n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	39 (77) * [§]	6 (60) ^{#‡}
Smoking history, pack-years	0	0	41 ± 30*	21 ± 15 [#]	63 ± 26* [§]	68 ± 39 ^{#‡}
Framingham risk score ‡	9 ± 6	2 ± 2*	13 ± 4	2 ± 2 [§]	12 ± 6	3 ± 2 [°]
Spirometric GOLD stage 1/2/3/4 n (%)	NA	NA	NA	NA	2/13/16/20 4/26/31/39	1/4/2/3 10/40/20/30
FEV ₁ , % predicted	103 ± 11	110 ± 12	100 ± 9	104 ± 12	41 ± 18* [§]	55 ± 21 ^{#‡}
FVC, % predicted	103 ± 8	108 ± 14	103 ± 15	104 ± 10	78 ± 18* [§]	88 ± 24 ^{#‡}
FEV ₁ /FVC	77 ± 4	79 ± 5	75 ± 5	79 ± 4	40 ± 14* [§]	46 ± 11 ^{#‡}
TLC, % predicted	104 ± 8	106 ± 8	105 ± 9	107 ± 9	115 ± 19	120 ± 23
RV, % predicted	104 ± 19	111 ± 18	100 ± 23	118 ± 21	185 ± 57* [§]	180 ± 68 ^{#‡}
DL _{CO} , % predicted	99 ± 15	86 ± 13	89 ± 11	83 ± 6	53 ± 20* [§]	50 ± 16 ^{#‡}
PaO ₂ , mmHg	NA	NA	NA	NA	71 ± 11	66 ± 9
PaCO ₂ , mmHg	NA	NA	NA	NA	44 ± 8	43 ± 6
Systolic blood pressure, mmHg	127 ± 15	121 ± 20	131 ± 16	116 ± 12	132 ± 18	127 ± 26
Diastolic blood pressure, mmHg	79 ± 9	72 ± 8	75 ± 7	71 ± 8	77 ± 11	74 ± 13
Total Cholesterol, mg/dL	204 ± 20	206 ± 31	214 ± 39	221 ± 39	190 ± 32	217 ± 34
HDL, mg/dL	49 ± 12	63 ± 14*	65 ± 18*	71 ± 13	56 ± 17	67 ± 17 [°]
LDL, mg/dL	133 ± 20	126 ± 23	129 ± 38	134 ± 28	111 ± 29*	126 ± 30
Mellitus diabetes, n (%)	0 (0)	1 (7)	0 (0)	0 (0)	7 (14)	0 (0)
Lymphomonocytes, x10 ⁵ events	8.8 ± 1.4	8.7 ± 1.4	8.9 ± 1.1	9.5 ± 3.2	8.3 ± 2.3	8.9 ± 3.3

1
2
3 Data are shown as mean± SD.

4 COPD: chronic obstructive pulmonary disease; BMI: body mass index, GOLD: global initiative for
5 chronic obstructive lung disease, FEV₁: forced expiratory volume in the first second; FVC: forced vital
6 capacity; TLC: total lung capacity; RV: residual volume; DLco: diffusing capacity of the lung for carbon
7 monoxide; PaO₂: arterial partial oxygen pressure; PaCO₂: arterial partial carbon dioxide pressure;
8 HDL: high-density lipoprotein; LDL: low-density lipoprotein and NA: not applicable.
9

10
11 ‡The Framingham risk score can range from -6 to 19, with higher scores indicating greater
12 cardiovascular risk.
13

14 * p<0.05 compared with men nonsmokers

15 § p<0.05 compared with men smokers

16 # p<0.05 compared with women nonsmokers

17 ¥ p<0.05 compared with women smokers

18 ° p<0.05 compared with men COPD
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Reference List

- 1 Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet Lond Engl* 2012;**379**:1341–51. doi:10.1016/S0140-6736(11)60968-9
- 2 Gordon C, Gudi K, Krause A, *et al.* Circulating endothelial microparticles as a measure of early lung destruction in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;**184**:224–32. doi:10.1164/rccm.201012-2061OC
- 3 Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, *et al.* Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res* 2003;**109**:175–80.
- 4 Werner N, Wassmann S, Ahlers P, *et al.* Circulating CD31+/annexin V+ apoptotic microparticles correlate with coronary endothelial function in patients with coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;**26**:112–6. doi:10.1161/01.ATV.0000191634.13057.15
- 5 Lee S-T, Chu K, Jung K-H, *et al.* Circulating CD62E+ Microparticles and Cardiovascular Outcomes. *PLoS ONE* 2012;**7**. doi:10.1371/journal.pone.0035713
- 6 Rautou P-E, Vion A-C, Amabile N, *et al.* Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res* 2011;**109**:593–606. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.233163
- 7 Feher K, Kirsch J, Radbruch A, *et al.* Cell population identification using fluorescence-minus-one controls with a one-class classifying algorithm. *Bioinforma Oxf Engl* 2014;**30**:3372–8. doi:10.1093/bioinformatics/btu575
- 8 Pizarro S, García-Lucio J, Peinado VI, *et al.* Circulating progenitor cells and vascular dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One* 2014;**9**:e106163. doi:10.1371/journal.pone.0106163
- 9 Schmidt-Lucke C, Fichtlscherer S, Aicher A, *et al.* Quantification of circulating endothelial progenitor cells using the modified ISHAGE protocol. *PLoS One* 2010;**5**:e13790. doi:10.1371/journal.pone.0013790

FIGURE LEGENDS**Figure S1**

Gating strategy for endothelial microparticles (EMPs). A) MPs analysis based on size and fluorescence; B) Sample analyzed by two-color fluorescence histograms as CD31⁺CD42b⁻ (total EMPs); C) Sample analyzed by three-color fluorescence histograms as CD31⁺CD42b⁻Annexin V⁺ (apoptotic EMPs) and D) Sample analyzed by three-color fluorescence histograms as CD31⁺CD42b⁻CD62E⁺ (activated EMPs).

Figure S2

Gating strategy for progenitor cells (PCs). A) Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) selection based on forward and side; B) Singlet selection with no aggregates; C) Sample analyzed by two-color fluorescence histograms as CD34⁺CD45⁺ cells and D) Sample analyzed by three-color fluorescence histograms as CD34⁺CD45⁺CD133⁺ cells.

Figure S3

Number of circulating endothelial microparticles (EMPs), progenitor cells (PCs) and the ratio EMPs/PCs in nonsmokers, current smokers and COPD patients. Number of (A) CD31⁺CD42b⁻Annexin V⁺ and (B) CD31⁺CD42b⁻CD62E⁺ EMPs expressed per μ L of poor platelet plasma (PPP). Number of CD34⁺CD133⁺CD45⁺ labelled cells expressed as percent of lymphomonocytes (C) in women and (D) in men. Number of CD31⁺CD42b⁻ EMPs/ CD34⁺CD133⁺CD45⁺ PCs expressed as the ln (E) in women and (F) in men. The whiskers extend from the box to the 90th and 10th percentiles. Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks.

Figure S4

Number of circulating endothelial microparticles (EMPs), progenitor cells (PCs) and the ratio EMPs/PCs in nonsmokers, current smokers, ex-smokers with COPD and current smokers with

1
2
3 **COPD.** Number of (A) CD31⁺CD42b⁻Annexin V⁺ and (B) CD31⁺CD42b⁻CD62E⁺ EMPs expressed per μ L of
4 poor platelet plasma (PPP). Number of CD34⁺CD133⁺CD45⁺ labelled cells expressed as percent of
5 lymphomonocytes (C) in women and (D) in men. Number of CD31⁺CD42b⁻ EMPs/ CD34⁺CD133⁺CD45⁺
6 PCs expressed as the ln (E) in women and (F) in men. The whiskers extend from the box to the 90th
7 and 10th percentiles. Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks.
8
9
10
11
12
13
14
15
16

17 **Figure 5**

18 **Correlation between circulating endothelial microparticles (EMPs) and progenitor cells (PCs).**

19 Correlation between EMPs and PCs (A) in the whole population, (B) in women and (C) in men.
20
21

22 Spearman Rank Order Correlation test. White squares represent nonsmokers, grey triangles
23 represent smokers and black dots represent COPD patients.
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 1

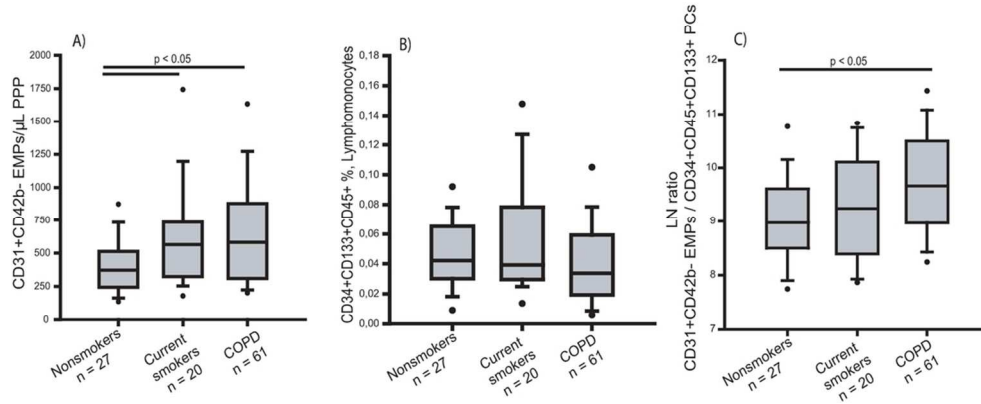


Figure 1
Number of circulating endothelial microparticles (EMPs), progenitor cells (PCs) and the ratio EMPs/PCs in nonsmokers, current smokers, COPD patients.

98x47mm (300 x 300 DPI)

Figure 2

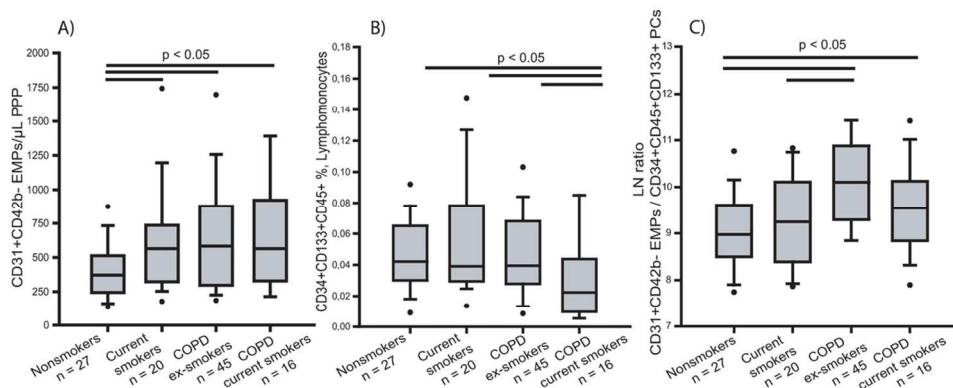


Figure 2

Number of circulating endothelial microparticles (EMPs), progenitor cells (PCs) and the ratio EMPs/PCs in nonsmokers, current smokers, ex-smokers with COPD and current smokers with COPD.

108x54mm (300 x 300 DPI)

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure 3

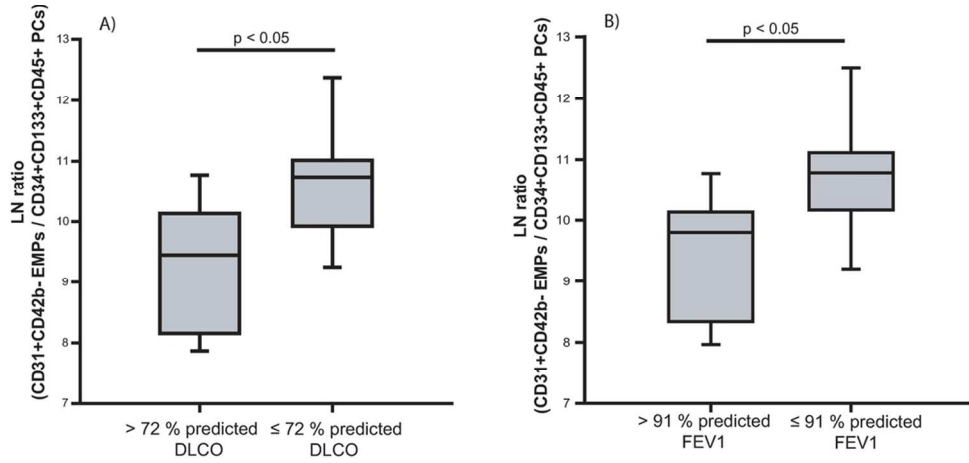


Figure 3
Relationship between the EMPs/PCs ratio and DLCO and FEV1 in women.

100x55mm (300 x 300 DPI)

Figure S1

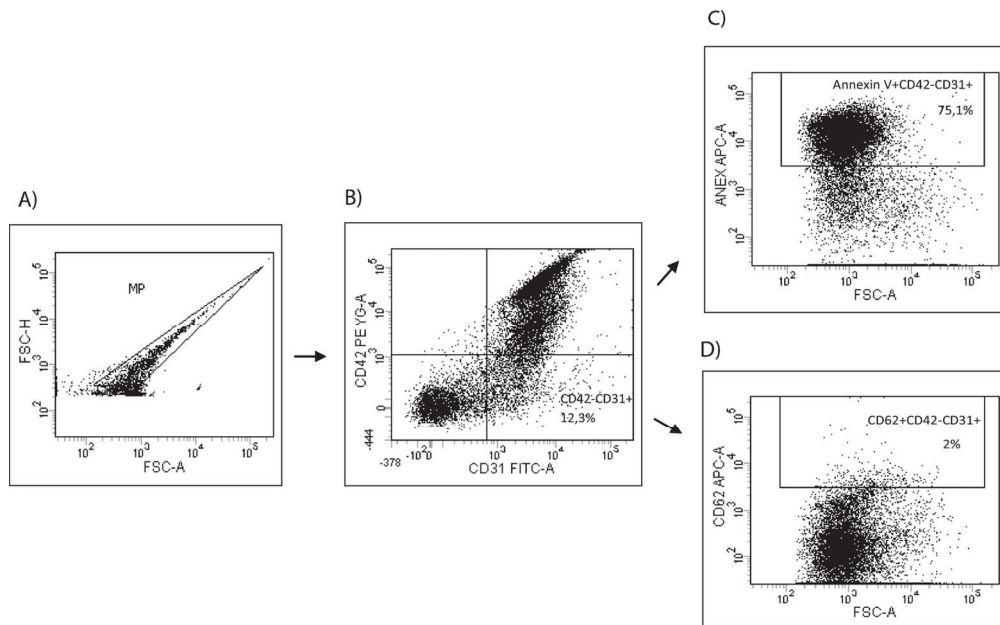


Figure S1
Gating strategy for endothelial microparticles (EMPs).

134x95mm (300 x 300 DPI)

Review Only

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Figure S2

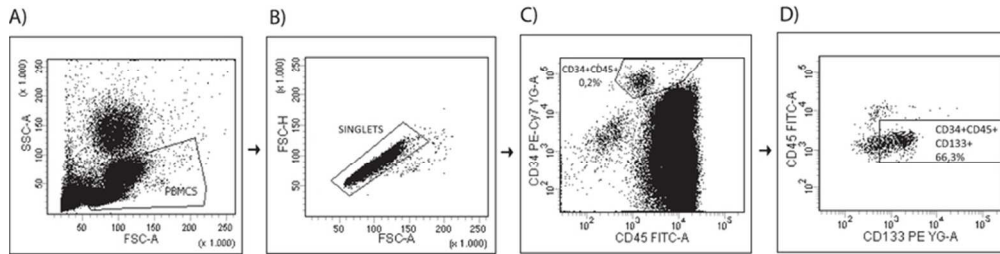


Figure S2
Gating strategy for progenitor cells (PCs).

74x27mm (300 x 300 DPI)

Figure S3

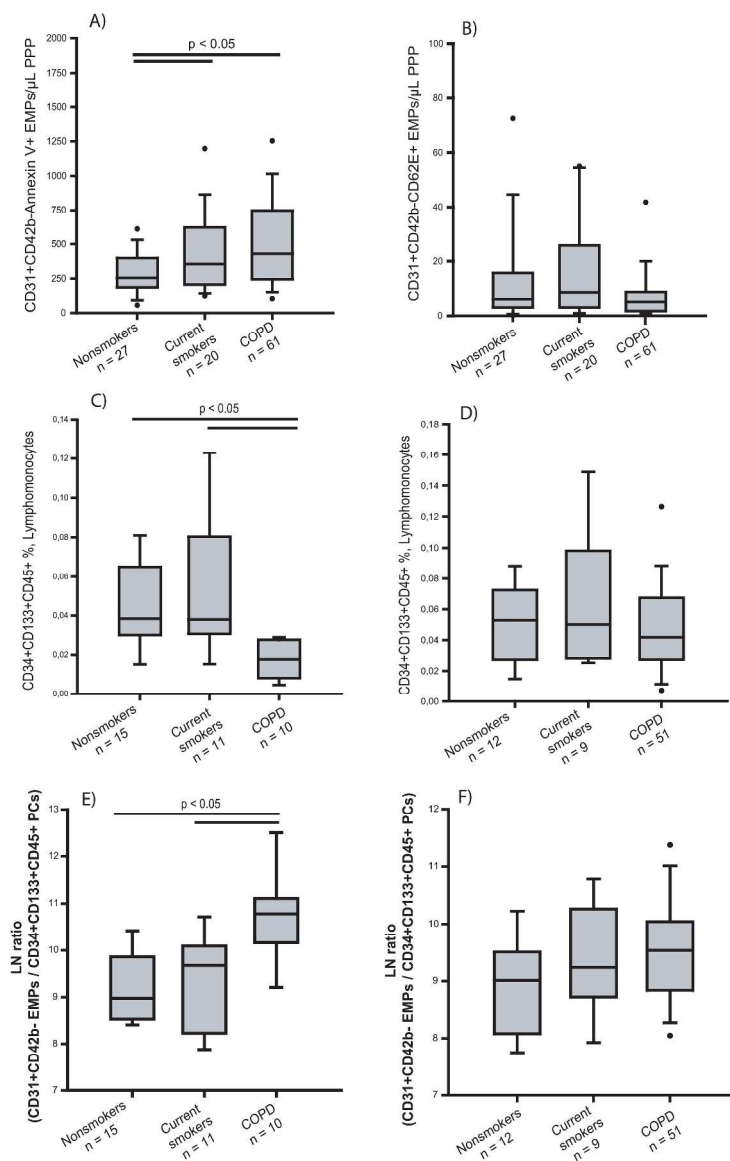


Figure S3
 Number of circulating endothelial microparticles (EMPs), progenitor cells (PCs) and the ratio EMPs/PCs in nonsmokers, current smokers and COPD patients.

262x386mm (300 x 300 DPI)



Figure S4

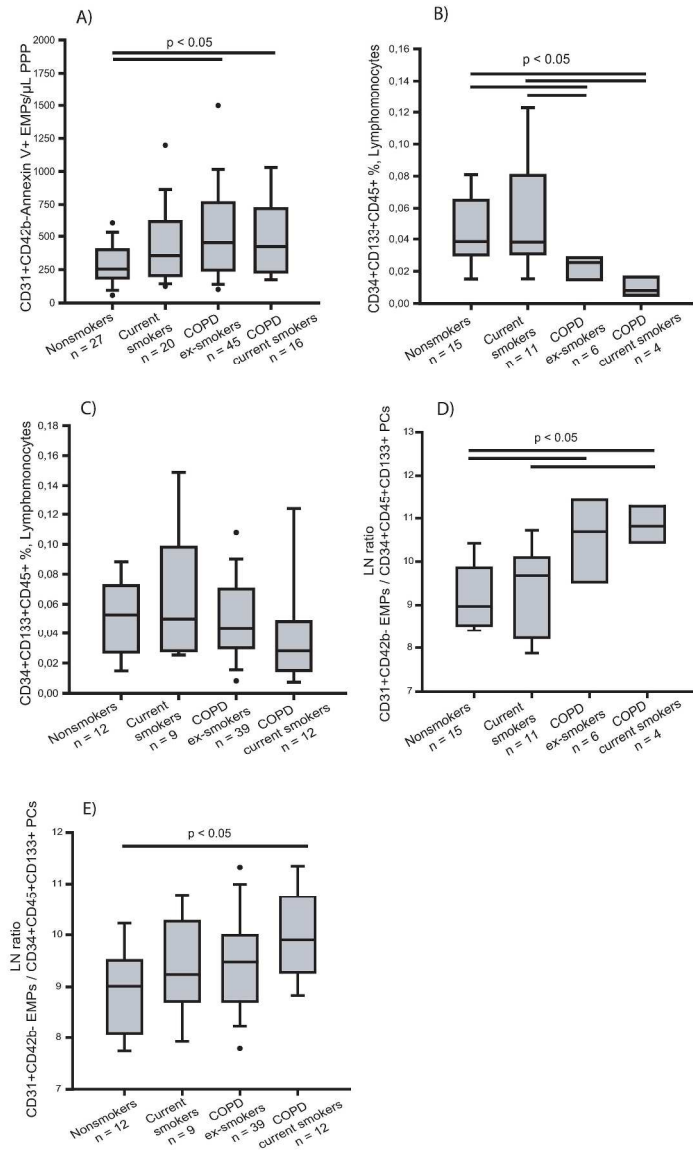


Figure S4
 Number of circulating endothelial microparticles (EMPs), progenitor cells (PCs) and the ratio EMPs/PCs in nonsmokers, current smokers, ex-smokers with COPD and current smokers with COPD.

268x414mm (300 x 300 DPI)



Figure S5

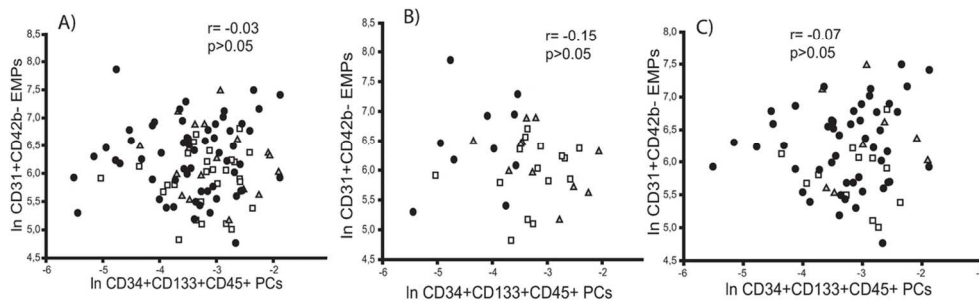


Figure 5
Correlation between circulating endothelial microparticles (EMPs) and progenitor cells (PCs).

106x55mm (300 x 300 DPI)

For Review Only

DISCUSSIÓ

Durant molt de temps, les alteracions a la via aèria han sigut el component més estudiat de la MPOC. Amb el temps, s'ha vist que les alteracions a la vasculatura pulmonar també representen un component clau en aquesta malaltia i que tenien certa similitud amb els canvis que es produeixen en malalties pròpies de la circulació pulmonar com és la hipertensió arterial pulmonar. Nombrosos estudis han evidenciat el remodelat vascular pulmonar i la disfunció endotelial com les principals alteracions vasculares que pateixen els malalts amb MPOC i HP^{16,21,65,179,180}. En aquest sentit, estudis previs del nostre grup s'han centrat en investigar els mecanismes implicats en ambdós processos. Per una banda, hem descrit el paper que juga el factor de transcripció *Slug* en la modulació fenotípica de les CMLs⁴³, així com l'avaluació de possibles dianes terapèutiques per inhibir la proliferació desmesurada de les CMLs durant el remodelat vascular pulmonar mitjançant l'ús d'inhibidors de les fosfodiesterases¹⁸¹ o estimuladors de la guanilat ciclasa soluble¹⁸². Per altra banda, també hem descrit la presència de dany endotelial, tant en la circulació sistèmica com pulmonar^{60,65,66}, dels malalts amb MPOC.

Relació de l'ANGPT-2 amb el remodelat vascular

L'interacció coordinada de diversos factors de creixement i els seus receptors tenen un paper clau en la regulació dels processos que tenen lloc durant el remodelat vascular; com canvis moleculars i cel·lulars (proliferació, migració i apoptosi) i canvis en la síntesi i degradació de la matriu extracel·lular¹⁶. És per aquest motiu que el primer treball d'aquesta Tesi Doctoral es va centrar en descriure el perfil d'expressió gènica de factors de creixement i els seus receptors en artèries pulmonars de pacients candidats a lobectomia pulmonar i estudiar quina relació guardaven amb el remodelat vascular. Els resultats obtinguts mostren que, dels 46 gens estudiats, l'ANGPT-2 és l'únic que mostra canvis significatius. Concretament, les artèries pulmonars més remodelades són les que presenten una major expressió, tant gènica com protèica, d'ANGPT-2. És a dir, els nivells d'ANGPT-2 correlacionen amb l'engruïment de l'íntima i, per tant, amb el remodelat vascular.

Aquests resultats concorden amb el que està descrit fins ara a la literatura. En 1997, Maisonpierre *et al.*, van ser un dels primers en descriure que la sobreexpressió transgènica d'ANGPT-2 en ratolins estava relacionada amb el remodelat vascular³⁹. En

Discussió

aquesta línia, Tabruyin *et al.*, també van trobar nivells incrementats d'ANGPT-2 associats a remodelat vascular en les vies aèries de ratolins infectats amb *Mycoplasma pulmoniae*¹⁸³. Altres estudis *in vivo* també han trobat nivells incrementats d'ANGPT-2 en pulmons de xais de 3 dies amb malaltia cardíaca congènita¹⁸⁴, en rates amb HAP induïda per monocrotalina¹⁸⁵ i en un model porquí amb un elevat flux sanguini pulmonar¹⁸⁶.

Paper de l'ANGPT-2 en la desestabilització de l'endoteli

El paper que pot jugar l'increment dels nivells d'ANGPT-2 en les artèries remodelades d'aquests subjectes no es coneix amb exactitud. Però es creu que l'increment d'ANGPT-2 produeix tota una sèrie de senyals que afavoreixen la pèrdua de l'estructura dels vasos, reduïnt els contactes cel·lulars amb la matriu extracel·lular així com els contactes de les CEs amb els pericits. Aquesta pèrdua d'estabilitat fa que les CEs siguin més accessibles i sensibles a diferents estímuls^{36,187,188}. Estudis previs del nostre grup van posar de manifest aquesta inestabilitat endotelial i engruïment de la capa íntima de les artèries pulmonars de malalts amb MPOC^{21,24}.

De totes maneres, segons els resultats obtinguts en l'anàlisi discriminant, la major part de la classificació de les artèries pulmonars segons el grau de remodelat ve determinada per 10 factors. Aquestes dades indiquen que, tot i que l'ANGPT-2 està relacionada de manera individual amb el remodelat vascular i té una gran importància, la combinació amb diferents factors pot ser de més rellevància fisiològica. Corroborant així que les senyals de desestabilització vascular produïdes per l'ANGPT-2 requereixen de la posterior intervenció de diferents factors i estímuls per poder contribuir de manera conjunta al procés de remodelat vascular.

El que sí que es coneix amb detall és que l'expressió d'ANGPT-2 s'indueix sota certs estímuls com hipòxia, inflamació, estrès mecànic i VEGF, entre d'altres¹⁸⁹⁻¹⁹². Aquestes condicions representen un entorn cel·lular que encaixa perfectament amb un context de MPOC i HP¹⁹³. En aquest sentit, nivells incrementats d'ANGPT-2 s'han descrit en condicions que estan associades amb inflamació; com per exemple artritis^{194,195} o sepsis¹⁹⁶⁻¹⁹⁸. Estudis en ratolins amb peritonitis deficientes en ANGPT-2 mostren una reducció del reclutament de leucòcits¹⁸⁸. Aquesta sensibilització de les CEs als estímuls inflamatoris és revertida per ANGPT-1. Aquestes dades concorden

amb els resultats obtinguts en el nostre anàlisi de regressió lineal múltiple, el qual, mostra una relació entre ANGPT-2, VEGF i TEK que és suggestiva d'aquest escenari. És a dir, l'augment d'expressió d'ANGPT-2 es porta a terme junt amb una reducció de l'expressió de VEGF i TEK, suggerint una possible inhibició d'ANGPT-1. Aquests resultats concorden amb diferents tipus de càncer, on diversos estudis han evidenciat que un ratio elevat d'ANGPT-2/ANGPT-1 correlaciona amb una pitjor prognòstic^{199–202}.

Contribució de les MMPs i la β -catenina a la inestabilitat endotelial i el remodelat vascular

Les MMPs també contribueixen a la inestabilitat vascular produïda per l'ANGPT-2, ja que estan implicades en l'alliberació de factors de creixement i citoquines contingudes a la matriu extracel·lular i també afavoreixen la desestabilització de les adhesions cel·lulars, facilitant així el contacte de les cèl·lules del vas als diferents tipus de factors de creixement i citocines alliberades²⁰³. En aquest sentit, l'anàlisi de xarxes va mostrar una correlació positiva entre la MMP-2 i l'engruiximent de l'íntima, posant de manifest la seva implicació en el procés de remodelat vascular. A més a més, els resultats obtinguts en l'anàlisi de regressió lineal múltiple recolzen aquestes troballes. Aquestes dades concorden amb altres estudis on s'observen nivells incrementats de MMPs en pacients hipertensos amb engruiximent de la paret arterial^{58,204}, així com en fumadors²⁰⁵ i en macròfags alveolars, probablement relacionat amb el remodelat vascular pulmonar en el context de la síndrome de distrés respiratori agut²⁰⁶.

Els nostres resultats també van posar de manifest l'importància de la β -catenina en el remodelat vascular. De fet, en l'anàlisi de regressió lineal múltiple el gen que codifica la β -catenina, *CTNNB*, és el factor amb més pes a l'equació. Però a més a més, també hem vist que és un node important en l'anàlisi de xarxes, connectant amb diferents factors de creixement que regulen la proliferació cel·lular. En aquesta línia, diversos estudis han evidenciat el rol patològic de les vies de senyalització de la β -catenina en processos de remodelat vascular així com la seva implicació en l'augment de la proliferació cel·lular^{207,208}. Aquestes dades suggerixen un possible paper de la senyalització de la β -catenina en la proliferació de les CMLs, la qual cosa encaixa en un context de remodelat vascular.

Discussió

Relació de l'ANGPT-2 amb el tabac i la hipertensió pulmonar

Estudis previs del nostre grup van associar el tabac amb un major grau de remodelat vascular²¹. Per aquesta raó vam voler estudiar si el tabac també tenia relació amb l'ANGPT-2 i vam veure que els malalts amb MPOC fumadors mostraven nivells plasmàtics d'ANGPT-2 incrementats respecte els malalts amb MPOC que havien deixat de fumar. A més a més, els nivells d'ANGPT-2 correlacionaven amb la quantitat de tabac fumada. Per tant, aquestes dades concorden amb l'estudi previ publicat i evidència una relació interessant entre tabac-ANGPT2-remodelat vascular. La causa d'aquest increment d'ANGPT-2 podria ser un major estrés oxidatiu degut al consum de tabac. De fet, s'ha vist que els nivells d'espècies reactives d'oxigen (ROS) són un factor important implicat en la regulació dels factors proangiogènics en pacients amb MPOC²⁰⁹. Curiosament, s'ha descrit que nivells elevats de ROS en el múscul esquelètic de malalts amb MPOC estan relacionats amb un increment de l'expressió d'ANGPT-2²⁰⁹.

Donat l'increment d'ANGPT-2 observat en les artèries pulmonars més remodelades, vam evaluar els nivells plasmàtics d'ANGPT-2 en aquells malalts amb HP associada a la MPOC, ja que la HP és una malaltia associada a un engruiximent de la paret arterial pulmonar. Els resultats van quadrar amb la nostra hipòtesi; els malalts amb HP tenien nivells incrementats d'ANGPT-2. Per tant, aquestes dades reforcen una vegada més la relació entre ANGPT-2 i remodelat vascular.

ANGPT-2 com a diana terapèutica?

Encara que és possible que l'ANGPT-2 moduli l'angiogènesi actuant directament sobre els receptors TEK de les CEs, podria ser que l'ANGPT-2 també reguli l'angiogènesi mitjançant l'alliberació d'altres factors angiogènics de la paret vascular. Estudis futurs són necessaris per poder identificar els mecanismes moleculars exactes a través dels quals l'ANGPT-2 regula l'angiogènesi i el remodelat vascular en les artèries pulmonars de malalts amb MPOC. La inhibició d'ANGPT-2 podria ser una opció terapèutica interessant per poder evitar angiogènesi aberrants i l'inici i/o la progressió del remodelat vascular. Estudis preclínic han demostrat cert èxit utilitzant anticossos monoclonals contra l'ANGPT-2²¹⁰. D'altres estudis han obtingut pèptids, que són àcids nuclèics de cadena senzilla i longitud curta que, segons les condicions en les que

es troben, adopten estructures tridimensionals definides que permeten unir-se de manera estable i específica a les seves dianes^{211,212}. Una altra aproximació terapèutica consisteix en l'ús de RNAs d'interferència (siRNAs) continguts en nanopartícules²¹³. Però tal i com hem comentat anteriorment, l'ANGPT-2 treballa conjuntament amb el VEGF. Les CEs d'un vas inestable per la falta de pericits que les envoltin tenen dos possibles destins: o moren en absència de VEGF, o migren i proliferen en presència de VEGF²¹⁴. És per aquest motiu que un dels tractaments anti-angiogènics més populars al món té com a diana el VEGF²¹⁵.

Necessitat de biomarcadors a la MPOC i la HP

A part del remodelat vascular, la disfunció endotelial també és una alteració vascular que juga un paper important en el desenvolupament i progressió de la MPOC i la HP⁵⁹⁻⁶¹. No obstant això, tant el diagnòstic d'ambdues malalties com la resposta al tractament no avaluen directament l'estat de l'endoteli. És per aquesta raó que en els últims anys s'ha estat treballant en la cerca de biomarcadors que puguin reflectir d'una manera directa i no invasiva l'estat endotelial. En aquest sentit, els nivells circulants de cèl·lules progenitores endotelials (CPEs) i micropartícules endotelials (EMPs) han sigut un d'aquests possibles biomarcadors que més interès ha suscitat.

Cèl·lules progenitores a la HP

Estudis previs sobre els nivells circulants de CPEs a la HP han mostrat resultats discrepants. Mentre que alguns investigadors han trobat nivells disminuïts de CPEs^{106,118-120}, altres han trobat nivells incrementats^{23,114-117} o fins i tot diferències no significatives¹²¹, comparat amb els controls. L'origen d'aquestes diferències no estan clares, però poden ser degudes als criteris d'exclusió/inclusió dels pacients, del tractament que reben, tipus de HP i severitat de la malaltia, així com al tipus de marcador per detectar les CPEs.

El segon treball d'aquesta Tesi Doctoral descriu els nivells circulants de CPs (definides com cèl·lules CD45⁺CD34⁺ i CD45⁺CD34⁺CD133⁺) en malalts amb hipertensió arterial pulmonar (HAP) i hipertensió tromboembòlica crònica (HPTEC) sense tractament previ. Així com evaluar l'efecte de la teràpia específica de la HAP sobre els nivells circulants de les CPs. Els resultats obtinguts mostren que els pacients amb HAP

Discussió

sense tractament previ presenten nivells més baixos de CPs comparat amb els controls, mentre que els nivells de CPs en pacients amb HPTEC sense tractament no difereixen ni dels controls ni dels malalts amb HAP.

Donat que en el nostre estudi els malalts són de nou diagnòstic i, per tant, no rebien tractament específic previ per la HAP, suggerim que els nivells baixos de CPs trobats a la HAP estan associats a la pròpia malaltia. Diversos estudis han evidenciat que nivells reduïts de CPs correlacionen amb un pitjor prognosi en diferents alteracions cardiovasculars^{98,99,216}, per tant, aquesta reducció dels nivells circulants de CPs pot contribuir a la progressió de la HAP. Els mecanismes implicats en la reducció dels nivells circulants de CPs no estan del tot clars. Però es creu que pot ser conseqüència o bé d'un esgotament de CPs derivades del moll de l'os²¹⁷, o bé d'un augment del reclutament d'aquestes CPs als vasos danyats^{23,116}, o la combinació dels dos factors.

Cal destacar que, en el nostre estudi els malalts amb HPTEC, tot i tenir una pitjor hemodinàmica comparat amb els malalts amb HAP, no tenen nivells reduïts de CPs comparat amb els controls i els malalts amb HAP. Aquestes dades suggereixen que l'augment de la pressió pulmonar no sembla ser un factor clau en la reducció de la mobilització de CPs per part del moll de l'os i/o el reclutament de CPs en els teixits danyats i que, per tant, altres mecanismes estan implicats.

Efecte de la teràpia específica de la HAP sobre els nivells de CPs

El nostre estudi demostra que després d'un període de 6 a 12 mesos amb teràpia específica per la HAP, els nivells de CPs dels malalts amb HAP augmenten de manera significativa comparat amb els nivells basals, assolint nivells similars als dels controls. En aquesta línia, estudis previs han demostrat que el tractament amb inhibidors de la fosfodiesterasa 5 incrementen els nivells circulants de CPs^{118,218}. Per tant, podem especular que en els malalts amb HAP la restauració del desequilibri entre mediadors endotelials està associat a una menor mobilització i/o reclutament de les CPs als vasos danyats i, conseqüentment, amb un increment dels nivells circulants de CPs.

Per la seva banda, els nivells de CPs en els malalts amb HPTEC no es veuen alterats amb el tractament. Però la manca de diferències en els nivells basals respecte

als controls i als malalts amb HAP ja suggereix que tot i que la HAP i la HPTEC comparteixen característiques, com la disfunció endotelial, el paper de les CPs és diferent en ambdues malalties i, per tant, estudis futurs són necessaris per estudiar en detall la relació de les CPEs amb els diferents tipus d'hipertensió pulmonar.

Relació de les CPs amb paràmetres clínics i hemodinàmics de la HP

Els nostres resultats posen de manifest que els malalts amb HP que caminen menys a la prova de marxa de 6 minuts (6MWT) presenten nivells més baixos de CPs. Per tant, la combinació d'ambdós fets podria contribuir a una possible mobilització insuficient de CPs per part del moll de l'os o a una regeneració de l'endoteli deteriorada. En aquesta línia, mentre que Zhu JunHui *et al.*, van trobar la mateixa relació que en el nostre estudi entre la prova de 6MWT i els nivells de CPs, però utilitzant tota la població (malalts i controls)¹¹⁹, l'estudi de Diller *et al.*, no va trobar relació entre la tolerància a l'esforç i els nivells de CPs¹¹⁸. De totes maneres, s'ha vist que l'infusió intravenosa de cèl·lules autòlogues en malalts amb HAP idiopàtica està associada a una millora en la tolerància a l'esforç²¹⁹. Per tant, d'alguna manera aquestes dades suggereixen que un increment dels nivells circulants de CPs podrien ser beneficiosos i millorar la gravetat de la malaltia. De totes maneres, cal recordar el possible paper dual de les CPs, ja que per una banda poden participar en la reparació vascular^{79,220,221} però també s'ha vist que poden contribuir al remodelat vascular^{24,96}. Per tant, més estudis en aquest sentit són necessaris per tal d'avaluar la seguretat d'aquestes cèl·lules.

A part d'aquesta associació, no es va poder establir cap altra relació entre els nivells circulants de CPs i els paràmetres clínics i hemodinàmics de la HP. Això pot ser degut a que els canvis clínics trobats estan més lligats a canvis en la funció cardíaca, mentre que els canvis en els nivells circulants de les CPs estan més lligats a la microcirculació.

Cèl·lules progenitores, micropartícules endotelials i ratio EMPs/CPs a la MPOC

En els últims anys, la major part dels estudis han evaluat de manera individual el dany endotelial (nivells d'EMPs) o la capacitat de reparació vascular (nivells de CPEs)^{60,110,172,174}. En el tercer treball d'aquesta Tesi Doctoral, a part d'avaluar de manera individual aquests marcadors, hem volgut descriure per primera vegada en la

Discussió

MPOC, la combinació d'ambdós paràmetres per tal d'avaluar l'estat de competència vascular d'aquests pacients. A més a més, també hem avaluat el possible efecte del tabac i la presència de la HP associada a la MPOC sobre els nivells circulants d'aquests marcadors. Els nostres resultats mostren que els malalts amb MPOC tenen major risc cardiovascular, reflexat per un alt *Framingham risk score* comparat amb els controls. Donat que el *Framingham risk score* recopila informació sobre gènere, edat, valors de pressió sistòlica, colesterol, HDL i tabac; i aquests són factors que poden influenciar tant en la progressió de la malaltia com en els nivells circulants d'EMPs i CPs^{104,171,222,223}, vam utilitzar dos mètodes estadístics tenint en compte o no aquestes variables confusores.

A l'igual que amb els nivells de CPEs en la HP, en la MPOC també hi han resultats discrepants en quant als nivells circulants de CPEs^{93,100,106-112}. Recentment el nostre grup ha publicat nivells circulants baixos de CPs en malalts amb MPOC comparat amb els controls⁶⁰. El valor afegit del present estudi és que a diferència d'estudis previs en els que les dades no han sigut corregides per gènere, edat o risc cardiovascular^{107,109,110}, l'anàlisi de covariàncies que vam realitzar va posar de manifest l'efecte del gènere sobre els nivells circulants de CPs. Els resultats de l'anàlisi ajustat mostren que els nivells de CPs estan reduïts en malalts amb MPOC, tant en dones com en homes. Però, considerem rellevant que, les dones presenten nivells de CPs més baixos que els homes en tots els grups. Aquest fet podria ser degut a que en les dones els nivells de CPs estan associats al recanvi fisiològic vascular de l'endometri²²⁴, per tant, l'estat hormonal de les dones fa que els seus nivells de CPs fluctuïn durant la seva vida, disminuint de manera dràstica després de la menopausa²²⁴. De fet, diversos estudis han evidenciat que una menopausa prematura degut a causes naturals o quirúrgiques està associada a un augment del risc cardiovascular comparat amb una menopausa que arriba al voltant dels 50 anys, suggerint l'efecte protector dels nivells d'estrògens acumulats durant la vida de la dona^{225,226}. Aquest efecte protector dels estrògens sobre el sistema cardiovascular es creu que es du a terme possiblement a través de la regulació de la funció endotelial, mitjançant l'alliberació d'òxid nítric²²⁷. De fet, diversos estudis han demostrat l'efecte vasodilatador dels estrògens^{228,229}. En aquest sentit i, tal com s'ha comentat anteriorment, s'ha vist que el tractament amb

inhibidors de la fosfodiesterasa 5 incrementen els nivells circulants de CPs^{118,218}, fent palès l'existència d'una relació entre els nivells circulants de CPs, funció endotelial i estrògens. En el nostre estudi, totes les dones eren majors de 45 anys, és a dir, en el rang d'edat de la menopausa. Per tant, aquesta podria ser la causa dels nivells de CPs reduïts comparat amb als homes. De fet, aquesta reducció és encara més evident en el grup de malalts amb MPOC. Donat que s'ha vist que els nivells baixos de CPs estan associats a un major risc d'events cardiovasculars²³⁰, podria ser que les dones, amb una reducció de la capacitat reparativa vascular, siguin més susceptibles a desenvolupar complicacions vasculars associades a la MPOC.

En el nostre estudi, els malalts amb MPOC tenen nivells d'EMPs (totals i apoptòtiques) incrementats respecte els controls, reproduint els resultats prèviament publicats^{172,173,175}. Aquest increment es manté després de corregir les dades per les variables confusores, suggerint que l'augment d'EMPs circulants és degut a la pròpia malaltia més que a altres factors de risc cardiovascular. Aquest dany endotelial en els vasos dels malalts amb MPOC es pot produir tant a la vasculatura pulmonar com sistèmica. Tot i que en el nostre estudi no hem avaluat de manera específica l'origen pulmonar de les EMPs, diversos estudis suggereixen que l'augment dels nivells d'EMPs circulants a la MPOC majoritàriament provenen de la vasculatura pulmonar^{157,173}.

Donat que els nivells d'EMPs no estan relacionats amb cap índex de severitat de la MPOC, sembla que aquest dany endotelial està més relacionat a l'inici de la MPOC més que a la seva progressió.

Tot i que els nivells de CPs i EMPs no correlacionen entre si, suggerint que estan reflectint processos fisiològics diferents però complementaris, la seva avaluació conjunta pot caracteritzar un fenotip de competència vascular, ja que en un mateix subjecte s'estudien marcadors de dany endotelial (EMPs) i reparació vascular (CPs)^{73,231}. Els resultats obtinguts mostren un deteriorament de la competència vascular en els malalts amb MPOC, és a dir, un desequilibri entre el dany endotelial i la capacitat de reparació de l'endoteli reflexat per un alt ratio EMPs/PCs comparat amb els controls, mentre que els fumadors es mantenen en una posició intermitja entre els controls i els malalts amb MPOC. Donat que el balanç entre el dany endotelial i la capacitat de reparació vascular és crític pel manteniment de la homeòstasi vascular, l'augment dels nivells d'EMPs junt amb la reducció dels nivells de CPs circulants poden

Discussió

jugar un paper sinèrgic en la progressió de la malaltia. Resultats similars han estat descrits en altres malalties com psoriasi, aterosclerosi, diabetes tipus II o polimialgia reumàtica^{72,232-234}. En el subanàlisi per gènere, l'increment del ratio EMPs/CPs en dones està associat a una pitjor funció pulmonar, és a dir, aquelles dones amb ratio més elevat són aquelles que presenten valors més baixos de DL_{CO} i FEV₁. En aquest sentit, estudis recents suggereixen diferències en els malalts amb MPOC degudes al gènere, les dones desenvolupen la malaltia de forma més greu i amb menys quantitat d'exposició a fum de tabac que els homes²³⁵. Per contra, els malalts amb MPOC i HP associada no van mostrar un augment del ratio EMPs/PCs suggerint que altres factors estan implicats en el desenvolupament de la HP.

Efecte del tabac en els nivells de cèl·lules progenitores, micropartícules endotelials i la relació EMPs/CPs a la MPOC

La falta d'estudis que ajustin els controls i els malalts amb MPOC segons la carga tabàquica fa que no es puguin extreure conclusions robustes sobre si la MPOC està associada a una reducció de CPs circulants o si aquesta reducció es deu als efectes del tabac^{100,101}. En canvi, diferents estudis descriuen que fumar incrementa els nivells d'EMPs circulants^{102,104,150,157,171}. Els nostres resultats mostren nivells de CPs circulants similars entre els controls i els fumadors, reproduint els resultats prèviament obtinguts⁶⁰. Per la seva banda, els nivells d'EMPs si que estan incrementats en els fumadors respecte els controls, tot i que en el model ajustat, es perd la significància. Per tant, aquestes dades suggereixen que el tabac *per se* és suficient per produir dany vascular, però que altres factors de risc cardiovasculars estan associats al recompte d'EMPs.

En els malalts amb MPOC, tant la disminució dels nivells de CPs com l'augment d'EMPs totals i d'origen apoptòtic és independent del tabac. De la mateixa manera, el ratio EMPs/PCs es troba incrementat en els malalts amb MPOC independentment del tabac. Per tant, aquesta incompetència vascular dels malalts amb MPOC sembla ser una conseqüència de la pròpia malaltia més que un efecte directe del consum de tabac.

CONCLUSIONS

A partir dels resultats obtinguts en els estudis efectuats, les conclusions de la present Tesi Doctoral són:

1.- El remodelat vascular pulmonar està associat a un increment de l'expressió d'ANGPT-2. Aquest increment, junt amb altres factors, com VEGF, CTNNB-1 i MMP-2 contribueixen a la inestabilitat endotelial i podrien explicar les alteracions estructurals (remodelat) de la paret de les artèries musculars pulmonars.

2.- Els nivells plasmàtics d'ANGPT-2 estan associats amb el consum de tabac i en els pacients amb MPOC a la presència d'hipertensió pulmonar.

3.- Els malalts amb HAP de nou diagnòstic, però no els malalts amb HPTEC, presenten nivells reduïts de cèl·lules progenitores comparat amb els subjectes control. Aquesta reducció de cèl·lules progenitores és deguda a la pròpia malaltia.

4.- Amb el tractament específic, els malalts amb HAP, però no els malalts amb HPTEC, presenten un increment dels nivells circulants de cèl·lules progenitores, assolint nivells similars als dels controls; la qual cosa podria reflectir una possible reparació del dany vascular.

5.- Tot i que la HAP i la HPTEC presenten similituds en la gravetat del trastorn hemodinàmic, el paper de les cèl·lules progenitores en ambdós tipus d'hipertensió pulmonar és diferent.

6.- Els malalts amb MPOC presenten incompetència vascular, definida per l'increment dels nivells dels marcadors de dany vascular (micropartícules endotelials) i la reducció dels nivells dels marcadors de reparació vascular (cèl·lules progenitores).

7.- La incompetència vascular dels malalts amb MPOC és atribuïble a factors de la pròpia malaltia i no pas a l'efecte del consum de tabac.

8.- El gènere té efecte en la capacitat de reparació vascular, ja que les dones tenen menor capacitat reparadora que els homes. La menor competència vascular de les dones s'associa a una pitjor funció pulmonar i les pot fer més susceptibles a complicacions cardiovasculars.

BIBLIOGRAFIA

1. Sadlonova J, Osinova D, Rozborilova E, Osina O, Novakova E, Sadlonova V. Importance of GOLD Guidelines for Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2017;
2. Burney PGJ, Patel J, Newson R, Minelli C, Naghavi M. Global and regional trends in COPD mortality, 1990-2010. *Eur Respir J.* 2015;45:1239–1247.
3. Lamprecht B, McBurnie MA, Vollmer WM, Gudmundsson G, Welte T, Nizankowska-Mogilnicka E, Studnicka M, Bateman E, Anto JM, Burney P, Mannino DM, Buist SA, BOLD Collaborative Research Group. COPD in never smokers: results from the population-based burden of obstructive lung disease study. *Chest.* 2011;139:752–763.
4. Zhao J, Li M, Chen J, Wu X, Ning Q, Zhao J, Xu Y, Xie J, Yu J. Smoking status and gene susceptibility play important roles in the development of chronic obstructive pulmonary disease and lung function decline: A population-based prospective study. *Medicine (Baltimore).* 2017;96:e7283.
5. Burrows B, Knudson RJ, Cline MG, Lebowitz MD. Quantitative relationships between cigarette smoking and ventilatory function. *Am Rev Respir Dis.* 1977;115:195–205.
6. Henao MP, Craig TJ. Recent advances in understanding and treating COPD related to α 1-antitrypsin deficiency. *Expert Rev Respir Med.* 2016;10:1281–1294.
7. Vogelmeier CF, Criner GJ, Martínez FJ, Anzueto A, Barnes PJ, Bourbeau J, Celli BR, Chen R, Decramer M, Fabbri LM, Frith P, Halpin DMG, López Varela MV, Nishimura M, Roche N, Rodríguez-Roisin R, Sin DD, Singh D, Stockley R, Vestbo J, Wedzicha JA, Agustí A. Global Strategy for the Diagnosis, Management, and Prevention of Chronic Obstructive Lung Disease 2017 Report: GOLD Executive Summary. *Arch Bronconeumol.* 2017;53:128–149.
8. Ramos D, Proença M, Leite MR, Ferreira AD, Trevisan IB, Brígida GFS, Tacao GY, Ramos EMC. Effects of exposure to biomass burning on pulmonary inflammatory markers and pulmonary function in individuals with COPD. *Rev Port Pneumol.* 2017;
9. Hayes D, Tumin D, Budev MM, Tobias JD, St John RC, Kukreja J. Adverse outcomes associated with pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease after bilateral lung transplantation. *Respir Med.* 2017;128:102–108.
10. Hilde JM, Skjørten I, Hansteen V, Melsom MN, Hisdal J, Humerfelt S, Steine K. Haemodynamic responses to exercise in patients with COPD. *Eur Respir J.* 2013;41:1031–1041.
11. Galiè N, Humbert M, Vachiery J-L, Gibbs S, Lang I, Torbicki A, Simonneau G, Peacock A, Vonk Noordegraaf A, Beghetti M, Ghofrani A, Gomez Sanchez MA, Hansmann G, Klepetko W, Lancellotti P, Matucci M, McDonagh T, Pierard LA, Trindade PT, Zompatori M, Hoeper M, Aboyans V, Vaz Carneiro A, Achenbach S, Agewall S, Allanore Y, Asteggiano R, Paolo Badano L, Albert Barberà J, Bouvaist H, Bueno H, Byrne RA, Carerj S, Castro G, Erol Ç, Falk V, Funck-Brentano C, Gorenflo M, Granton J, Iung B, Kiely DG, Kirchhof P, Kjellstrom B, Landmesser U, Lekakis J, Lionis C, Lip GYH, Orfanos SE, Park MH, Piepoli MF, Ponikowski P, Revel M-P, Rigau D, Rosenkranz S, Völler H, Luis Zamorano J. 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension: The Joint Task Force for the Diagnosis and Treatment of Pulmonary Hypertension of the European Society of Cardiology (ESC) and the European Respiratory Society (ERS): Endorsed by: Association for European Paediatric and Congenital

Bibliografia

- Cardiology (AEPC), International Society for Heart and Lung Transplantation (ISHLT). *Eur Heart J*. 2016;37:67–119.
12. Ghofrani H-A, D'Armini AM, Grimminger F, Hoeper MM, Jansa P, Kim NH, Mayer E, Simonneau G, Wilkins MR, Fritsch A, Neuser D, Weimann G, Wang C, CHEST-1 Study Group. Riociguat for the treatment of chronic thromboembolic pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 2013;369:319–329.
 13. Chaouat A, Bugnet A-S, Kadaoui N, Schott R, Enache I, Ducloné A, Ehrhart M, Kessler R, Weitzenblum E. Severe pulmonary hypertension and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005;172:189–194.
 14. HarrisonMedicina [Internet]. [cited 2017 Jul 20];Available from: <http://harrisonmedicina.mhmedical.com/book.aspx?bookid=1717>
 15. Gibbons GH, Dzau VJ. The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med*. 1994;330:1431–1438.
 16. Siafakas NM, Antoniou KM, Tzortzaki EG. Role of angiogenesis and vascular remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2007;2:453–462.
 17. Heissig B, Hattori K, Friedrich M, Rafii S, Werb Z. Angiogenesis: vascular remodeling of the extracellular matrix involves metalloproteinases. *Curr Opin Hematol*. 2003;10:136–141.
 18. Sakao S, Tatsumi K, Voelkel NF. Reversible or irreversible remodeling in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010;43:629–634.
 19. Renna N, F S, de las Heras N, Miatello RM. Pathophysiology of Vascular Remodeling in Hypertension [Internet]. *Int. J. Hypertens*. 2013 [cited 2017 Jul 20];Available from: <https://www.hindawi.com/journals/ijhy/2013/808353/>
 20. Schiffrin EL. Vascular remodeling in hypertension: mechanisms and treatment. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 2012;59:367–374.
 21. Santos S, Peinado VI, Ramírez J, Melgosa T, Roca J, Rodríguez-Roisin R, Barberà JA. Characterization of pulmonary vascular remodelling in smokers and patients with mild COPD. *Eur Respir J*. 2002;19:632–638.
 22. Rai PR, Cool CD, King JAC, Stevens T, Burns N, Winn RA, Kasper M, Voelkel NF. The cancer paradigm of severe pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;178:558–564.
 23. Toshner M, Voswinckel R, Southwood M, Al-Lamki R, Howard LSG, Marchesan D, Yang J, Suntharalingam J, Soon E, Exley A, Stewart S, Hecker M, Zhu Z, Gehling U, Seeger W, Pepke-Zaba J, Morrell NW. Evidence of dysfunction of endothelial progenitors in pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;180:780–787.
 24. Peinado VI, Ramírez J, Roca J, Rodríguez-Roisin R, Barberà JA. Identification of vascular progenitor cells in pulmonary arteries of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2006;34:257–263.

25. Dzau VJ, Gibbons GH. Endothelium and growth factors in vascular remodeling of hypertension. *Hypertens Dallas Tex* 1979. 1991;18:III115-121.
26. Hassoun PM, Mouthon L, Barberà JA, Eddahibi S, Flores SC, Grimminger F, Jones PL, Maitland ML, Michelakis ED, Morrell NW, Newman JH, Rabinovitch M, Schermuly R, Stenmark KR, Voelkel NF, Yuan JX-J, Humbert M. Inflammation, growth factors, and pulmonary vascular remodeling. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54:S10-19.
27. Isidori AM, Venneri MA, Fiore D. Angiotensin-1 and Angiotensin-2 in metabolic disorders: therapeutic strategies to restore the highs and lows of angiogenesis in diabetes. *J Endocrinol Invest*. 2016;39:1235–1246.
28. Fukuhara S, Sako K, Noda K, Zhang J, Minami M, Mochizuki N. Angiotensin-1/Tie2 receptor signaling in vascular quiescence and angiogenesis. *Histol Histopathol*. 2010;25:387–396.
29. Huang H, Bhat A, Woodnutt G, Lappe R. Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:575–585.
30. Koh GY. Orchestral actions of angiotensin-1 in vascular regeneration. *Trends Mol Med*. 2013;19:31–39.
31. Fagiani E, Christofori G. Angiotensins in angiogenesis. *Cancer Lett*. 2013;328:18–26.
32. Thurston G, Suri C, Smith K, McClain J, Sato TN, Yancopoulos GD, McDonald DM. Leakage-resistant blood vessels in mice transgenically overexpressing angiotensin-1. *Science*. 1999;286:2511–2514.
33. Fiedler U, Scharpfenecker M, Koidl S, Hegen A, Grunow V, Schmidt JM, Kriz W, Thurston G, Augustin HG. The Tie-2 ligand angiotensin-2 is stored in and rapidly released upon stimulation from endothelial cell Weibel-Palade bodies. *Blood*. 2004;103:4150–4156.
34. Hansen TM, Singh H, Tahir TA, Brindle NPJ. Effects of angiotensins-1 and -2 on the receptor tyrosine kinase Tie2 are differentially regulated at the endothelial cell surface. *Cell Signal*. 2010;22:527–532.
35. Le CTK, Laidlaw G, Morehouse CA, Naiman B, Brohawn P, Mustelin T, Connor JR, McDonald DM. Synergistic actions of blocking angiotensin-2 and tumor necrosis factor- α in suppressing remodeling of blood vessels and lymphatics in airway inflammation. *Am J Pathol*. 2015;185:2949–2968.
36. Benest AV, Kruse K, Savant S, Thomas M, Laib AM, Loos EK, Fiedler U, Augustin HG. Angiotensin-2 is critical for cytokine-induced vascular leakage. *PLoS One*. 2013;8:e70459.
37. Lemieux C, Maliba R, Favier J, Théorêt J-F, Merhi Y, Sirois MG. Angiotensins can directly activate endothelial cells and neutrophils to promote proinflammatory responses. *Blood*. 2005;105:1523–1530.
38. Gale NW, Thurston G, Hackett SF, Renard R, Wang Q, McClain J, Martin C, Witte C, Witte MH, Jackson D, Suri C, Campochiaro PA, Wiegand SJ, Yancopoulos GD. Angiotensin-2 is required for postnatal angiogenesis and lymphatic patterning, and only the latter role is rescued by Angiotensin-1. *Dev Cell*. 2002;3:411–423.

Bibliografia

39. Maisonpierre PC, Suri C, Jones PF, Bartunkova S, Wiegand SJ, Radziejewski C, Compton D, McClain J, Aldrich TH, Papadopoulos N, Daly TJ, Davis S, Sato TN, Yancopoulos GD. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*. 1997;277:55–60.
40. Lee HJ, Cho C-H, Hwang S-J, Choi H-H, Kim K-T, Ahn SY, Kim J-H, Oh J-L, Lee GM, Koh GY. Biological characterization of angiopoietin-3 and angiopoietin-4. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2004;18:1200–1208.
41. Siveen KS, Prabhu K, Krishnankutty R, Kuttikrishnan S, Tsakou M, Alali FQ, Dermime S, Mohammad RM, Uddin S. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Signaling in Tumour Vascularization: Potential and Challenges. *Curr Vasc Pharmacol*. 2017;
42. Shibuya M. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes Cancer*. 2011;2:1097–1105.
43. Coll-Bonfill N, Peinado VI, Pisano MV, Párrizas M, Blanco I, Evers M, Engelmann JC, García-Lucio J, Tura-Ceide O, Meister G, Barberà JA, Musri MM. Slug Is Increased in Vascular Remodeling and Induces a Smooth Muscle Cell Proliferative Phenotype. *PLoS One*. 2016;11:e0159460.
44. Arciniegas E, Sutton AB, Allen TD, Schor AM. Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro. *J Cell Sci*. 1992;103 (Pt 2):521–529.
45. Díez M, Musri MM, Ferrer E, Barberà JA, Peinado VI. Endothelial progenitor cells undergo an endothelial-to-mesenchymal transition-like process mediated by TGFbetaRI. *Cardiovasc Res*. 2010;88:502–511.
46. Welch-Reardon KM, Ehsan SM, Wang K, Wu N, Newman AC, Romero-Lopez M, Fong AH, George SC, Edwards RA, Hughes CCW. Angiogenic sprouting is regulated by endothelial cell expression of Slug. *J Cell Sci*. 2014;127:2017–2028.
47. Cooley BC, Nevado J, Mellad J, Yang D, St Hilaire C, Negro A, Fang F, Chen G, San H, Walts AD, Schwartzbeck RL, Taylor B, Lanzer JD, Wragg A, Elagha A, Beltran LE, Berry C, Feil R, Virmani R, Ladich E, Kovacic JC, Boehm M. TGF- β signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling. *Sci Transl Med*. 2014;6:227ra34.
48. Ucuzian AA, Gassman AA, East AT, Greisler HP. Molecular mediators of angiogenesis. *J Burn Care Res Off Publ Am Burn Assoc*. 2010;31:158–175.
49. Gerwins P, Sköldenberg E, Claesson-Welsh L. Function of fibroblast growth factors and vascular endothelial growth factors and their receptors in angiogenesis. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2000;34:185–194.
50. Cross MJ, Claesson-Welsh L. FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22:201–207.
51. Antoniu SA, Mihaltan F, Ulmeanu R. Anti-TNF-alpha therapies in chronic obstructive pulmonary diseases. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008;17:1203–1211.

52. Malaviya R, Laskin JD, Laskin DL. Anti-TNF α Therapy in Inflammatory Lung Diseases bn. *Pharmacol Ther.* 2017;
53. Shahriary A, Panahi Y, Shirali S, Rahmani H. Relationship of serum levels of interleukin 6, interleukin 8, and C-reactive protein with forced expiratory volume in first second in patients with mustard lung and chronic obstructive pulmonary diseases: systematic review and meta-analysis. *Adv Dermatol Allergol Dermatol Alergol.* 2017;34:192–198.
54. Lambert CM, Roy M, Meloche J, Robitaille GA, Agharazii M, Richard DE, Bonnet S. Tumor necrosis factor inhibitors as novel therapeutic tools for vascular remodeling diseases. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010;299:H995-1001.
55. Chen Y, Peng W, Raffetto JD, Khalil RA. Matrix Metalloproteinases in Remodeling of Lower Extremity Veins and Chronic Venous Disease. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2017;147:267–299.
56. van Hinsbergh VWM, Koolwijk P. Endothelial sprouting and angiogenesis: matrix metalloproteinases in the lead. *Cardiovasc Res.* 2008;78:203–212.
57. Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol.* 2008;75:346–359.
58. Derosa G, D'Angelo A, Ciccarelli L, Piccinni MN, Pricolo F, Salvadeo S, Montagna L, Gravina A, Ferrari I, Galli S, Paniga S, Tinelli C, Cicero AFG. Matrix metalloproteinase-2, -9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in patients with hypertension. *Endothel J Endothel Cell Res.* 2006;13:227–231.
59. Kapustnik V, Istomina O. ENDOTHELIAL DYSFUNCTION IN PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE WITH CONCOMITANT HYPERTENSION. *Georgian Med News.* 2016;29–33.
60. Pizarro S, García-Lucio J, Peinado VI, Tura-Ceide O, Díez M, Blanco I, Sitges M, Petriz J, Torralba Y, Marín P, Roca J, Barberà JA. Circulating progenitor cells and vascular dysfunction in chronic obstructive pulmonary disease. *PLoS One.* 2014;9:e106163.
61. Thambiayya K. Endothelial dysfunction in pulmonary arterial hypertension (PAH). *FASEB J.* 2015;29:662.18.
62. Sandoo A, van Zanten JJC. V, Metsios GS, Carroll D, Kitis GD. The Endothelium and Its Role in Regulating Vascular Tone. *Open Cardiovasc Med J.* 2010;4:302–312.
63. Hadi HA, Carr CS, Al Suwaidi J. Endothelial Dysfunction: Cardiovascular Risk Factors, Therapy, and Outcome. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1:183–198.
64. Dinh-Xuan AT, Pepke-Zaba J, Butt AY, Cremona G, Higenbottam TW. Impairment of pulmonary-artery endothelium-dependent relaxation in chronic obstructive lung disease is not due to dysfunction of endothelial cell membrane receptors nor to L-arginine deficiency. *Br J Pharmacol.* 1993;109:587–591.
65. Peinado VI, Barbera JA, Ramirez J, Gomez FP, Roca J, Jover L, Gimferrer JM, Rodriguez-Roisin R. Endothelial dysfunction in pulmonary arteries of patients with mild COPD. *Am J Physiol.* 1998;274:L908-913.

Bibliografia

66. Barberà JA, Peinado VI, Santos S, Ramirez J, Roca J, Rodriguez-Roisin R. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in pulmonary arteries of smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2001;164:709–713.
67. Giaid A, Saleh D. Reduced expression of endothelial nitric oxide synthase in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1995;333:214–221.
68. Giaid A, Yanagisawa M, Langleben D, Michel RP, Levy R, Shennib H, Kimura S, Masaki T, Duguid WP, Stewart DJ. Expression of endothelin-1 in the lungs of patients with pulmonary hypertension. *N Engl J Med*. 1993;328:1732–1739.
69. Vestbo J, Edwards LD, Scanlon PD, Yates JC, Agusti A, Bakke P, Calverley PMA, Celli B, Coxson HO, Crim C, Lomas DA, MacNee W, Miller BE, Silverman EK, Tal-Singer R, Wouters E, Rennard SI, ECLIPSE Investigators. Changes in forced expiratory volume in 1 second over time in COPD. *N Engl J Med*. 2011;365:1184–1192.
70. Agusti A, Calverley PMA, Celli B, Coxson HO, Edwards LD, Lomas DA, MacNee W, Miller BE, Rennard S, Silverman EK, Tal-Singer R, Wouters E, Yates JC, Vestbo J, Evaluation of COPD Longitudinally to Identify Predictive Surrogate Endpoints (ECLIPSE) investigators. Characterisation of COPD heterogeneity in the ECLIPSE cohort. *Respir Res*. 2010;11:122.
71. Vestbo J, Rennard S. Chronic obstructive pulmonary disease biomarker(s) for disease activity needed—urgently. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182:863–864.
72. Curtis AM, Zhang L, Medenilla E, Gui M, Wilkinson PF, Hu E, Giri J, Doraiswamy V, Gunda S, Burgert ME, Moore JS, Edelberg JM, Mohler ER. Relationship of microparticles to progenitor cells as a measure of vascular health in a diabetic population. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;78:329–337.
73. Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: key players towards the definition of vascular competence. *J Cell Mol Med*. 2009;13:454–471.
74. Naito H, Kidoya H, Sakimoto S, Wakabayashi T, Takakura N. Identification and characterization of a resident vascular stem/progenitor cell population in preexisting blood vessels. *EMBO J*. 2012;31:842–855.
75. Barber CL, Iruela-Arispe ML. The ever-elusive endothelial progenitor cell: identities, functions and clinical implications. *Pediatr Res*. 2006;59:26R–32R.
76. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Zee R, Li T, Witzenbichler B, Schattman G, Isner JM. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275:964–967.
77. Yoder MC. Defining human endothelial progenitor cells. *J Thromb Haemost JTH*. 2009;7 Suppl 1:49–52.
78. Tilling L, Chowienczyk P, Clapp B. Progenitors in motion: mechanisms of mobilization of endothelial progenitor cells. *Br J Clin Pharmacol*. 2009;68:484–492.
79. Burger D, Touyz RM. Cellular biomarkers of endothelial health: microparticles, endothelial progenitor cells, and circulating endothelial cells. *J Am Soc Hypertens JASH*. 2012;6:85–99.

80. Richter R, Forssmann W, Henschler R. Current Developments in Mobilization of Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Their Interaction with Niches in Bone Marrow. *Transfus Med Hemotherapy Off Organ Dtsch Ges Transfusionsmedizin Immunhamatologie*. 2017;44:151–164.
81. Hristov M, Weber C. Endothelial progenitor cells: characterization, pathophysiology, and possible clinical relevance. *J Cell Mol Med*. 2004;8:498–508.
82. Peichev M, Naiyer AJ, Pereira D, Zhu Z, Lane WJ, Williams M, Oz MC, Hicklin DJ, Witte L, Moore MA, Rafii S. Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors. *Blood*. 2000;95:952–958.
83. Hill JM, Zalos G, Halcox JPJ, Schenke WH, Waclawiw MA, Quyyumi AA, Finkel T. Circulating endothelial progenitor cells, vascular function, and cardiovascular risk. *N Engl J Med*. 2003;348:593–600.
84. Hur J, Yoon C-H, Kim H-S, Choi J-H, Kang H-J, Hwang K-K, Oh B-H, Lee M-M, Park Y-B. Characterization of two types of endothelial progenitor cells and their different contributions to neovascularogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:288–293.
85. Cheng C-C, Chang S-J, Chueh Y-N, Huang T-S, Huang P-H, Cheng S-M, Tsai T-N, Chen J-W, Wang H-W. Distinct angiogenesis roles and surface markers of early and late endothelial progenitor cells revealed by functional group analyses. *BMC Genomics*. 2013;14:182.
86. Kim S-W, Jin HL, Kang S-M, Kim S, Yoo K-J, Jang Y, Kim HO, Yoon Y. Therapeutic effects of late outgrowth endothelial progenitor cells or mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord blood on infarct repair. *Int J Cardiol*. 2016;203:498–507.
87. Basile DP, Yoder MC. Circulating and tissue resident endothelial progenitor cells. *J Cell Physiol*. 2014;229:10–16.
88. Takahashi T, Kalka C, Masuda H, Chen D, Silver M, Kearney M, Magner M, Isner JM, Asahara T. Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization. *Nat Med*. 1999;5:434–438.
89. Sen S, McDonald SP, Coates PTH, Bonder CS. Endothelial progenitor cells: novel biomarker and promising cell therapy for cardiovascular disease. *Clin Sci Lond Engl 1979*. 2011;120:263–283.
90. Khan SS, Solomon MA, McCoy JP. Detection of circulating endothelial cells and endothelial progenitor cells by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom*. 2005;64:1–8.
91. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood*. 1997;90:5002–5012.
92. Yoder MC. Human Endothelial Progenitor Cells. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2012 [cited 2017 Jul 13];2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3385946/>
93. Janssen WJ, Yunt ZX, Muldrow A, Kearns MT, Kloepfer A, Barthel L, Bratton DL, Bowler RP, Henson PM. Circulating hematopoietic progenitor cells are decreased in COPD. *COPD*. 2014;11:277–289.

Bibliografia

94. Kamei N, Atesok K, Ochi M. The Use of Endothelial Progenitor Cells for the Regeneration of Musculoskeletal and Neural Tissues. *Stem Cells Int.* 2017;2017:1960804.
95. Pías-Peleteiro J, Campos F, Castillo J, Sobrino T. Endothelial progenitor cells as a therapeutic option in intracerebral hemorrhage. *Neural Regen Res.* 2017;12:558–561.
96. Yan L, Chen X, Talati M, Nunley BW, Gladson S, Blackwell T, Cogan J, Austin E, Wheeler F, Loyd J, West J, Hamid R. Bone Marrow-derived Cells Contribute to the Pathogenesis of Pulmonary Arterial Hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2016;193:898–909.
97. Van Craenenbroeck EM, Conraads VM. Endothelial progenitor cells in vascular health: focus on lifestyle. *Microvasc Res.* 2010;79:184–192.
98. Lee PSS, Poh KK. Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases. *World J Stem Cells.* 2014;6:355–366.
99. Minhajat R, Nilasari D, Bakri S. The Role of Endothelial Progenitor Cell in Cardiovascular Disease Risk Factors. *Acta Medica Indones.* 2015;47:340–347.
100. Brittan M, Hoogenboom MM, Padfield GJ, Tura O, Fujisawa T, Maclay JD, Macnee W, Mills NL. Endothelial progenitor cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2013;305:L964-969.
101. Kondo T, Hayashi M, Takeshita K, Numaguchi Y, Kobayashi K, Iino S, Inden Y, Murohara T. Smoking cessation rapidly increases circulating progenitor cells in peripheral blood in chronic smokers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1442–1447.
102. Heiss C, Amabile N, Lee AC, Real WM, Schick SF, Lao D, Wong ML, Jahn S, Angeli FS, Minasi P, Springer ML, Hammond SK, Glantz SA, Grossman W, Balmes JR, Yeghiazarians Y. Brief secondhand smoke exposure depresses endothelial progenitor cells activity and endothelial function: sustained vascular injury and blunted nitric oxide production. *J Am Coll Cardiol.* 2008;51:1760–1771.
103. Wang X, Zhu J, Chen J, Shang Y. Effects of nicotine on the number and activity of circulating endothelial progenitor cells. *J Clin Pharmacol.* 2004;44:881–889.
104. Mobarrez F, Antoniewicz L, Bosson JA, Kuhl J, Pisetsky DS, Lundbäck M. The effects of smoking on levels of endothelial progenitor cells and microparticles in the blood of healthy volunteers. *PLoS One.* 2014;9:e90314.
105. Michaud SE, Dussault S, Haddad P, Groleau J, Rivard A. Circulating endothelial progenitor cells from healthy smokers exhibit impaired functional activities. *Atherosclerosis.* 2006;187:423–432.
106. Fadini GP, Schiavon M, Cantini M, Baesso I, Facco M, Miorin M, Tassinato M, de Kreutzenberg SV, Avogaro A, Agostini C. Circulating progenitor cells are reduced in patients with severe lung disease. *Stem Cells Dayt Ohio.* 2006;24:1806–1813.
107. Huertas A, Testa U, Riccioni R, Petrucci E, Riti V, Savi D, Serra P, Bonsignore MR, Palange P. Bone marrow-derived progenitors are greatly reduced in patients with severe COPD and low-BMI. *Respir Physiol Neurobiol.* 2010;170:23–31.

108. Liu Y, Liu X, Lin G, Sun L, Li H, Xie C. Decreased CD34+ cell number is correlated with cardiac dysfunction in patients with acute exacerbation of COPD. *Heart Lung Circ.* 2014;23:875–882.
109. Palange P, Testa U, Huertas A, Calabrò L, Antonucci R, Petrucci E, Pelosi E, Pasquini L, Satta A, Morici G, Vignola MA, Bonsignore MR. Circulating haemopoietic and endothelial progenitor cells are decreased in COPD. *Eur Respir J.* 2006;27:529–541.
110. Salter BM, Manzoor F, Beaudin S, Kjarsgaard M, Nair P, Gauvreau GM, Sehmi R. Dysregulation of Vascular Endothelial Progenitor Cells Lung-Homing in Subjects with COPD. *Can Respir J.* 2016;2016:1472823.
111. Yang Y, Gan Y, Cao J, Chen Y, He Z-H, Luo H, Cai S, Xiang X-D, Zhou R, Chen P. Decreased and dysfunctional circulating endothelial progenitor cells in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Chin Med J (Engl).* 2013;126:3222–3227.
112. Caramori G, Rigolin GM, Mazzoni F, Leprotti S, Campioni P, Papi A. Circulating endothelial stem cells are not decreased in pulmonary emphysema or COPD. *Thorax.* 2010;65:554–555.
113. Curkendall SM, Lanes S, de Luise C, Stang MR, Jones JK, She D, Goehring E. Chronic obstructive pulmonary disease severity and cardiovascular outcomes. *Eur J Epidemiol.* 2006;21:803–813.
114. Asosingh K, Aldred MA, Vasanthi A, Drazba J, Sharp J, Farver C, Comhair SAA, Xu W, Licina L, Huang L, Anand-Apte B, Yoder MC, Tudor RM, Erzurum SC. Circulating angiogenic precursors in idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Am J Pathol.* 2008;172:615–627.
115. Davie NJ, Crossno JT, Frid MG, Hofmeister SE, Reeves JT, Hyde DM, Carpenter TC, Brunetti JA, McNiece IK, Stenmark KR. Hypoxia-induced pulmonary artery adventitial remodeling and neovascularization: contribution of progenitor cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2004;286:L668-678.
116. Farha S, Asosingh K, Xu W, Sharp J, George D, Comhair S, Park M, Tang WHW, Loyd JE, Theil K, Tubbs R, Hsi E, Lichtin A, Erzurum SC. Hypoxia-inducible factors in human pulmonary arterial hypertension: a link to the intrinsic myeloid abnormalities. *Blood.* 2011;117:3485–3493.
117. Foris V, Kovacs G, Marsh LM, Bálint Z, Tötsch M, Avian A, Douschan P, Ghanim B, Klepetko W, Olschewski A, Olschewski H. CD133+ cells in pulmonary arterial hypertension. *Eur Respir J.* 2016;48:459–469.
118. Diller G-P, van Eijl S, Okonko DO, Howard LS, Ali O, Thum T, Wort SJ, Bédard E, Gibbs JSR, Bauersachs J, Hobbs AJ, Wilkins MR, Gatzoulis MA, Wharton J. Circulating endothelial progenitor cells in patients with Eisenmenger syndrome and idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Circulation.* 2008;117:3020–3030.
119. Junhui Z, Xingxiang W, Guosheng F, Yunpeng S, Furong Z, Junzhu C. Reduced number and activity of circulating endothelial progenitor cells in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension. *Respir Med.* 2008;102:1073–1079.

Bibliografia

120. Fadini GP, Schiavon M, Rea F, Avogaro A, Agostini C. Depletion of endothelial progenitor cells may link pulmonary fibrosis and pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;176:724–725; author reply 725.
121. Smadja DM, Mauge L, Sanchez O, Silvestre J-S, Guerin C, Godier A, Henno P, Gaussem P, Israël-Biet D. Distinct patterns of circulating endothelial cells in pulmonary hypertension. *Eur Respir J.* 2010;36:1284–1293.
122. György B, Szabó TG, Pásztói M, Pál Z, Misják P, Aradi B, László V, Pállinger E, Pap E, Kittel A, Nagy G, Falus A, Buzás EI. Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2011;68:2667–2688.
123. Chargaff E, West R. The biological significance of the thromboplastic protein of blood. *J Biol Chem.* 1946;166:189–197.
124. Rautou P-E, Vion A-C, Amabile N, Chironi G, Simon A, Tedgui A, Boulanger CM. Microparticles, vascular function, and atherothrombosis. *Circ Res.* 2011;109:593–606.
125. Morel O, Jesel L, Freyssinet J-M, Toti F. Cellular mechanisms underlying the formation of circulating microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:15–26.
126. Jimenez JJ, Jy W, Mauro LM, Soderland C, Horstman LL, Ahn YS. Endothelial cells release phenotypically and quantitatively distinct microparticles in activation and apoptosis. *Thromb Res.* 2003;109:175–180.
127. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circ Res.* 2010;107:1047–1057.
128. Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31:27–33.
129. Connor DE, Exner T, Ma DDF, Joseph JE. The majority of circulating platelet-derived microparticles fail to bind annexin V, lack phospholipid-dependent procoagulant activity and demonstrate greater expression of glycoprotein Ib. *Thromb Haemost.* 2010;103:1044–1052.
130. Shet AS, Aras O, Gupta K, Hass MJ, Rausch DJ, Saba N, Koopmeiners L, Key NS, Heibel RP. Sickle blood contains tissue factor-positive microparticles derived from endothelial cells and monocytes. *Blood.* 2003;102:2678–2683.
131. Simoncini S, Njock M-S, Robert S, Camoin-Jau L, Sampol J, Harlé J-R, Nguyen C, Dignat-George F, Anfosso F. TRAIL/Apo2L mediates the release of procoagulant endothelial microparticles induced by thrombin in vitro: a potential mechanism linking inflammation and coagulation. *Circ Res.* 2009;104:943–951.
132. Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R. Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32:659–665.
133. Dey-Hazra E, Hertel B, Kirsch T, Woywodt A, Lovric S, Haller H, Haubitz M, Erdbruegger U. Detection of circulating microparticles by flow cytometry: influence of centrifugation, filtration of buffer, and freezing. *Vasc Health Risk Manag.* 2010;6:1125–1133.

134. Smalley DM, Sheman NE, Nelson K, Theodorescu D. Isolation and identification of potential urinary microparticle biomarkers of bladder cancer. *J Proteome Res.* 2008;7:2088–2096.
135. Lacedonia D, Carpagnano GE, Trotta T, Palladino GP, Panaro MA, Zoppo LD, Foschino Barbaro MP, Porro C. Microparticles in sputum of COPD patients: a potential biomarker of the disease? *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2016;11:527–533.
136. Mutschler DK, Larsson AO, Basu S, Nordgren A, Eriksson MB. Effects of mechanical ventilation on platelet microparticles in bronchoalveolar lavage fluid. *Thromb Res.* 2002;108:215–220.
137. Berckmans RJ, Nieuwland R, Tak PP, Böing AN, Romijn FPHTM, Kraan MC, Breedveld FC, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. *Arthritis Rheum.* 2002;46:2857–2866.
138. Berckmans RJ, Sturk A, van Tienen LM, Schaap MCL, Nieuwland R. Cell-derived vesicles exposing coagulant tissue factor in saliva. *Blood.* 2011;117:3172–3180.
139. Shet AS. Characterizing blood microparticles: Technical aspects and challenges. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4:769–774.
140. Bakouboula B, Morel O, Faure A, Zobairi F, Jesel L, Trinh A, Zupan M, Canuet M, Grunebaum L, Brunette A, Desprez D, Chabot F, Weitzenblum E, Freyssinet J-M, Chaouat A, Toti F. Procoagulant membrane microparticles correlate with the severity of pulmonary arterial hypertension. *Am J Respir Crit Care Med.* 2008;177:536–543.
141. Witwer 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.* 2013;2.
142. Mooberry MJ, Bradford R, Hobl EL, Lin FC, Jilma B, Key NS. Procoagulant microparticles promote coagulation in a factor XI-dependent manner in human endotoxemia. *J Thromb Haemost JTH.* 2016;14:1031–1042.
143. Ren JG, Zhang W, Liu B, Man QW, Xiong XP, Li C, Zhu JY, Wang WM, Jia J, Sun ZJ, Zhang WF, Chen G, Zhao YF. Clinical Significance and Roles in Angiogenesis of Circulating Microparticles in Oral Cancer. *J Dent Res.* 2016;95:860–867.
144. Lovren F, Verma S. Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction. *Clin Chem.* 2013;59:1166–1174.
145. Puddu P, Puddu GM, Cravero E, Muscari S, Muscari A. The involvement of circulating microparticles in inflammation, coagulation and cardiovascular diseases. *Can J Cardiol.* 2010;26:e140–e145.
146. Balvers K, Curry N, Kleinveld DJB, Böing AN, Nieuwland R, Goslings JC, Juffermans NP. Endogenous microparticles drive the proinflammatory host immune response in severely injured trauma patients. *Shock Augusta Ga.* 2015;43:317–321.

Bibliografia

147. Nomura S, Ozaki Y, Ikeda Y. Function and role of microparticles in various clinical settings. *Thromb Res*. 2008;123:8–23.
148. Tual-Chalot S, Guibert C, Muller B, Savineau J-P, Andriantsitohaina R, Martinez MC. Circulating microparticles from pulmonary hypertensive rats induce endothelial dysfunction. *Am J Respir Crit Care Med*. 2010;182:261–268.
149. Flaumenhaft R, Dilks JR, Richardson J, Alden E, Patel-Hett SR, Battinelli E, Klement GL, Sola-Visner M, Italiano JE. Megakaryocyte-derived microparticles: direct visualization and distinction from platelet-derived microparticles. *Blood*. 2009;113:1112–1121.
150. Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, Suzuki T, Ota C, Tando Y, He M, Yamada M, Kurosawa S, Yamaya M, Kubo H. Differences in the released endothelial microparticle subtypes between human pulmonary microvascular endothelial cells and aortic endothelial cells in vitro. *Exp Lung Res*. 2013;39:155–161.
151. Dejana E, Orsenigo F, Lampugnani MG. The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci*. 2008;121:2115–2122.
152. Vestweber D. VE-cadherin: the major endothelial adhesion molecule controlling cellular junctions and blood vessel formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2008;28:223–232.
153. Conway D, Schwartz MA. Lessons from the endothelial junctional mechanosensory complex. *F1000 Biol Rep*. 2012;4:1.
154. Duval A, Helley D, Capron L, Youinou P, Renaudineau Y, Dubucquoi S, Fischer A-M, Hachulla E. Endothelial dysfunction in systemic lupus patients with low disease activity: evaluation by quantification and characterization of circulating endothelial microparticles, role of anti-endothelial cell antibodies. *Rheumatol Oxf Engl*. 2010;49:1049–1055.
155. Privratsky JR, Newman PJ. PECAM-1: regulator of endothelial junctional integrity. *Cell Tissue Res*. 2014;355:607–619.
156. Woodfin A, Voisin M-B, Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:2514–2523.
157. Gordon C, Gudi K, Krause A, Sackrowitz R, Harvey B-G, Strulovici-Barel Y, Mezey JG, Crystal RG. Circulating endothelial microparticles as a measure of early lung destruction in cigarette smokers. *Am J Respir Crit Care Med*. 2011;184:224–232.
158. Takahashi T, Kubo H. The role of microparticles in chronic obstructive pulmonary disease. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis*. 2014;9:303–314.
159. Wang Z, Yan X. CD146, a multi-functional molecule beyond adhesion. *Cancer Lett*. 2013;330:150–162.
160. Elshal MF, Khan SS, Takahashi Y, Solomon MA, McCoy JP. CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood. *Blood*. 2005;106:2923–2924.
161. Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, Gallatin M, Gimbrone M, Harlan J, Kishimoto K, Lasky L, McEver R. Selectins: a family of adhesion receptors. *Cell*. 1991;67:233.

162. Auvinen K, Jalkanen S, Salmi M. Expression and function of endothelial selectins during human development. *Immunology*. 2014;143:406–415.
163. Rajendran P, Rengarajan T, Thangavel J, Nishigaki Y, Sakthisekaran D, Sethi G, Nishigaki I. The Vascular Endothelium and Human Diseases. *Int J Biol Sci*. 2013;9:1057–1069.
164. Berckmans RJ, Nieuwland R, Böing AN, Romijn FP, Hack CE, Sturk A. Cell-derived microparticles circulate in healthy humans and support low grade thrombin generation. *Thromb Haemost*. 2001;85:639–646.
165. Leroyer AS, Isobe H, Lesèche G, Castier Y, Wassef M, Mallat Z, Binder BR, Tedgui A, Boulanger CM. Cellular origins and thrombogenic activity of microparticles isolated from human atherosclerotic plaques. *J Am Coll Cardiol*. 2007;49:772–777.
166. 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 JASN*. 2005;16:3381–3388.
167. Esposito K, Ciotola M, Schisano B, Gualdiero R, Sardelli L, Misso L, Giannetti G, Giugliano D. Endothelial microparticles correlate with endothelial dysfunction in obese women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91:3676–3679.
168. Koga H, Sugiyama S, Kugiyama K, Watanabe K, Fukushima H, Tanaka T, Sakamoto T, Yoshimura M, Jinnouchi H, Ogawa H. Elevated levels of VE-cadherin-positive endothelial microparticles in patients with type 2 diabetes mellitus and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1622–1630.
169. 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*. 2006;26:112–116.
170. Boulanger CM, Scoazec A, Ebrahimian T, Henry P, Mathieu E, Tedgui A, Mallat Z. Circulating microparticles from patients with myocardial infarction cause endothelial dysfunction. *Circulation*. 2001;104:2649–2652.
171. Serban KA, Rezania S, Petrusca DN, Poirier C, Cao D, Justice MJ, Patel M, Tsvetkova I, Kamocki K, Mikosz A, Schweitzer KS, Jacobson S, Cardoso A, Carlesso N, Hubbard WC, Kechris K, Dragnea B, Berdyshev EV, McClintock J, Petrache I. Structural and functional characterization of endothelial microparticles released by cigarette smoke. *Sci Rep*. 2016;6:31596.
172. Thomashow MA, Shimbo D, Parikh MA, Hoffman EA, Vogel-Claussen J, Hueper K, Fu J, Liu C-Y, Bluemke DA, Ventetuolo CE, Doyle MF, Barr RG. Endothelial microparticles in mild chronic obstructive pulmonary disease and emphysema. The Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis Chronic Obstructive Pulmonary Disease study. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;188:60–68.
173. Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, Suzuki T, Ota C, He M, Yamada M, Suzuki S, Yanai M, Kurosawa S, Yamaya M, Kubo H. Increased circulating endothelial microparticles in COPD patients: a potential biomarker for COPD exacerbation susceptibility. *Thorax*. 2012;67:1067–1074.

Bibliografia

174. Takahashi T, Kobayashi S, Fujino N, Suzuki T, Ota C, Tando Y, Yamada M, Yanai M, Yamaya M, Kurosawa S, Yamauchi M, Kubo H. Annual FEV1 changes and numbers of circulating endothelial microparticles in patients with COPD: a prospective study. *BMJ Open*. 2014;4:e004571.
175. Strulovici-Barel Y, Staudt MR, Krause A, Gordon C, Tilley AE, Harvey B-G, Kaner RJ, Hollmann C, Mezey JG, Bitter H, Pillai SG, Hilton H, Wolff G, Stevenson CS, Visvanathan S, Fine JS, Crystal RG. Persistence of circulating endothelial microparticles in COPD despite smoking cessation. *Thorax*. 2016;71:1137–1144.
176. Amabile N, Heiss C, Real WM, Minasi P, McGlothlin D, Rame EJ, Grossman W, De Marco T, Yeghiazarians Y. Circulating endothelial microparticle levels predict hemodynamic severity of pulmonary hypertension. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008;177:1268–1275.
177. Amabile N, Heiss C, Chang V, Angeli FS, Damon L, Rame EJ, McGlothlin D, Grossman W, De Marco T, Yeghiazarians Y. Increased CD62e(+) endothelial microparticle levels predict poor outcome in pulmonary hypertension patients. *J Heart Lung Transplant Off Publ Int Soc Heart Transplant*. 2009;28:1081–1086.
178. Diehl P, Aleker M, Helbing T, Sossong V, Germann M, Sorichter S, Bode C, Moser M. Increased platelet, leukocyte and endothelial microparticles predict enhanced coagulation and vascular inflammation in pulmonary hypertension. *J Thromb Thrombolysis*. 2011;31:173–179.
179. Shimoda LA, Laurie SS. Vascular Remodeling in Pulmonary Hypertension. *J Mol Med Berl Ger*. 2013;91:297–309.
180. Sakao S, Voelkel NF, Tatsumi K. The vascular bed in COPD: pulmonary hypertension and pulmonary vascular alterations. *Eur Respir Rev Off J Eur Respir Soc*. 2014;23:350–355.
181. Domínguez-Fandos D, Valdés C, Ferrer E, Puig-Pey R, Blanco I, Tura-Ceide O, Paul T, Peinado VI, Barberà JA. Sildenafil in a cigarette smoke-induced model of COPD in the guinea-pig. *Eur Respir J*. 2015;46:346–354.
182. Weissmann N, Lobo B, Pichl A, Parajuli N, Seimetz M, Puig-Pey R, Ferrer E, Peinado VI, Domínguez-Fandos D, Fysikopoulos A, Stasch J-P, Ghofrani HA, Coll-Bonfill N, Frey R, Schermuly RT, García-Lucio J, Blanco I, Bednorz M, Tura-Ceide O, Tadele E, Brandes RP, Grimminger J, Klepetko W, Jaksch P, Rodriguez-Roisin R, Seeger W, Grimminger F, Barberà JA. Stimulation of soluble guanylate cyclase prevents cigarette smoke-induced pulmonary hypertension and emphysema. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014;189:1359–1373.
183. Tabruyn SP, Colton K, Morisada T, Fuxe J, Wiegand SJ, Thurston G, Coyle AJ, Connor J, McDonald DM. Angiopoietin-2-driven vascular remodeling in airway inflammation. *Am J Pathol*. 2010;177:3233–3243.
184. Tian J, Fratz S, Hou Y, Lu Q, Görlach A, Hess J, Schreiber C, Datar SA, Oishi P, Nechtman J, Podolsky R, She J-X, Fineman JR, Black SM. Delineating the angiogenic gene expression profile before pulmonary vascular remodeling in a lamb model of congenital heart disease. *Physiol Genomics*. 2011;43:87–98.

185. Cho YJ, Han JY, Lee SG, Jeon BT, Choi WS, Hwang YS, Roh GS, Lee JD. Temporal changes of angiopoietins and Tie2 expression in rat lungs after monocrotaline-induced pulmonary hypertension. *Comp Med*. 2009;59:350–356.
186. Mercier O, Sage E, de Perrot M, Tu L, Marcos E, Decante B, Baudet B, Hervé P, Dartevielle P, Eddahibi S, Fadel E. Regression of flow-induced pulmonary arterial vasculopathy after flow correction in piglets. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2009;137:1538–1546.
187. Hakanpaa L, Sipila T, Leppanen V-M, Gautam P, Nurmi H, Jacquemet G, Eklund L, Ivaska J, Alitalo K, Saharinen P. Endothelial destabilization by angiopoietin-2 via integrin β 1 activation. *Nat Commun*. 2015;6:5962.
188. Fiedler U, Reiss Y, Scharpfenecker M, Grunow V, Koidl S, Thurston G, Gale NW, Witzernath M, Rosseau S, Suttorp N, Sobke A, Herrmann M, Preissner KT, Vajkoczy P, Augustin HG. Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med*. 2006;12:235–239.
189. Scholz A, Plate KH, Reiss Y. Angiopoietin-2: a multifaceted cytokine that functions in both angiogenesis and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2015;1347:45–51.
190. Linares PM, Chaparro M, Gisbert JP. Angiopoietins in inflammation and their implication in the development of inflammatory bowel disease. A review. *J Crohns Colitis*. 2014;8:183–190.
191. Simon M-P, Tournaire R, Pouyssegur J. The angiopoietin-2 gene of endothelial cells is up-regulated in hypoxia by a HIF binding site located in its first intron and by the central factors GATA-2 and Ets-1. *J Cell Physiol*. 2008;217:809–818.
192. Pichiule P, Chavez JC, LaManna JC. Hypoxic regulation of angiopoietin-2 expression in endothelial cells. *J Biol Chem*. 2004;279:12171–12180.
193. Fabbri LM, Rabe KF. From COPD to chronic systemic inflammatory syndrome? *Lancet Lond Engl*. 2007;370:797–799.
194. Soliman SG, Korah TE, Hammoda GE, Mousa W. Significance of serum levels of angiopoietin-2 and its relationship to Doppler ultrasonographic findings in rheumatoid arthritis patients. *Egypt Rheumatol*. 2014;36:15–20.
195. López-Mejías R, Corrales A, Genre F, Hernández JL, Ochoa R, Blanco R, González-Juanatey C, Martín J, Llorca J, González-Gay MA. Angiopoietin-2 serum levels correlate with severity, early onset and cardiovascular disease in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*. 2013;31:761–766.
196. Lympelopoulou K, Velissaris D, Kotsaki A, Antypa E, Georgiadou S, Tsaganos T, Koulenti D, Paggalou E, Damoraki G, Karagiannidis N, Orfanos SE. Angiopoietin-2 associations with the underlying infection and sepsis severity. *Cytokine*. 2015;73:163–168.
197. Ziegler T, Horstkotte J, Schwab C, Pfetsch V, Weinmann K, Dietzel S, Rohwedder I, Hinkel R, Gross L, Lee S, Hu J, Soehnlein O, Franz WM, Sperandio M, Pohl U, Thomas M, Weber C, Augustin HG, Fässler R, Deutsch U, Kupatt C. Angiopoietin 2 mediates microvascular and hemodynamic alterations in sepsis. *J Clin Invest*. 2013;123:3436–3445.

Bibliografia

198. Westra J, de Groot L, Plaxton SL, Brouwer E, Posthumus MD, Kallenberg CGM, Bijl M. Angiopoietin-2 is highly correlated with inflammation and disease activity in recent-onset rheumatoid arthritis and could be predictive for cardiovascular disease. *Rheumatol Oxf Engl*. 2011;50:665–673.
199. Yang P, Chen N, Yang D, Crane J, Yang S, Wang H, Dong R, Yi X, Xie L, Jing G, Cai J, Wang Z. The ratio of serum Angiopoietin-1 to Angiopoietin-2 in patients with cervical cancer is a valuable diagnostic and prognostic biomarker. *PeerJ* [Internet]. 2017 [cited 2017 Jul 19];5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5452943/>
200. Maffei R, Martinelli S, Santachiara R, Rossi D, Guarnotta C, Sozzi E, Zucchetto A, Rigolin GM, Fiorcari S, Castelli I, Fontana M, Coluccio V, Leonardi G, Zucchini P, Tripodo C, Cuneo A, Gattei V, Del Poeta G, Forconi F, Gaidano G, Torelli G, Marasca R. Angiopoietin-2 plasma dosage predicts time to first treatment and overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;116:584–592.
201. Srirajaskanthan R, Dancey G, Hackshaw A, Luong T, Caplin ME, Meyer T. Circulating angiopoietin-2 is elevated in patients with neuroendocrine tumours and correlates with disease burden and prognosis. *Endocr Relat Cancer*. 2009;16:967–976.
202. Buchanan CF, Szot CS, Wilson TD, Akman S, Metheny-Barlow LJ, Robertson JL, Freeman JW, Rylander MN. Cross-talk between endothelial and breast cancer cells regulates reciprocal expression of angiogenic factors in vitro. *J Cell Biochem*. 2012;113:1142–1151.
203. Martinez-Lemus LA, Galiñanes EL. Matrix metalloproteinases and small artery remodeling. *Drug Discov Today Dis Models*. 2011;8:21–28.
204. Yasmin null, McEniery CM, Wallace S, Dakham Z, Pulsalkar P, Pusalkar P, Maki-Petaja K, Ashby MJ, Cockcroft JR, Wilkinson IB. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), MMP-2, and serum elastase activity are associated with systolic hypertension and arterial stiffness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:372.
205. Nakamura T, Ebihara I, Shimada N, Koide H. Effect of cigarette smoking on plasma metalloproteinase-9 concentration. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem*. 1998;276:173–177.
206. Burnham EL, Moss M, Ritzenthaler JD, Roman J. Increased fibronectin expression in lung in the setting of chronic alcohol abuse. *Alcohol Clin Exp Res*. 2007;31:675–683.
207. Corada M, Nyqvist D, Orsenigo F, Caprini A, Giampietro C, Taketo MM, Iruela-Arispe ML, Adams RH, Dejana E. The Wnt/beta-catenin pathway modulates vascular remodeling and specification by upregulating Dll4/Notch signaling. *Dev Cell*. 2010;18:938–949.
208. Chen J, Stahl A, Krah NM, Seaward MR, Dennison RJ, Sapielha P, Hua J, Hatton CJ, Juan AM, Aderman CM, Willett KL, Guerin KI, Mammoto A, Campbell M, Smith LEH. Wnt signaling mediates pathological vascular growth in proliferative retinopathy. *Circulation*. 2011;124:1871–1881.
209. Mofarrahi M, Sigala I, Vassilokopoulos T, Harel S, Guo Y, Debigare R, Maltais F, Hussain SNA. Angiogenesis-related factors in skeletal muscles of COPD patients: roles of angiopoietin-2. *J Appl Physiol Bethesda Md 1985*. 2013;114:1309–1318.

210. Brown JL, Cao ZA, Pinzon-Ortiz M, Kendrew J, Reimer C, Wen S, Zhou JQ, Tabrizi M, Emery S, McDermott B, Pablo L, McCoon P, Bedian V, Blakey DC. A human monoclonal anti-ANG2 antibody leads to broad antitumor activity in combination with VEGF inhibitors and chemotherapy agents in preclinical models. *Mol Cancer Ther.* 2010;9:145–156.
211. Falcón BL, Hashizume H, Koumoutsakos P, Chou J, Bready JV, Coxon A, Oliner JD, McDonald DM. Contrasting actions of selective inhibitors of angiotensin-1 and angiotensin-2 on the normalization of tumor blood vessels. *Am J Pathol.* 2009;175:2159–2170.
212. Huang H, Lai J-Y, Do J, Liu D, Li L, Del Rosario J, Doppalapudi VR, Pirie-Shepherd S, Levin N, Bradshaw C, Woodnutt G, Lappe R, Bhat A. Specifically targeting angiotensin-2 inhibits angiogenesis, Tie2-expressing monocyte infiltration, and tumor growth. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 2011;17:1001–1011.
213. Davis ME, Zuckerman JE, Choi CHJ, Seligson D, Tolcher A, Alabi CA, Yen Y, Heidel JD, Ribas A. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. *Nature.* 2010;464:1067–1070.
214. Lobov IB, Brooks PC, Lang RA. Angiotensin-2 displays VEGF-dependent modulation of capillary structure and endothelial cell survival in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:11205–11210.
215. Plate KH, Scholz A, Dumont DJ. Tumor angiogenesis and anti-angiogenic therapy in malignant gliomas revisited. *Acta Neuropathol (Berl).* 2012;124:763–775.
216. Werner N, Nickenig G. Influence of Cardiovascular Risk Factors on Endothelial Progenitor Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:257–266.
217. Teraa M, Sprengers RW, Westerweel PE, Gremmels H, Goumans M-JTH, Teerlink T, Moll FL, Verhaar MC. Bone Marrow Alterations and Lower Endothelial Progenitor Cell Numbers in Critical Limb Ischemia Patients. *PLoS ONE* [Internet]. 2013 [cited 2017 Jul 19];8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3561321/>
218. Foresta C, De Toni L, Di Mambro A, Garolla A, Ferlin A, Zuccarello D. The PDE5 inhibitor sildenafil increases circulating endothelial progenitor cells and CXCR4 expression. *J Sex Med.* 2009;6:369–372.
219. Wang X-X, Zhang F-R, Shang Y-P, Zhu J-H, Xie X-D, Tao Q-M, Zhu J-H, Chen J-Z. Transplantation of autologous endothelial progenitor cells may be beneficial in patients with idiopathic pulmonary arterial hypertension: a pilot randomized controlled trial. *J Am Coll Cardiol.* 2007;49:1566–1571.
220. De Ciuceis C, Rossini C, Tincani A, Airò P, Scarsi M, Agabiti-Rosei C, Ruggeri G, Caimi L, Ricotta D, Agabiti-Rosei E, Rizzoni D. Effect of antihypertensive treatment with lercanidipine on endothelial progenitor cells and inflammation in patients with mild to moderate essential hypertension. *Blood Press.* 2016;25:337–343.
221. Melchiorri AJ, Bracaglia LG, Kimerer LK, Hibino N, Fisher JP. In Vitro Endothelialization of Biodegradable Vascular Grafts Via Endothelial Progenitor Cell Seeding and Maturation in a Tubular Perfusion System Bioreactor. *Tissue Eng Part C Methods.* 2016;22:663–670.

Bibliografia

222. Noor R, Shuaib U, Wang CX, Todd K, Ghani U, Schwindt B, Shuaib A. High-density lipoprotein cholesterol regulates endothelial progenitor cells by increasing eNOS and preventing apoptosis. *Atherosclerosis*. 2007;192:92–99.
223. Nijati M, Gao Y, Abudurehman Z, Yu X, Li G. Relationship between the Level of Circulating Endothelial Micro-Particles in the Blood and Blood Lipid Content in Uyghur and Han Patients with Acute Coronary Syndrome. *Clin Lab*. 2015;61:1071–1075.
224. Masuda H, Kalka C, Takahashi T, Yoshida M, Wada M, Kobori M, Itoh R, Iwaguro H, Eguchi M, Iwami Y, Tanaka R, Nakagawa Y, Sugimoto A, Ninomiya S, Hayashi S, Kato S, Asahara T. Estrogen-mediated endothelial progenitor cell biology and kinetics for physiological postnatal vasculogenesis. *Circ Res*. 2007;101:598–606.
225. Hu FB, Grodstein F, Hennekens CH, Colditz GA, Johnson M, Manson JE, Rosner B, Stampfer MJ. Age at natural menopause and risk of cardiovascular disease. *Arch Intern Med*. 1999;159:1061–1066.
226. Mondul AM, Rodriguez C, Jacobs EJ, Calle EE. Age at natural menopause and cause-specific mortality. *Am J Epidemiol*. 2005;162:1089–1097.
227. Nevzati E, Shafighi M, Bakhtian KD, Treiber H, Fandino J, Fathi AR. Estrogen induces nitric oxide production via nitric oxide synthase activation in endothelial cells. *Acta Neurochir Suppl*. 2015;120:141–145.
228. Miller VM, Duckles SP. VASCULAR ACTIONS OF ESTROGENS: FUNCTIONAL IMPLICATIONS. *Pharmacol Rev*. 2008;60:210–241.
229. White RE. Estrogen and vascular function. *Vascul Pharmacol*. 2002;38:73–80.
230. Hutter R, Badimon JJ, Fuster V, Narula J. Coronary artery disease in aging women: a menopause of endothelial progenitor cells? *Med Clin North Am*. 2012;96:93–102.
231. Pirro M, Stingeni L, Vaudo G, Mannarino MR, Ministrini S, Vonella M, Hansel K, Bagaglia F, Alaeddin A, Lisi P, Mannarino E. Systemic inflammation and imbalance between endothelial injury and repair in patients with psoriasis are associated with preclinical atherosclerosis. *Eur J Prev Cardiol*. 2015;22:1027–1035.
232. Bartoloni E, Alunno A, Bistoni O, Caterbi S, Luccioli F, Santoboni G, Mirabelli G, Cannarile F, Gerli R. Characterization of circulating endothelial microparticles and endothelial progenitor cells in primary Sjögren’s syndrome: new markers of chronic endothelial damage? *Rheumatol Oxf Engl*. 2015;54:536–544.
233. Pirro M, Bocci EB, Di Filippo F, Schillaci G, Mannarino MR, Bagaglia F, Gerli R, Mannarino E. Imbalance between endothelial injury and repair in patients with polymyalgia rheumatica: improvement with corticosteroid treatment. *J Intern Med*. 2012;272:177–184.
234. Pirro M, Schillaci G, Paltriccina R, Bagaglia F, Menecali C, Mannarino MR, Capanni M, Velardi A, Mannarino E. Increased ratio of CD31+/CD42- microparticles to endothelial progenitors as a novel marker of atherosclerosis in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:2530–2535.

235. Han MK, Postma D, Mannino DM, Giardino ND, Buist S, Curtis JL, Martinez FJ. Gender and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2007;176:1179–1184.

Bibliografia

AGRAÏMENTS

Después de todo este tiempo sentada delante del ordenador escribiendo la Tesis, me encuentro, por fin, con la última hoja en blanco a rellenar.

En primer lugar me gustaría dar las gracias a mis directores de Tesis: Dr. Joan Albert Barberà y Dr. Víctor I Peinado. Joan Albert de tu he après a ser crítica i rigurosa amb el treball, a trobar el punt fort de les discussions dels papers i saber com enfocar-ho. Moltes gràcies per la confiança que has dipositat en mi durant aquests anys. Víctor, de ti he aprendido a ser práctica y eficaz, a saber que a veces menos es más y que, por tanto, en un paper no siempre hay que mostrar todos los resultados obtenidos y hay que saber seleccionar bien la información. Gracias también por resolver mis problemillas con los ordenadores y el sigmaplot.

Gracias a toda la gente del lab; a los que ya nos están, a los que llegaron hace poco y a los que lleváis conmigo unos años. Empezaré por los que formáis parte del lab ahora (por orden de antigüedad, que no de vejez). A Cristina (mi *Aldy*), gracias por todas las risas, los buenos momentos vividos, nuestros marujeos y por ayudarme con la micropartículas, ahora te has convertido en su heredera oficial. Olga, de tu he après a relativitzar les coses dolentes i saber veure el costat positiu. Gràcies per tota la teva ajuda. Tanja, many thanks for our conversations and your honesty and, of course, for your german classes!!. Valerie, thanks for your energy, motivation and for bringing Belgian biscuits and chocolate to the lab. Maribel, gracias por amenizar las comidas con tus capítulos diarios y por tu ayuda a la hora de optimizar los protocolos. Y por último, mi Vickita, eres una de las mejores personas que he conocido, ha sido un verdadero placer compartir *mesada* contigo durante este tiempo. Te voy a echar muuucho de menos, pero nos vemos a tu vuelta. Gracias también a toda la gente del laboratorio de Función Pulmonar, en especial a Isabel, gracias por estar siempre dispuesta a echar una mano y resolver cualquier duda clínica.

Quiero agradecer a todas aquellas personas, que aunque ahora no estén en el lab, se han cruzado conmigo durante este camino, en especial a: Melina, gracias por tu vitalidad, motivación y ganas de hacer ciencia. Eres la mejor anfitriona alemana que podíamos tener. Elisabet, vas ser la primera persona que vaig conèixer el primer dia d'aquesta aventura, gràcies per fer-me sentir com una més del grup des de l'inici. Roberto, muchas gracias por tu buen rollo y por ayudarme en todo momento. Nos vemos por Madrid. Y por último, como no podía ser de otra manera, mi querida Parrix! Has sido la persona con la que más tiempo he compartido durante esta Tesis y no podía haber tenido mejor suerte. Al poco de conocernos habíamos pasado de ser compañeras de trabajo a ser amigas. Gracias por cada uno de los

Agraïments

momentos compartidos (si la sala de cultivos del 501 hablara, jeje), por nuestras risas, conversaciones cómplices, viajes,... Y una infinidad de cosas más.

Y, pese a que no forméis parte del grupo, también quiero hacer mención a Cira y Nadia. Cira, gràcies per compartir amb mi aquesta última etapa, per escoltar-me, per ajudar-me, animar-me i per compartir confidències. Nadia, muchas gracias por tu buen rollo y tu alegría contagiosa.

También quiero dar las gracias a la Plataforma de Citometría, ya que gran parte de esta Tesis se ha generado allí. Isabel, moltes gràcies per la teva amabilitat, bon humor i per ajudar-me sempre amb un somriure. Cristina López, (*Ponchita*), gracias por todos los buenos momentos vividos delante del citómetro y por nuestras “*células vivas*”. También agradecer al Dr.Lluís de Jover la seva ajuda en l’anàlisi estadístic.

Ya en el ámbito personal, quiero agradecer a mis amigos todo el apoyo que me han dado, en especial a Irene por compartir toda una vida juntas y estar en todos los momentos clave de mi vida. Y por último, quiero dedicar esta Tesis a las personas más importantes de mi vida. Mis padres, no tengo palabras para agradeceros todo los valores que me habéis transmitido. Gracias por vuestro apoyo, amor, comprensión y por estar siempre a mi lado, tanto en lo bueno como en lo malo. Sin vosotros, ni esta Tesis, ni otras muchas cosas hubieran sido posible. Fer, gracias por recorrer conmigo casi media vida, por quererme, cuidarme, escucharme, aguantarme (que no es fácil) y, sobre todo, por la familia que hemos formado. Gracias también a tu familia, sobre todo, a mis suegros y mis cuñados. Finalmente, quiero dedicar esta Tesis al motor de mi vida; mis hijos. Gracias a mi hijo mayor por simplemente llegar a mi vida, por cada mirada, cada abrazo, cada palabra y por la felicidad que aportas a mi vida día a día. Gracias también a mi hija que viene de camino, “nos conoceremos” pronto, pero el hecho de sentirte dentro de mí durante esta etapa tan importante me da fuerzas e impulso para tirar adelante. ¡Os quiero muchísimo!

¡¡¡ MUCHAS GRACIAS A TODOS !!!