

Micropartículas: mediadores del daño endotelial en la insuficiencia renal crónica.

Silvia Santos Suárez^{1*}, Matilde Alique Aguilar¹, Carlos Luna Ruiz¹, Rafael Ramírez Chamond¹

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

Resumen

En pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) existe una disfunción endotelial que supone uno de los mayores riesgos sobre la incidencia y prevalencia de enfermedad cardiovascular. La relación entre insuficiencia renal crónica y enfermedad vascular es un hecho desde hace décadas. La acumulación de toxinas urémicas en IRC, provoca un daño endotelial que se ve reflejado entre otras cosas, en la variación, composición y número de micropartículas (MPs) que liberan las células del mismo. Las micropartículas, son vesículas de membrana que oscilan entre 100-1000 nm de tamaño que participan en el intercambio de señales entre distintas células. Las MPs producidas por las células endoteliales activadas reflejan el daño endotelial pudiéndose considerar un biomarcador del mismo. En nuestro estudio hemos desarrollado un modelo *in vitro* de IRC con indoxil sulfato y p-cresol, dos de las toxinas más importantes en esta enfermedad, para evaluar el papel de las micropartículas endoteliales (MPEs) como mediadores del daño endotelial. También queremos determinar que procesos celulares pueden verse alterados por MPEs de génesis patológica. Los resultados obtenidos muestran que las MPEs producidas bajo el efecto de las toxinas anteriormente mencionadas median en el daño endotelial por disminución en la proliferación y reparación de herida y un aumento de la senescencia. Además también hemos demostrado que la producción de MPEs liberadas bajo el efecto de ambas toxinas difiere de las producidas por las células en condiciones fisiológicas, no sólo en número, sino también en concentración proteica.

Palabras clave: Micropartículas endoteliales; insuficiencia renal crónica; enfermedad vascular; toxinas urémicas; indoxil sulfato; p-cresol.

Cita: Silvia Santos Suárez, Matilde Alique Aguilar, Carlos Luna Ruiz, Rafael Ramírez Chamond (2015) Micropartículas: mediadores del daño endotelial en la insuficiencia renal crónica. *Dianas* 4(1): e20150911. ISSN 1886-8746 journal.dianas.e20150911. 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: 26 de junio de 2015

Copyright: © 2015 Silvia Santos Suárez, et al. Este es un artículo open-access distribuido bajo los términos de una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas 4.0 Internacional. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>

*E-mail: silvia_santoss@hotmail.com



Introducción

Los enfermos con insuficiencia renal crónica (IRC), presentan una elevada tasa de enfermedad cardiovascular, que representa la principal causa de morbilidad y mortalidad en este colectivo. Esta alta incidencia, tiene lugar como consecuencia de la disfunción endotelial causada por diferentes factores presentes en la IRC, pero sobre todo, por las toxinas urémicas que se encuentran en continuo contacto con el endotelio [1]. Este hecho ha llevado a proponer que la identificación de biomarcadores precoces de daño endotelial podría ser clave para paliar la enfermedad cardiovascular (ECV) asociada a la IRC.

El daño endotelial asociado a la IRC se ocasiona por la circulación de toxinas urémicas que en condiciones fisiológicas son eliminadas por la orina. Estas toxinas viajan en el torrente sanguíneo de manera libre o unidas a proteínas séricas [2]. Hasta la fecha se han identificado más de 100 toxinas urémicas, pero dos de las más importantes son el indoxil sulfato (IS) y el p-cresol [3]. Asimismo, las células endoteliales dañadas liberan micropartículas (MPs) al torrente sanguíneo. La cuantificación de estas MPs ha sido propuesta como un elemento de ayuda al diagnóstico clínico reflejando la magnitud del daño endotelial [4].

El p-cresol es un producto final del catabolismo proteico producido por bacterias intestinales [5] y su presencia en la sangre está descrita en la enfermedad cardiovascular [6]. Esta toxina induce la inhibición

de la proliferación [7], incrementa la permeabilidad de la membrana plasmática y disminuye la angiogénesis en las células endoteliales [8].

Por otra parte, se ha demostrado que el IS tiene efecto negativo sobre la proliferación celular y puede estar estrechamente ligado con la aterosclerosis y la enfermedad arterial periférica en pacientes con insuficiencia renal crónica [9].

Las vesículas extracelulares son secretadas por los diferentes tipos celulares, diferenciándose principalmente por su tamaño y entre las que se encuentran las MPs, exosomas y cuerpos apoptóticos. Las MPs son pequeñas vesículas liberadas por distintos tipos celulares, de un diámetro de 100-1000 nm [2]. Un paso crucial en la formación de las MPs es la pérdida de asimetría de la membrana plasmática, exponiendo la fosfatidilserina y permitiendo su detección por citometría de flujo por anexina V, un ligando que se une a la fosfatidilserina y actuando como un marcador [10]. En situaciones patológicas pueden encontrarse gran cantidad de MPs, especialmente asociadas a inflamación o coagulación [11]; por eso se puede decir que las MPs reflejan el daño endotelial bajo estas condiciones. Por lo que su utilidad como marcadores diagnósticos de daño celular es una realidad hoy en día.

Estas MPs participan en la comunicación intercelular, forzando la aparición de nuevos términos para referirnos a este tipo de comunicación entre células. El término sugerido cuando en estas MPs se secreta un receptor activo que puede transferirse hasta su célula diana se conoce como “reecerino” [12]. Después de esta liberación, las MPs se unen y fusionan con su célula diana a través de interacciones entre ligando-receptor para transferir su contenido [13, 14]. El contenido de las MPs está constituido por factores de crecimiento, proteínas, mRNA, microRNAs y marcadores de membrana de las células de origen [15]

Hay dos mecanismos principales por los que las MPs llevan a cabo su función en la señalización intercelular. En un primer lugar, pueden afectar a las propiedades celulares actuando directamente a través de sus ligandos sobre receptores de la célula diana [6]. En un segundo lugar, median en la señalización por transferencia directa de parte de su contenido o componentes a la célula receptora. Tras esta interacción se activan o inhiben las vías intracelulares de la célula diana o incluso el cambio en su fenotipo [14]. Algunos tipos de MPs activan rutas de supervivencia celular por fosforilación de ERK1/2 y la degradación de IκB-alfa [10] y en ocasiones, incluso tienen un efecto antagónico como el trabajo de Soletí R. [16]. Todos estos estudios ponen de manifiesto que la respuesta generada por las MPs depende no sólo de su concentración, sino también de la vía de estimulación y del estado de activación de la célula de origen. De este modo las MPs desempeñan un papel importante tanto en condiciones fisiológicas como patológicas presentando propiedades diferentes dependiendo del contexto en las que son liberadas, por lo que la comunicación intercelular en la que están involucradas podría verse alterada por el ambiente que les rodea [13]. Por lo que evaluar el papel que tienen las MPs liberadas por las células en condiciones patológicas abre nuevas posibilidades terapéuticas convirtiéndolas en potenciales marcadores de diagnóstico.

En este estudio hemos planteado como hipótesis que las toxinas urémicas condicionan de forma cuantitativa y/o cualitativa la producción de MPEs, y en consecuencia, hemos realizado un estudio *in vitro* para valorar la producción de MPs inducida por las toxinas urémicas IS y p-cresol en las células endoteliales (HUVEC), caracterizando diferentes procesos celulares como proliferación, reparación deherida y senescencia celular.

Materiales y métodos

Cultivo celular

HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cell), se utilizó como modelo de endotelio humano. Se cultivó a 37 ° C, 5% de CO₂ en medio EBM (Lonza), junto con los suplementos de crecimiento celular (EGM, Lonza) y 10% de suero bovino fetal (FBS).

Antes de realizar los experimentos, las células fueron privadas de FBS con el fin de que todas las células se encuentren en el mismo estado de quiescencia. Para la realización de los experimentos únicamente se utilizan pases celulares comprendidos entre 2-8.

Obtención y aislamiento de MPs

Células HUVEC fueron tratadas con una concentración de 5 µg/ml de IS (Sigma Aldrich) y 250 µg/ml de p-cresol (Sigma Aldrich). Tras 24 horas de incubación con estas toxinas se recogió el sobrenadante. El sobrenadante fue centrifugado a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C para obtener las MPs. Las MPs fueron lavadas dos veces con PBS y resuspendidas en un volumen conocido de PBS conservándose a 4°C hasta su uso.

Caracterización y cuantificación de MPs

Se toman 5 µl de las MPs aisladas previamente, se añaden 5 µl anexinaV (FITC Annexin V, BD Pharmingen), en Annexin V Binding Buffer 1x (BD Pharmingen). Se incubó 20 minutos a temperatura

ambiente en oscuridad, y se procedió a la caracterización mediante citometría de flujo (Citómetro BD Accuri™ C6), separando las micropartículas endoteliales (MPEs) de debris por sus marcadores específicos (CD31+/Annexin V+) y por su tamaño y complejidad (Log FSC-H vs Log SSC-H), utilizando como referencia microesferas fluorescentes de 1µm de diámetro (Flow-Count Fluorospheres, Beckman Coulter).

Cuantificación de proteínas por método BCA

BCA Protein Assay (Thermo Scientific) fue utilizado para determinar la concentración proteica. Las muestras se incubaron en placa de 96 pocillos con 200 µl de BCA durante 30' a 37°C y en oscuridad, la lectura se realizó a 562 nm.

Western Blot.

Las células se siembran en placas p60 (250.000 células/placa) y se tratan durante 5, 10, 20, 30 y 60 minutos para determinar la activación de ERK y durante 8, 24 y 48 para determinar la expresión de ciclina D1. La concentración de tratamiento fue de 1000 MPEs/ml. Después se extraen las proteínas celulares con tampón de lisis (CytoBuster, Millipore), el cuál se preparó con inhibidores de proteasas y fosfatasa (ROCHE). Mediante el método BCA Protein Assay se determinó la cantidad total de proteína existente en el sobrenadante de la lisis celular. Se tomó 20 µg cada muestra para su separación en un gel al 10% SDS-PAGE, se transfieren a membranas de nitrocelulosa de 0,2 µm (BIORAD) durante 30 minutos, se bloquean con una solución al 5% de leche en TTBS 1X, durante 1h a temperatura ambiente, e incuban con el anticuerpo primario p-ERK 1/2 (anticuerpo monoclonal de ratón, sc-7383, SCBT) dilución 1:1000 o anticiclina D1 (anticuerpo monoclonal de conejo, RM-9104-SO, Thermo Scientific) dilución 1:1000 durante toda la noche a 4°C. Las membranas se lavaron con TTBS 1x y posteriormente fueron incubadas con el anticuerpo secundario para ERK (anticuerpo de anti-ratón) y para ciclina D1 (anticuerpo de anti-conejo) durante 1h a temperatura ambiente. Finalmente las bandas se detectan con las películas de revelado por quimioluminiscencia (ECL; Luminata Crescendo Western HRP substrate, Millipore). La cuantificación de la intensidad de banda se determina utilizando el software ImageJ.

El control de carga utilizado para ciclina D1 fue β-actina (sc-47778, SCBT) y para p-ERK fue ERK 2 total (sc-142, SCBT).

Ensayo de migración

Se realizó una herida sobre la monocapa de células con una punta de pipeta amarilla. Posteriormente se retiró el medio para eliminar con él los restos celulares generados y las células no adheridas. Se añadió el nuevo medio con sus respectivos tratamientos. Se realizaron fotografías a tiempo de 0, 2, 4, 6, 8, y 24h para ver como avanza el cierre de la herida.

Para el análisis de este ensayo fue necesario la utilización del software Optika Vision Pro. Mediante este programa se toman medidas del ancho de la herida a los tiempos mencionados, siendo fundamentales para el análisis los valores a tiempo 0 y a las 24h. Estos dos valores permiten valorar el porcentaje de cierre de la herida.

Ensayo de angiogénesis en Matrigel

Se utilizó el sustrato Matrigel (Corning), matriz tridimensional sobre la cual las células endoteliales forman vasos. Se pipeteó 10 µl del sustrato de Matrigel en cada uno de los 15 pocillos que componían una placa especial para ensayos de angiogénesis (µ-Slide Angiogenesis, IBIDI). Para permitir la polimerización se incubó a 37° C y a 5% de CO2 durante 30 minutos.

Se sembró un total de 5000 células por pocillo en un volumen total de 50 µl incluyendo nuestro tratamiento. Se dejó incubar y se realizaron fotos a diferentes tiempos para su posterior cuantificación. Se realizaron los experimentos por triplicado en cada tratamiento.

Para el análisis fue necesario establecer distintos controles. Se estableció un control (células sin tratar) y un control positivo (FBS) los cuales inducen la formación de vasos. El software que se utilizó para el análisis fue Image J.

Ensayo citoquímico de senescencia por tinción de β-galactosidasa

Se utilizó un kit de senescencia (Senescence detection kit, MBL). Las células fueron sembradas en placa de 12 pocillos y tratadas durante 24 horas. Posteriormente las células fueron fijadas con la solución de fijación (1x) durante 10-15' a temperatura ambiente, se lavó dos veces con 1 ml de PBS (1x) y se añadió la solución de tinción preparada con X-gal a 20x disuelta en DMSO, a cada pocillo. Se dejó incubar durante 24 horas a 37°C y a una atmósfera de 5% de CO2. Se realizó fotografías utilizando una cámara acoplada a un microscopio analizando 10 fotos por pocillo.

Unión de MPEs a la célula endotelial

HUVEC se sembró en placas de 6 pocillos, fueron deprivadas de suero durante la noche y se incubaron con MPEs durante 8 horas. Las MPEs fueron teñidas con celltraker (Invitrogen), se incuban 2 horas en oscuridad y a 37°C. Tras la incubación fueron lavadas dos veces con PBS estéril, se resuspenden en PBS y se añadieron al cultivo celular. HUVEC se fijó con paraformaldehído al 2% y PBS durante 10' a temperatura ambiente. Tras este tiempo se le añade 0,1% de tritón y PBS durante 10' a temperatura ambiente. Se bloquea con 3% de BSA y PBS, durante 30' a temperatura ambiente. Se añade el anticuerpo primario, la faloidina, que es un marcador de citoesqueleto, que se incubó 2 horas a 37°C. Se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante 1 hora a 37°C con el anticuerpo secundario, se lavó nuevamente tres veces con PBS. Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Se realizaron fotos al microscopio confocal (Leica TSC SP5)

Análisis de imagen

Las fotos de los ensayos de angiogénesis y de herida fueron realizados mediante el software Optika Vision Pro y analizadas mediante el programa de análisis de imagen Image J, al igual que los Western Blot.

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se llevó a cabo utilizando el programa informático GraphPad Prism 5. Todos los experimentos se repitieron al menos dos veces. Todos los datos se encuentran representados como media ± error estándar de la media. Para comparaciones múltiples se utilizó la ANOVA, aunque de manera general se ha utilizado el test de Bonferroni. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas a $P < 0,05$.

Resultados

Incremento en la producción de MPEs y en su contenido proteico por células endoteliales (HUVEC) tratadas con p-cresol e IS

HUVEC fue tratada con p-cresol e IS para generar MPEs *in vitro*. Las MPEs fueron cuantificadas por citometría de flujo a las 24 horas de tratamiento, contando eventos positivos para anexina V de cultivos celulares sin tratamiento, con p-cresol e IS (Figura 1A). Se observó un incremento en el número de MPEs producidas y liberadas cuando tratamos a nuestras células con IS (* $P < 0,05$), pero hay un incremento mucho mayor en el caso del p-cresol (** $P < 0,001$).

Además se determinó la concentración de proteínas de las MPEs bajo estas tres condiciones y los resultados fueron expresados en relación a la concentración proteica de 5×10^5 MPEs (Figura 1B). En este caso se observa una tendencia al alza de la expresión proteica que se corresponde con el incremento de la producción de MPs en los tratamientos con las toxinas urémicas

Por último, se llevó a cabo una tinción para evaluar como las MPEs usadas en los tratamientos (en rojo) se integran dentro de la célula endotelial (citoesqueleto en verde) tras 8 horas de tratamiento. En la Figura 1C, se observa la incorporación de MPEs a HUVEC a las 8 horas.

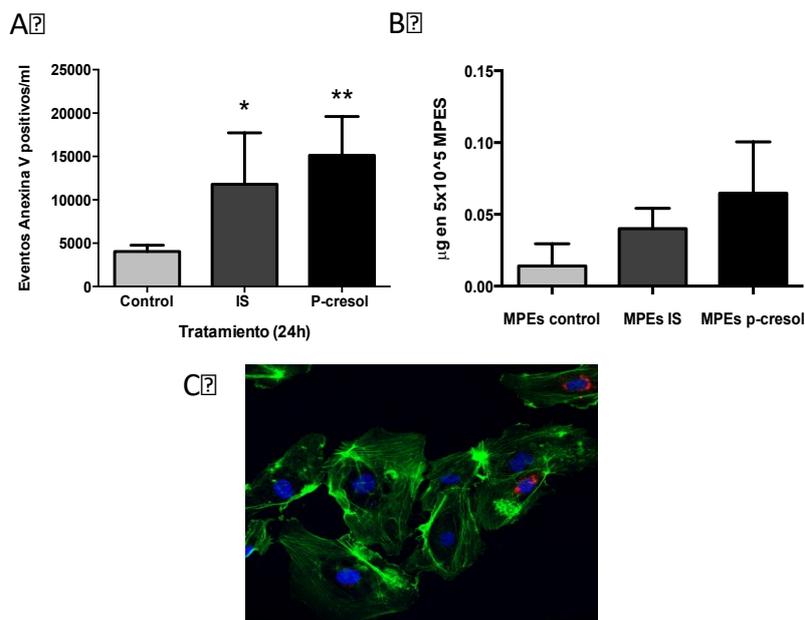


Figura 1A: Cuantificación de ventos Anexina V positivos/ml (n=4, por triplicados), Figura 1B: Cantidad de proteínas por 5×10^5 MPEs (n=2, por duplicados). Figura 1C: Fotografía al microscopio confocal a las 8 horas tras tratamiento con MPEs. Los núcleos se encuentran teñidos en azul, las MPEs en rojo y el citoesqueleto en verde.

Ensayo de migración celular

En este ensayo las MPEs sin tratamiento producen el cierre completo de la herida (100%), mientras que al utilizar MPEs producidas en condiciones patológicas, se produce una disminución en la capacidad para cerrar la herida a las 24 horas. Las MPEs obtenidas al tratar las células con IS, el porcentaje de cierre es de 63,43% (*P<0,05), mientras que en el tratamiento con MPEs obtenidas al tratar las células con p-cresol, el porcentaje de cierre es de 52,69% (**P<0,001). De modo que existe un cierre incompleto al utilizar MPEs patológicas. Estos datos se encuentran representados en la Figura 2A.

También se representó la progresión en el tiempo del cierre de la herida, donde se observó que en el caso de MPEs control el cierre se produce mucho más rápido que en el resto de condiciones. Además, con las MPEs obtenidas tras estimular las células con p-cresol el cierre de herida se estabiliza aproximadamente a las 6 horas (Figura 2B)

En la Figura 2C se muestra el ancho de la herida a tiempo 0 y a las 24 horas.

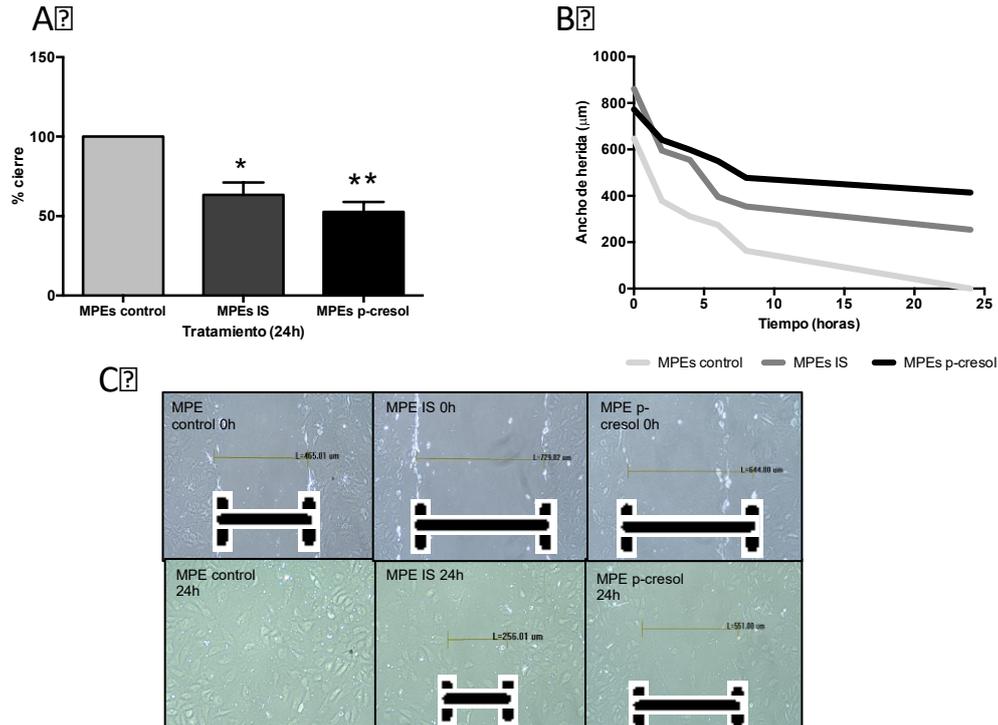


Figura 2A: Porcentaje de cierre de la herida (n=3, por triplicados), Figura 2B: Velocidad de cierre de la herida (n=3, por triplicados). Figura 2C: Fotografías del ancho de la herida a tiempos 0 y 24 horas.

El tratamiento con MPEs liberadas tras la estimulación con IS y p-cresol aumentan la senescencia en células endoteliales

Se observó un incremento de células senescentes al emplear MPEs procedentes de células tratadas con IS y p-cresol siendo significativa en el caso de MPEs p-cresol (**P<0,05). La Figura 3A muestra la relación de células senescentes entre el total de células.

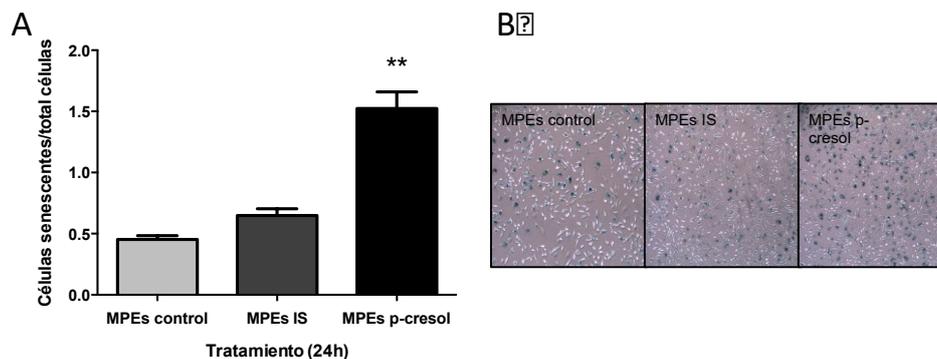


Figura 3A: Relación de células senescentes entre el total de células (n=3, por triplicados). Figura 3B: Fotografía con células teñidas por la acción de la β-galactosidasa a las 24 horas.

Disminución en la expresión de ciclina D1 en células endoteliales (HUVEC) al tratar con MPEs liberadas al estimular células HUVEC con IS y p-cresol

Se determinó la expresión de ciclina D1, se trata de una proteína involucrada en la progresión del ciclo celular. La expresión de ciclina D1 se ve aumentada cuando la célula está proliferando. Los datos obtenidos muestran un descenso en la expresión de ciclina D1, más patente a tiempos largos (24 y 48h) frente a tiempos cortos (8h), al emplear MPEs liberadas tras la estimulación con IS frente a MPEs sin tratar, la expresión disminuye de una manera más drástica al emplear MPEs de HUVEC tratadas con p-cresol.

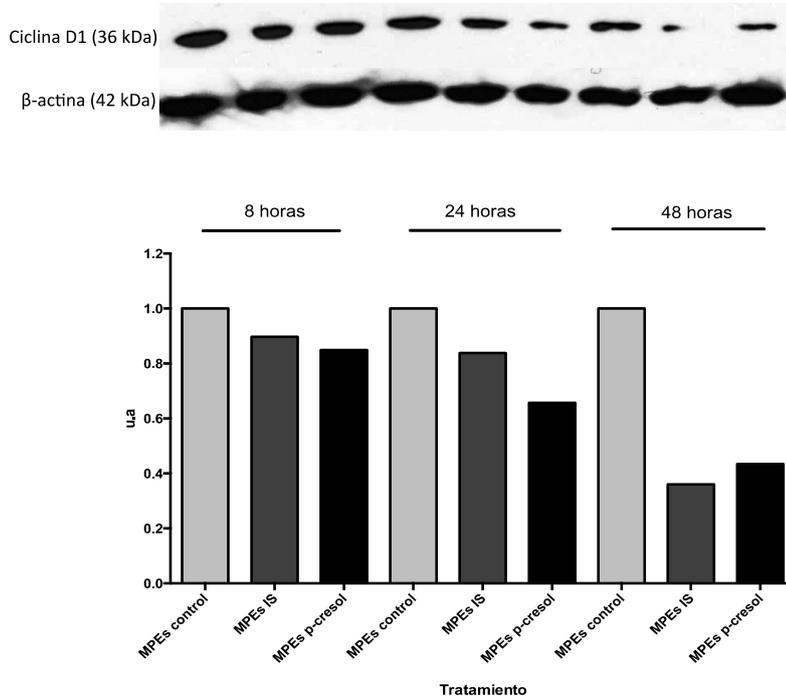


Figura 4: Representación niveles de expresión de ciclina D1 a tiempos 8, 24 y 48h (n=1)

Disminución en la fosforilación de ERK en células endoteliales (HUVEC).

Se determinó la fosforilación de ERK a distintos tiempos para determinar la activación celular. La fosforilación de ERK disminuye al emplear MPEs liberadas tras la estimulación con IS y p-cresol, lo que sugiere que disminuye la activación de rutas de supervivencia. Se observó una disminución más marcada en la fosforilación de ERK al emplear MPEs tras la estimulación de HUVEC con p-cresol, en relación con las MPEs liberadas tras la estimulación de HUVEC con IS. Los resultados se encuentran representados en la Figura 5.

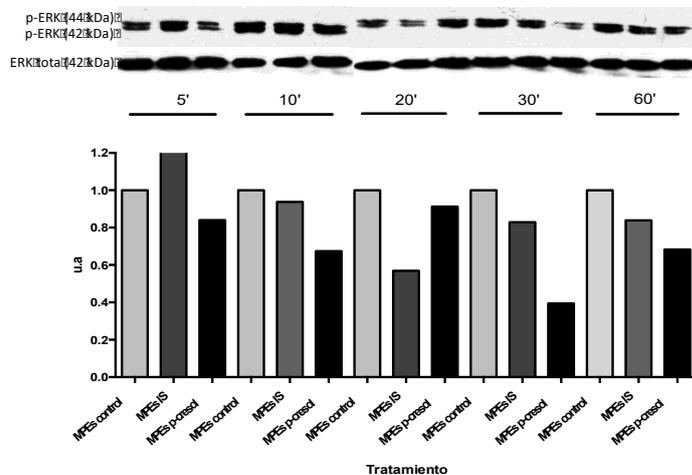


Figura 5: Representación niveles de fosforilación de ERK a tiempos 5, 10, 20, 30 y 60' (n=1)

El tratamiento con MPEs liberadas tras la estimulación con IS y p-cresol no presentan efecto significativo sobre la producción de vasos en células endoteliales

En el ensayo de angiogénesis se analizó tanto el número de nodos formados a las 7h, como la longitud de los vasos. Los resultados obtenidos no fueron significativos, pero en la formación de nodos parece que hay una tendencia a la disminución de la angiogénesis, que no va acompañada con la longitud de los vasos, ya que se encuentran invariables en todas las condiciones. Los resultados fueron representados en la Figura 6A y 6B.

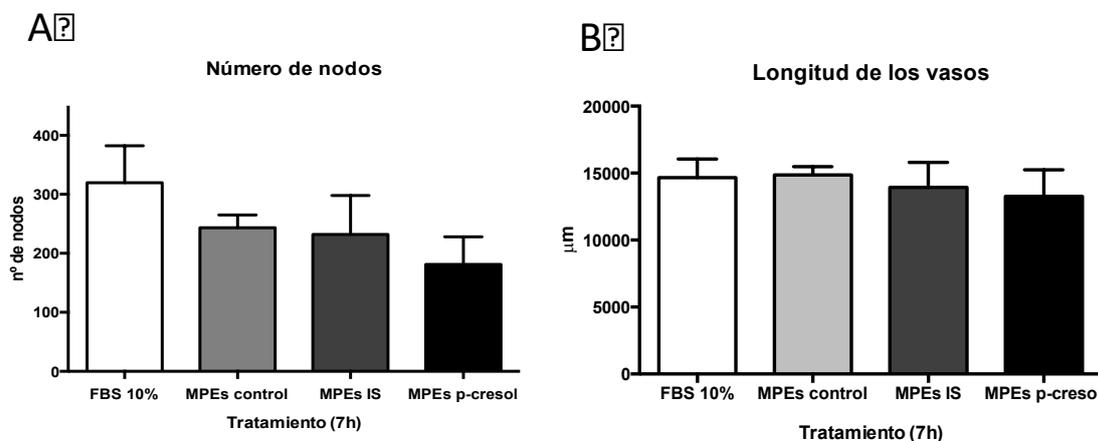


Figura 6A: Número de nodos a las 7 horas del tratamiento (n=2, por triplicados). Figura 6B: Longitud de los vasos a las 7 horas del tratamiento (n=2, por triplicados)

Discusión

En pacientes con IRC, el endotelio vascular se encuentra en contacto continuo con toxinas urémicas que circulan en la sangre. Estas toxinas podrían actuar directamente sobre las células endoteliales induciendo liberación de MPEs. De este modo, nuestro estudio fue diseñado para esclarecer los efectos de ambas toxinas urémicas: IS y p-cresol sobre la liberación de MPEs y el efecto de éstas sobre HUVEC, evaluando determinados parámetros característicos de un endotelio disfuncional, como son proliferación celular y migración, aumento de MPEs secretadas y características asociadas a senescencia celular.

Diferentes estudios sugieren que los efectos patológicos de las MPEs se deben a diferencias cualitativas. Al-Nedawi (2009) que sugiere que las propiedades y contenido de las MPEs generadas en contextos diferentes pueden variar mucho y que además, el contenido de las MPEs depende de la célula origen y de la vía por la que se generen [12]. En nuestro estudio hemos demostrado que la cantidad proteica que vehiculizan es mayor en condiciones patológicas.

Junto al incremento de proteínas, en nuestro estudio observamos que existe un aumento de MPEs producidas al emplear ambas toxinas urémicas. Hay un incremento significativo de MPEs al emplear IS como estímulo de HUVEC y mayor con p-cresol con respecto al control. Estos resultados confirman estudios previos que demuestran que un aumento de MPEs puede considerarse un biomarcador que refleje el daño endotelial. Es más, en estos estudios se sugirió que este aumento en el número de MPEs liberadas en condiciones patológicas pueden ser responsable del daño endotelial observado en la insuficiencia renal crónica.

En los ensayos de cierre de herida se observó una disminución significativa en el porcentaje de cierre de la herida de células tratadas MPEs liberadas tras el tratamiento con IS y en mayor medida con p-cresol. Estos datos demuestran que el daño endotelial inducido por las MPEs liberadas en condiciones fisiológicas se refleja en una incapacidad para reparar y regenerar el endotelio vascular promoviendo el inicio y desarrollo de la enfermedad cardiovascular.

Los cambios funcionales asociados con la senescencia celular se piensa que contribuyen al envejecimiento humano y a desordenes cardiovasculares relacionados con la edad [18]. La senescencia celular se considera el primer estadio en el daño endotelial como consecuencia de la IRC, por eso otra parte de nuestro estudio consistió en evaluar la senescencia celular inducida por MPEs liberadas al tratar HUVEC con IS y p-cresol. Los resultados obtenidos demuestran que existe un aumento de la senescencia cuando utilizamos las MPEs anteriormente mencionadas.

Ha sido descrito que la célula senescente pierde su actividad proliferativa. Una de las características asociadas a la proliferación, es la expresión de ciclina D1, proteína que permite la progresión del ciclo celular de fase G1 a fase S. Se realizó un Western-Blot para determinar la expresión de ciclina D1, en el que se observó cambios en su expresión. Nuestros estudios sugieren que la expresión de ciclina D1 disminuye al emplear MPEs liberadas por HUVEC tras la estimulación con IS y p-cresol. Además, también se observó disminución de los niveles de expresión a las 24 y 48 horas, en relación a los niveles de expresión obtenidos a las 8 horas. Asimismo, la senescencia podría estar mediada en parte por MAPK,

en concreto ERK, observando el cese de la actividad proliferativa y en consecuencia la disminución en la fosforilación de ERK, [18]. Nuestros resultados sugieren que disminuye la fosforilación de ERK al emplear MPEs liberadas por HUVEC tras la estimulación con MPEs con IS y p-cresol, lo que confirmaría el resto de ensayos. En el estudio de Yang C. (2012), también se observó una disminución en la fosforilación de ERK asociada a senescencia. [17].

Por último, en hecho de que las MPEs inhibieran la actividad angiogénica en las células HUVEC confirma que un número elevado de MPEs inducidas por toxinas urémicas provoca senescencia endotelial y como consecuencia se inhibe la angiogénesis vascular, migración y reparación. Todo esto pone de manifiesto que las MPEs son mucho más que un biomarcador y probablemente deben ser consideradas como una diana terapéutica para prevenir el daño endotelial y la enfermedad vascular en la IRC.

Bibliografía

1. Horl, W.H. 1998. Genesis of the uraemic syndrome: role of uraemic toxins. *Wiener klinische Wochenschrift*, 110(15):511-520.
2. Shai, E. and Varon, D. 2011. Development, cell differentiation, angiogenesis microparticles and their roles in angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31:10-14.4
3. Cohen, G., Glorieux, G., et al. 2007. Review on uraemic toxins III: recommendations for handling uraemic retention solutes in vitro--towards a standardized approach for research on uraemia. *Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association*, 22(12):3381-3390.
4. Martinez, M.C. and Andriantsitohaina, R. 2011. Microparticles in angiogenesis: therapeutic potential. *Circulation research*, 109(1):110-119.
5. Vanholder, R., De Smet, R., et al. 1999. P-Cresol: a Toxin Revealing Many Neglected but Relevant Aspects of Uraemic Toxicity. *Nephrology, dialysis, transplantation*, 14(12):2813- 2815.
6. Dou, L., Bertrand, E., Cerini, C., et al. 2004. The uremic solutes p-cresol and indoxyl sulfate inhibit endothelial proliferation and wound repair. *Kidney international*, 65(2):442-451.
7. Brocca, A., Virzi, G.M., et al. 2013. Cytotoxic effects of p-cresol in renal epithelial tubular cells. *Blood purification*, 36(3):219-225.
8. Zhu, J.Z., Zhang, J., et al. 2012. P-cresol, but not p-cresylsulphate, disrupts endothelial progenitor cell function in vitro. *Nephrology, dialysis, transplantation*, 27(12):4323-4330.
9. Lin, C.J., Liu, H.L., et al. 2012). Indoxyl sulfate predicts cardiovascular disease and renal function deterioration in advanced chronic kidney disease. *Archives of Medical Research*, 43(6):451-456.
10. Wang, J.G., Williams, J.C., et al. 2011. Monocytic microparticles activate endothelial cells in an IL-1 β -dependent manner. *Blood*, 118(8):2366-2374
11. Helbing, T., Olivier, C., et al. 2014. Role of microparticles in endothelial dysfunction and arterial hypertension. *World journal of cardiology*, 6(11):1135-1139.
12. Al-Nedawi, K., Meehan B., et al. 2009. Microvesicles Messengers and mediators of tumor progression. *Cell Cycle*, 8(13):2014-8.
13. Distler J., Pisetsky D., et al. 2005. Microparticles as regulators of inflammation: Novel players of cellular crosstalk in the rheumatic diseases. *Arthritis and Rheumatology*, 52(11):3337-3348
14. Mause, S.F. and Weber, C. 2010. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information Exchange. *Circulation research*, 107:1047-1057.
15. Diehl, P., Fricke, A., Sander, L., et al. 2012. Microparticles: major transport vehicles for distinct microRNAs in circulation. *Cardiovascular research*, 93(4):633-644
16. Soleti, R., and Martínez MC. 2009. Microparticles harbouring Sonic hedgehog: role in angiogenesis regulation. *Cell adhesion & migration*, 3(3):293-295
17. Yang C., Xiong W., et al. 2012. Role of receptor-mediated endocytosis in the antiangiogenic effects of human T lymphoblastic cell-derived microparticles. *American Journal of Physiology*, 302(8).
18. Shan H. and Chen X. 2008. Angiotensin II induces endothelial cell senescence via the activation of mitogen-activated protein kinases. *Cell Biochemistry and Function*, 26(4):459-66.