

Regulación de HIF-1 α por micropartículas de células tubulares proximales renales. Papel de COX y PGE₂.

Coral García Pastor¹, Ana B. Fernández Martínez¹, F. Javier de Lucio Cazaña¹

¹ Unidad de Fisiología humana, Departamento de Biología de Sistemas, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, 28871 Alcalá de Henares, Madrid, España.

Resumen:

Las micropartículas (MPs) presentes en diferentes líquidos corporales, proceden de invaginaciones de la membrana celular. Engloban diferentes factores reguladores celulares y se las considera como un nuevo mecanismo de comunicación celular. Estudios de nuestro laboratorio, han demostrado el efecto regulatorio del factor inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α un factor de transcripción génica) en células renales humanas de túbulo proximal (HK-2), tras el tratamiento con MPs procedentes de células endoteliales. Dicho aumento lleva asociado un mecanismo de amplificación de la señal mediado por la generación de nuevas MPs producidas por células HK-2, que regulan HIF-1 α de manera independiente. El presente trabajo, demuestra que las células HK-2 producen MPs en condiciones basales y que actúan como un sistema paracrino de regulación de HIF-1 α mediante una vía de señalización probablemente mediada por COX y PGE₂. Teniendo en cuenta la importancia de la PGE₂ y de HIF-1 α en diferentes procesos de daño renal, consideramos que las MPs son un mecanismo novedoso de regulación de HIF-1 α que debe ser estudiado con mayor profundidad en el contexto de la fisiología y patología renal.

Palabras clave: Micropartículas (MPs); factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α); prostaglandina E₂ (PGE₂).

Cita: García C, Fernández AB, Lucio FJ (2014) Regulación de HIF-1 α por micropartículas de células tubulares proximales renales. Papel de COX y PGE₂. Dianas 3(1): e20140903. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20140903 URI <http://hdl.handle.net/10017/15181>

Editores: María José Carmena y Alberto Domingo, Departamento de Biología de Sistemas, Unidad de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España.

Recibido: 27 de junio de 2014 A incluir en la edición del artículo

Copyright: © 2014 Coral García Pastor et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

*E-mail: coralgarciapastor@gmail.com



Introducción

La comunicación intercelular depende de factores solubles y contactos adherentes. Recientes estudios han incorporado un tercer mecanismo: la emisión de microvesículas, que contienen y transportan diferentes reguladores de la actividad de aquellas células que las captan [1]. Las micropartículas (MPs), objeto de nuestro estudio, son un tipo de microvesícula con un tamaño comprendido entre 0.1-1 μ m producidas por invaginaciones de la membrana plasmática y liberadas al espacio extracelular. Contienen receptores de membrana, proteínas, ácidos nucleicos y otras muchas sustancias, entre las que se encuentra la prostaglandina E₂ (PGE₂) [2]. La PGE₂ es un mensajero de vida corta, perteneciente a la familia de los eicosanoides, sintetizado a partir de la acción de las ciclooxigenasas (COX) sobre el ácido araquidónico. Presenta múltiples funciones tanto en la fisiología como en la patología de los tejidos del organismo. La PGE₂ actúa mediante su unión a receptores EP (EP1-EP4) pertenecientes a la familia de receptores de membrana acoplados a proteínas G [3]. Estudios recientes han demostrado que existen también receptores EP en el interior celular, siendo precisa la internalización de PGE₂ desde el medio extracelular por vía del transportador PGT [4]. Nuestro grupo ha demostrado que PGE₂ intracelular aumenta la expresión del factor inducible por hipoxia (HIF) en diferentes tipos celulares, incluyendo las células proximales tubulares renales [5]. HIF, un factor de transcripción heterodimérico, constituido por una subunidad β expresada constitutivamente y 2 subunidades α (HIF-1 α y/o HIF-2 α), muestra un papel fundamental como renoprotector en diversos modelos experimentales de enfermedad renal (nefropatía diabética, nefritis crónica anti-Thy, etc.) [6]. En este contexto, es interesante señalar que nuestro laboratorio también ha

demostrado que MPs de origen endotelial aumentan la expresión de HIF-1 α en células tubulares proximales humanas (HK-2) y que este aumento de la expresión se debe a un mecanismo mediado por PGE₂ [7]

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este trabajo se hipotetizó que las propias células proximales tubulares también producían MPs que podrían aumentar la expresión de HIF-1 α de manera paracrina en las células proximales tubulares vecinas mediante un mecanismo dependiente de PGE₂. El objetivo del presente trabajo fue comprobar la validez de la hipótesis expuesta.

Material y métodos

Reactivos. i) *Relacionados con el sistema de señalización de PGE₂*: PGE₂ (Sigma, 0,5-10 μ M), verde de bromocresol (inhibidor del transportador PGT, 50 μ M, Sigma), AH6809 (Antagonista de receptores EP, 10 μ M, Sigma), diclofenaco (Inhibidor de COX, 3 μ M, Cayman) y celecoxib (Inhibidor selectivo de COX-2, 20 μ M, Cayman) ii) *Anticuerpos*: anti-HIF-1 α (1:1.000, BD Biosciense), anti-COX-2 (1:1000, Sigma), anti- β -actina (1:50000, Sigma), cabra –anticonejo y conejo-antiratón (1:4000, Sigma) iii) *Colorantes*: CellTracker™ (Invitrogen, Colorante que tiñe el interior celular al metabolizarse en un producto impermeable a la membrana plasmática cuando se metaboliza en el interior celular)

Cultivo de células renales humanas de túbulo proximal (HK-2). Las células se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC). Las células HK-2 se cultivaron en medio DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina/estreptomina/amfotericina B, un 1% de glutamina (Invitrogen) y un 1% de Insulina-Transferrina-Selenio (Sigma). Las células se mantuvieron a 37°C en ambiente húmedo y con un 5% de CO₂.

Diseño experimental general.

Aislamiento de micropartículas producidas por células HK-2 en condiciones basales. Para obtener MPs se sembraron células HK-2 en frascos de cultivo. Cuando las células alcanzaron un 80-90% de confluencia, se incubaron durante 24 h en medio sin suero. A continuación, se recogió el medio, se fraccionó en alícuotas de 1 mL y se procedió a aislar las MPs por centrifugación. Para ello, se centrifugó primero a baja velocidad (500 x g, 5 min, 4°C) para eliminar restos celulares y el sobrenadante de esta centrifugación se realizó una segunda centrifugación (13.000 x g, 10 min, 4°C). Se eliminó el sobrenadante y las MPs se conservaron a 4°C hasta su utilización.

Producción de MPs procedentes de células HK-2 sometidas a diferentes tratamientos. 24 h tras la siembra, las células se lavaron y se añadió medio fresco sin suero. Seguidamente se realizó el tratamiento correspondiente, se lavaron 3 veces y se añadió medio sin suero fresco. Tras 24 h de incubación, se aislaron las MPs como se indica en el apartado anterior.

Incubación de células HK-2 con MPs. Tras aislar las MPs de células con o sin tratamiento previo, se procedió a estudiar su efecto sobre un segundo cultivo de células HK-2 (placas P6, confluencia 80-90%). Para ello, las MPs se resuspendieron en medio sin suero. En el caso de tener que hacer algún pretratamiento, las células se preincubaron con él antes de la adición de las MPs.

*Los experimentos 2a y 6b se realizan con concentraciones crecientes de MPs, desde la concentración 1 (MPs secretadas por las células del propio pocillo) hasta la concentración 2 (es decir, el doble de las MPs secretadas por el propio pocillo)

Técnicas analíticas

Western blot. Las células se lisaron en frío con un tampón lisis que contiene 50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,5% desoxicolato sódico y un cocktail de inhibidores de proteasas (Roche), y tras 30 min a 4°C se centrifugaron a 500 x g, 10 min, 4°C. Al sobrenadante se añadió tampón de carga que contiene 50% glicerol, 15% SDS, 25% β -mercaptoetanol a una molaridad de 3,5 M, 0,125% azul de bromofenol. Las proteínas se desnaturalizaron durante 5 min a 95 °C y se separaron por electroforesis en gel de acrilamida/bisacrilamida. Posteriormente, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa durante 60 min y se bloquearon durante 1 h en tampón leche: 5% leche, 0,002% Tween diluidos en Dulbecco's phosphate buffered saline (PBS). Posteriormente, se incubaron con los anticuerpos primarios correspondientes durante toda la noche, se lavaron 3 veces y se incubaron 1 h con el anticuerpo secundario y finalmente se incubaron con un sustrato

que proporciona quimioluminiscencia (Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents.) Tras la exposición, se reveló con autorradiografías.

Cámara transwell. Células se tiñen con Cell-Tracker durante 2 h a 37°C y se lavaron con PBS 3 veces. Posteriormente, se sembraron en la parte superior de una cámara transwell a razón de 100.000 células/pocillo. En la parte inferior de la placa se sembraron células HK-2 (20.000 células/pocillo) sobre un cristal de 12 mm². Tras 24 h de incubación, se realizó una inmunocitoquímica mediante la técnica posteriormente descrita.

Inmunocitoquímica. Las células sembradas sobre el cristal de 12 mm² se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 10 min se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.1% (10 min) y se lavaron con PBS. Las células se bloquearon con 5% de albumina de suero bovino (1 h, a temperatura ambiente). Se montaron en portas con Prolong Gold antifade reagent con DAPI (Un intercalante del DNA para teñir los núcleos). Finalmente, se visualizaron en microscopio confocal (LEICA TCS-SP).

RT-PCR semicuantitativa. El ARN total de las células HK-2 se aisló con Tri-Reagent (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. La retrotranscripción de ARN (RT) se llevó a cabo con 1 µg del ARN extraído usando la enzima Multi-Script transcriptasa reversa siguiendo el protocolo recogido en [8] A partir de 2 µL del producto final obtenido en la RT se amplificó el ADN por PCR de 36 ciclos utilizando primers específicos para HIF-1α: sentido: GAAAGCGCAAGTCCTCAAAG, antisentido TGGGTAGGAGATGGAGATGC. La separación de las bandas de amplificación se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y las bandas se visualizaron con una tinción con SafeView nucleic acid stain (NBS Biologicals) y exposición a luz UV (BioRad). La cuantificación de la expresión del gen HIF-1α se normalizó con β-actina sentido: AGAAGGATTCCTATGTGGGCG y antisentido: ATGTC CCAAGTTGGTGAC.

Citometría de flujo. Las MPs obtenidas de 1 mL de medio secretado se resuspendieron en 500 µL de PBS. Se analizaron 100 µL de la suspensión en el citómetro (FlowCytometer C6. BD Accuri) tras la adición de 25 µL de flow count fluorosphere (Beckman coulter), esferas que indican los eventos de 1 µm de tamaño en el diagrama de puntos (Log FSC-H vs Log SSC- H). La ventana que permitió contar el número de eventos se seleccionó por su cercanía a las microesferas de referencia para asegurar que los eventos analizados tuvieran un tamaño cercano al tamaño teórico descrito para las MPs.

Resultados

Células HK-2 secretan MPs.

Se aislaron las MPs de células HK-2 y se analizó su tamaño y complejidad por citometría de flujo. La figura 1a muestra la población de MPs aisladas y los tamaños de estas teniendo como referencia a flow count fluorosphere®, esferas fluorescentes que indican los eventos de un 1µm de tamaño (círculo rojo). Como se observa en la figura, las MPs tienen los tamaños esperados (Todas menores a 1µm).

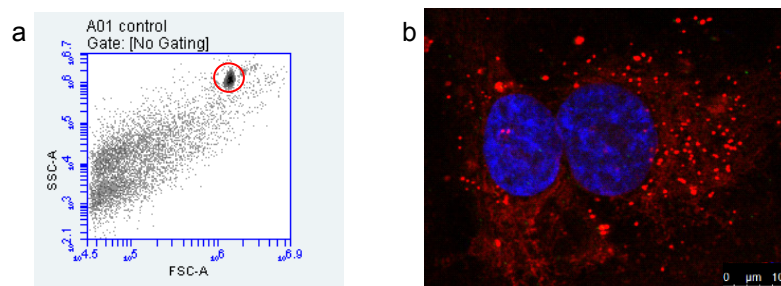


Figura 1. a) Citometría de flujo de las MPs. (Tamaño vs complejidad) El círculo rojo señala los eventos correspondientes a flow count fluorosphere® de 1 µm de tamaño. b) Visualización de las MPs secretadas por HK-2 teñidas con Cell-Tracker en la parte superior de una cámara transwell y su interacción con células HK-2 situadas en la cámara inferior.

Para la visualización de las MPs secretadas y demostrar la posible interacción con otras células HK-2, se realizó un experimento de cocultivo en el que se observa que las células HK-2, localizadas en la parte superior y teñidas con Cell-Tracker, son capaces de generar MPs que difunden hasta las colocadas en la cámara inferior e interaccionar con las células HK-2 sembradas en ella.

Las MPs producidas por células HK-2 aumentaron la expresión de HIF-1 α en un segundo cultivo de estas células.

La figura 2 representa el efecto de las MPs sobre la expresión celular de la proteína HIF-1 α . Se realizó un estudio dosis-respuesta usando como tratamiento diferentes cantidades de MPs y se observó los niveles de HIF-1 α en las células receptoras. La figura 2a indica que el máximo efecto apareció tras tratar las células HK-2 con 2x de MPs (Ver material y métodos). Utilizando una concentración de 2x de MPs, se realizó un tiempo respuesta del tratamiento con MPs, y se encontró que el efecto sobre la expresión de HIF-1 α era dependiente del tiempo de incubación. (Fig. 2 b).

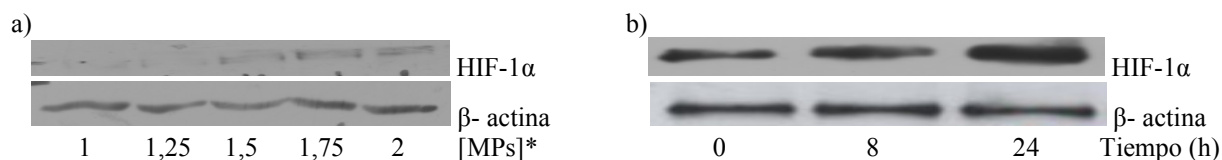


Figura 2. Análisis de la expresión de HIF-1 α por Western blot a) Efecto de concentraciones crecientes de MPs sobre la expresión de HIF-1 α en un segundo cultivo de células HK-2 tras 24 h de tratamiento. b) Tiempo-respuesta de la expresión de HIF-1 α tras incubación con una concentración 2x de MPs resuspendidas.

Tras comprobar que las MPs incrementaban la expresión de HIF-1 α , analizamos la contribución de mecanismos transcripcionales. Se realizó una incubación de células HK-2 tratadas con MPs durante diferentes tiempos y se aisló su ARNm y se analizó mediante RT-PCR semicuantitativa. La figura 3 muestra que la incubación con MPs resultó en un aumento de la expresión de ARNm de HIF-1 α , acorde con la contribución de mecanismos transcripcionales al aumento de la expresión de HIF-1 α .

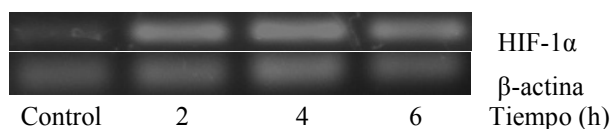


Figura 3. Expresión del ARNm de HIF-1 α . Analizado mediante RT-PCR semicuantitativa

Papel de la vía COX-2/PGE₂

Modulación de la actividad de las MPs por la vía COX-2/PGE₂ en las células productoras de MP.

Para analizar si las MPs producidas por células HK-2 eran dependientes de PGE₂, para producir el aumento de la expresión de HIF-1 α en las células productoras, se quiso analizar si un aumento de los niveles de PGE₂ en las células productoras aumentaba la capacidad de las MPs producidas por células HK-2 en un segundo cultivo. Para ello, se incubaron células HK-2 con diferentes concentraciones de PGE₂ y las MPs que produjeron se utilizaron para incubar con ellas un segundo cultivo en el que analizamos su efecto sobre la expresión de HIF-1 α . La figura 4 muestra que las MPs indujeron un aumento de la expresión de HIF-1 α . (Análisis por Western blot)

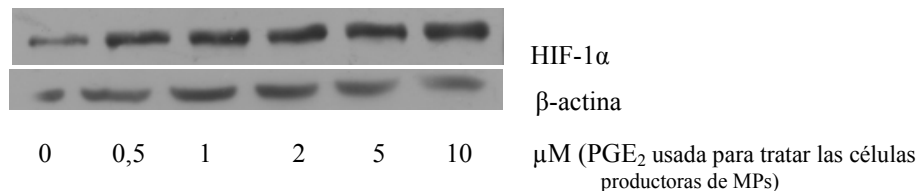


Figura 4. Expresión de HIF-1 α en células HK-2 tratadas con MPs procedentes de células tratadas con PGE₂ (Análisis de Western blot)

A continuación se quiso analizar si la actividad COX-2 de las células productoras de MPs, estaba implicada en la capacidad de estas para aumentar la expresión de HIF-1 α en un segundo cultivo. Para ello, se incubaron células HK-2 con/sin celecoxib (un inhibidor de COX-2) y las MPs que produjeron se incubaron sobre un segundo cultivo en el que se analizó su efecto en la expresión de HIF-1 α . La figura 5 muestra que la expresión de HIF-1 α inducido por MPs disminuía, pero no desaparecía, tras el tratamiento con el inhibidor de COX-2 (Análisis Western blot)

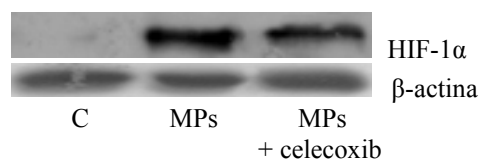


Figura 5. Análisis de la expresión de HIF-1 α por Western blot en células tratadas con MPs procedentes de células preincubadas durante 1h con el inhibidor de la COX-2, celecoxib. (20 μ M).

Modulación de la actividad de las MPs por la vía COX-2/PGE₂ en las células receptoras de MP.

Para estudiar si en las células receptoras de MPs, el efecto producido era mediado por PGE₂, igual que sucedía en las células productoras, se procedió al pretratamiento de las células captadoras de MPs con AH6809 (antagonista de los receptores EP) y/o diclofenaco (Inhibidor de la actividad COX) previamente a la incubación con MPs. Como se muestra en la figura 5a, todos los tratamientos provocaron una disminución de la expresión de HIF-1 α , analizado mediante Western blot. El hecho que el inhibidor de COX1/2 (diclofenaco) no sinergizara con el antagonista de los receptores EP (AH6809) para inhibir la expresión de HIF-1 α sugiere que el efecto de las MPs sobre las células receptoras era dependiente de PGE₂.

Dado que estos resultados sugerían una implicación de COX-2 en el mecanismo de aumento de la expresión de HIF-1 α por MPs se analizó si las MPs también producían una modificación de la expresión de COX-2 en las células receptoras. Los resultados mostrados en la figura 6b muestran que las MPs aumentaban la expresión de COX-2 de forma dosis dependiente.

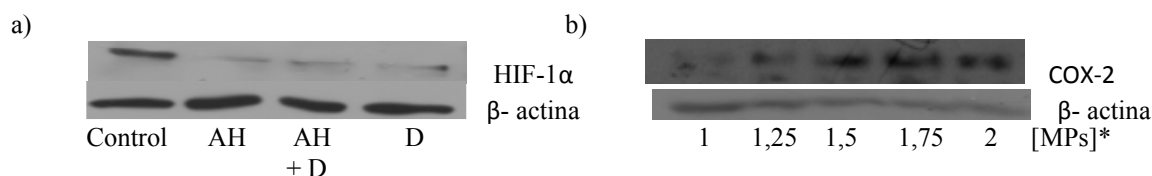


Figura 6. a) Efecto del pretratamiento con AH6809 (AH) y/o diclofenaco (D) sobre el aumento de la expresión de HIF-1 α inducido por MPs analizado por Western blot. b) Análisis de la expresión de COX-2 por Western blot tras el tratamiento con distintas concentraciones de MPs (*Ver material y métodos)

Para analizar si la acción de PGE₂ es a través de la unión a sus receptores intracelulares, se utilizó el verde de bromocresol (un inhibidor de PGT). Nuestros resultados (Fig. 7) indicaron que el inhibidor de PGT previno el aumento de HIF-1 α inducido por MPs. Estos resultados sugieren la participación de PGE₂ intracelular en la regulación de HIF-1 α producida por MPs.

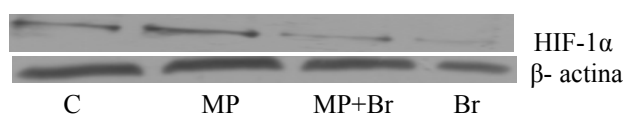


Figura 7. Análisis de la expresión de HIF-1 α por Western blot, en células pretratadas con verde de bromocresol (Br) previa al tratamiento con MPs. Analizado por Western blot.

Discusión

Recientes estudios han demostrado el efecto de MPs procedentes de células endoteliales sobre células HK-2, su implicación en enfermedades renales y el papel fundamental que juega HIF-1 α en este contexto. [7, 9] El presente estudio pretende demostrar cómo las células proximales tubulares regulan de forma paracrina su expresión de HIF-1 α mediante la producción de sus propias MPs.

Como se ha demostrado en el presente trabajo, las células HK-2 generan MPs en condiciones basales, y estas MPs regulan la expresión de HIF-1 α en otras células HK-2 (figura 2). Poco se sabe del mecanismo de acción de las MPs producidas por cualquier tipo de células. Durante nuestro estudio hemos observado que las MPs eran capaces de entrar al interior celular de las células receptoras (Figura 1b) y localizarse en zonas cercanas al

núcleo, aunque su mecanismo de entrada todavía no se ha determinado. La bibliografía recoge datos acerca de la elevada especificidad de las MPs por células receptoras concretas [2], sin embargo, ensayos aún no publicados de nuestro grupo de trabajo han mostrado que MPs procedentes de diferentes líneas celulares no renales, producen aumento de HIF-1 α en células HK-2 por lo que cuestionamos esa especificidad.

El aumento de la expresión de HIF-1 α en hipoxia sucede por estabilización de la proteína. Sin embargo, cuando se trata del aumento de su expresión inducido por mediadores inflamatorios, los mecanismos transcripcionales son la causa habitual del aumento. [10] De hecho, en el caso de las células HK-2 tratadas con MPs, el mecanismo causante del aumento de la expresión de HIF-1 α fue de carácter transcripcional (figura 3). Estudios anteriores de nuestro laboratorio habían demostrado que la expresión de HIF-1 α era dependiente de PGE₂ y que ésta, aumentaba la expresión de HIF-1 α de manera transcripcional [4,5]. Basándonos en estos estudios previos, hipotetizamos que las MPs debían actuar por un mecanismo dependiente de PGE₂. Para su confirmación, procedimos a modificar las condiciones de formación de las MPs añadiendo PGE₂ a las células productoras de MPs y observamos que el tratamiento con PGE₂ aumentaba la expresión de HIF-1 α en las células receptoras (Figura 4), lo que confirma nuestra hipótesis. Las propias MPs producidas basalmente, por las células HK-2 pierden parte de su potencia para inducir HIF-1 α , en un segundo cultivo, si previamente se tratan con celecoxib (Figura 5). Al tratarse de células basales, hipotetizamos que la implicación de COX-1 también debe ser importante en la regulación de HIF-1 α mediada por MPs a falta de ensayos concluyentes. Ensayos no publicados de nuestro laboratorio muestran que al incubar con PGE₂ (1h) MPs aisladas, se produce un aumento de la expresión de HIF-1 α en las células tratadas con esas MPs. También estudiamos si la COX/PGE₂ de las células receptoras desempeñaba algún papel en el efecto producido por las MPs sobre la expresión de HIF-1 α . Para ello, i) estudiamos la respuesta en términos de expresión de COX-2 (Figura 6b) donde observamos que las MPs producían una inducción de esta y ii) analizamos el efecto de la inhibición de COX y del antagonismo de los receptores EP donde se observó un descenso de los niveles de HIF-1 α en las células pretratadas (figura 6a). Estos resultados demuestran que COX/PGE₂ están implicados en el mecanismo mediante el cual las MPs aumentan la expresión de HIF-1 α .

Resultados llamativos de nuestro estudio han sido los obtenidos tras el tratamiento con verde de bromocresol (inhibidor del transportador de PGE₂, PGT, y por tanto, evita la entrada de PGE₂ al interior celular) por la disminución de la expresión de HIF-1 α producida (Figura 7). Artículos anteriores, han demostrado que en algunas líneas celulares, entre ellas HK-2, los receptores EP necesarios para el aumento de la expresión de HIF-1 α se localizan en el interior celular, en contraposición con lo hasta entonces creído [5]. Nuestra hipótesis, a falta de confirmación, sobre el efecto del verde de bromocresol sobre la actuación de las MPs, es que las MPs generan una primera estimulación de COX-2, productora de PGE₂ que sale al exterior celular y que debe volver a entrar para producir el aumento de la expresión de HIF-1 α , aunque también es posible que el verde de bromocresol inhiba la entrada de las MPs por algún mecanismo desconocido.

Para concluir cabe destacar la importancia de este mecanismo de comunicación a través de MPs, poco estudiado hasta la actualidad, debido a que podría ayudar a comprender mejor biología celular, sobre todo en situaciones patológicas donde la cantidad de MPs secretadas por las células se ve ampliamente aumentada.

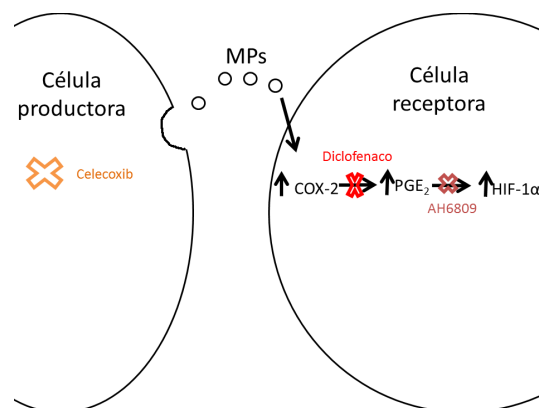


Figura 8. Propuesta esquemática del mecanismo de regulación de HIF-1 α en HK-2 por MPs secretadas por HK-2 en condiciones basales.

Bibliografía

- [1] Ratajczak J., Wysoczynski M. et al. 2006. Membrane-derived microvesicles: important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. *Leukemia* (20): 1487–1495.
- [2] Camussi G., Deregibus M. C. et al. 2010. Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. *Kidney Int.* (78): 838–848.
- [3] Legler D. F., Bruckner M. et al. 2010. Prostaglandin E2 at new glance: Novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. *Int J Biochem Cell Biol.* (42): 198–201.
- [4] Fernández-Martínez A.B., Arenas Jiménez M.I., et al. 2012. Retinoic acid increases hypoxia-inducible factor-1 α through intracrine prostaglandin E2 signaling in human renal proximal tubular cells HK-2. *Biochim Biophys Acta.* (1821): 672-83.
- [5] Fernández-Martínez AB., Jiménez MI, et al. 2012. Intracrine prostaglandin E2 signalling regulates hypoxia-inducible factor-1 α expression through retinoic acid receptor- β . *Int J Biochem Cell Biol.* (44): 2185-2193.
- [6] Nangaku M., Inagi R. et al. 2008. Hypoxia and hypoxia-inducible factor in renal disease. *Exp. Nephrol.* (110): e1–e7.
- [7] Fernández-Martínez A.B., Valdehita-Torija A., et al. 2014. Microparticles Released by Vascular Endothelial Cells Increase Hypoxia Inducible Factor Expression in Human Proximal Tubular HK-2 Cells. *Int J Biochem Cell Biol.* (53): 334-342.
- [8] Vacas Olivas, E. 2012. Receptores y vías de señalización de VIP como dianas terapéuticas en el cáncer renal. Alcalá de Henares. Tesis doctoral.
- [9] Bruno S., Grange C. et al. 2012. Microvesicles Derived from Mesenchymal Stem Cells Enhance Survival in a Lethal Model of Acute Kidney Injury. *Plos One.* (7): e33115
- [10] Zhou J y Brüne B. 2006. Cytokines and hormones in the regulation of hipoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha). *Cardiovasc Hematol Agents Med Chem.* (4):189-97