



Role of microvesicles as biomarkers and future pharmacology targets of cardiovascular diseases

Title in Spanish: *Papel de las microvesículas como biomarcadores y futuras dianas farmacológicas de enfermedades cardiovasculares*

Julia Carracedo^{1,2,*}, Isabel Corpas¹, Matilde Alique³, Rafael Ramírez-Carracedo⁴, Rafael Ramírez³

¹Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid, España. ²Instituto de Investigación Sanitaria Hospital 12 de Octubre (imas12), Madrid, España. ³Departamento Biología de Sistemas, Unidad Fisiología, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, España. ⁴Unidad de Investigación Conjunta Cardiovascular, Universidad Francisco de Vitoria/Unidad de Investigación Hospital Universitario Ramón y Cajal (IRYCIS), Madrid, España.

ABSTRACT: In the 1990's, it was discovered a new cell-cell communication system based on the action of vesicles that cargo bioactive molecules, on neighboring cells. These vesicles, known as extracellular vesicles (EVs) act as regulators of several physiological processes but also participate in the development and progression of multiple diseases. Microvesicles (MVs) are types of EVs that are implicated in the etiopathogenesis of a large number of cardiovascular diseases due to they take part in the onset of atherosclerosis. Different cardioprotective drugs have shown to have an effect on MVs. In addition, since the discovery that MVs are capable of transferring biological information, the use of them as drug delivery vehicles has gained scientific interest. The aim of this work is to analyze the involvement of MVs in the origin of atherosclerosis to demonstrate their role as diagnostic biomarkers, as well as to review the pharmacological effect of current therapies on MVs and their role as therapeutic tool.

RESUMEN: En la década de los 90 se descubrió un nuevo sistema de comunicación célula-célula a través de vesículas con moléculas bioactivas liberadas al espacio extracelular. Estas vesículas, conocidas como vesículas extracelulares (VE), actúan como reguladores de procesos fisiológicos, pero también participan en el desarrollo y progresión de múltiples patologías. Las microvesículas (MVs) son un tipo de VE que se producen como resultado del daño celular, y están implicadas en la etiopatogenia de un gran número de enfermedades cardiovasculares porque intervienen en el inicio de la aterosclerosis. Diferentes fármacos cardioprotectores han demostrado tener un efecto sobre las MVs; por otro lado, desde que se conoce su capacidad para transferir información biológica, el uso de las éstas como vehículos de suministro molecular ha adquirido interés científico. El objetivo de este trabajo es analizar la implicación de las MVs en la etiopatogenia de la aterosclerosis estableciendo su importancia como biomarcadores de diagnóstico y de seguimiento. Se revisará el efecto farmacológico de las terapias actuales sobre las MVs y se discutirá su papel como herramienta terapéutica

*Corresponding Author: julcar01@ucm.es

Received: March 2, 2018 Accepted: March 6, 2018

Premio Real Academia Nacional de Farmacia en el Concurso Científico 2017 de la RANF.

An Real Acad Farm Vol. 84, Nº 1 (2018), pp. 4-15

Language of Manuscript: Spanish

1. INTRODUCCIÓN

En 1949 se describió por primera vez que las células liberaban pequeñas estructuras con membrana. En un principio se consideraron restos celulares sin función biológica producidos como consecuencia del metabolismo celular de excreción. Sin embargo, recientemente numerosos investigadores han determinado que las microvesículas tienen un papel muy importante en la comunicación y el intercambio de información entre células.

El principal objetivo de este trabajo es profundizar en

el papel de las microvesículas como posible biomarcador de enfermedades cardiovasculares y revisar su posible papel como herramienta terapéutica.

2. VESÍCULAS EXTRACELULARES

2.1. Definición

Inicialmente se consideró que cualquier partícula presente en el organismo con un tamaño $< 5 \mu\text{m}$ era un residuo procedente de células muertas sin ningún efecto sobre otras células. Sin embargo, investigaciones más recientes evidencian que estos restos celulares, ya

clasificados como vesículas, y en especial aquellos cuyo diámetro está comprendido entre 40 a 1000 nm, no son necesariamente productos resultantes de muerte celular, sino que pueden ser producidos por las células de forma activa y regulada y ejercen funciones biológicas (1). Estas vesículas juegan un papel clave en la comunicación intercelular siendo capaces de causar cambios estructurales y funcionales en las células con las que interaccionan y, consecuentemente, en los tejidos (2).

La Sociedad Internacional de Vesículas Extracelulares (ISEV) recomienda utilizar el término “vesículas extracelulares” (VE) para referirse a todo tipo de vesículas del medio extracelular (3). Desde su descubrimiento hace 30 años, se ha demostrado que las VE son producidas por una gran variedad de células: células sanguíneas, dendríticas, endoteliales y epiteliales, células del sistema nervioso, células madre adultas y embrionarias e incluso células tumorales (4).

En general, las VE se pueden encontrar en muchos fluidos corporales, incluidos el plasma y la orina, e intervienen en procesos fisiológicos y fisiopatológicos participando como mediadores en la comunicación intercelular (4, 5). En el contexto fisiológico, las VE actúan como mecanismo de comunicación paracrina y/o endocrina (6), pues tienen la capacidad de transmitir señales biológicas a células vecinas bien: (I) por contacto directo, mediante la unión a ligandos presentes en la superficie de la célula diana y/o enzimas asociadas a la membrana, así activando de cascadas de señalización; o bien, (II) entregando o liberando su contenido directamente al citoplasma por transferencia de una serie de moléculas (proteínas de membrana y citosólicas, lípidos, ADN, ARN mensajero, microARN y ARN no codificado) tras un proceso de fusión o internalización (7, 8). De este modo, se ha descrito que las VE influyen sobre diversos procesos fisiológicos entre los que se incluyen la regulación de la homeostasis celular, la regulación de la coagulación, la angiogénesis y la modulación de la respuesta inmune e inflamatoria. En el momento que tiene lugar un daño como es el estrés oxidativo, que conlleva activación o apoptosis celular, la producción y liberación de VE se incrementa, y se produce una modificación del contenido vesicular (9). Conjuntamente, estas modificaciones influyen en el desarrollo y la progresión de enfermedades; pero a su vez, funciona como sistema de alerta a células adyacentes, células progenitoras y células del sistema inmune, siendo las células progenitoras las únicas con capacidad protectora o regeneradora (4).

En cuanto al desarrollo y progresión de enfermedades,

se ha demostrado que los factores ambientales influyen en el número y contenido de las VE. Las VE se encuentran elevadas en pacientes con enfermedades vasculares, metabólicas, pulmonares, autoinmunes, neurodegenerativas, en la inflamación crónica y en el cáncer (10). Por ejemplo, en la aterosclerosis, debido al estrés al que se ven sometidas las células del endotelio vascular, se genera un incremento de un tipo específico de VE responsables de la evolución de la lesión (3), por lo que, la utilización de VE como marcadores para la predicción, diagnóstico, pronóstico y monitorización de terapias de enfermedades complejas resulta cada vez más atractiva, así como su potencial para identificar nuevas dianas terapéuticas (3).

2.2. Clasificación de las VE

En función del tamaño, morfología, composición bioquímica y mecanismo de liberación, se han identificado tres tipos de VE (2) (**Figura 1**):

Las vesículas extracelulares de menor tamaño son los **exosomas** (30-100 nm). Su formación y liberación tiene lugar a través de la vía endosomal; es decir, en el interior de la célula estas vesículas se agrupan formando cuerpos multivesiculares (MVBs) que se liberan al medio extracelular tras fusionarse con la membrana plasmática. Su contenido corresponde al existente en el compartimento endosomal por lo que su membrana presenta poco o nada de fosfatidilserina (PS) (4).

El segundo tipo son las conocidas como **microvesículas (MVs)**, también denominadas micropartículas (MPs), tienen un tamaño entre 100 nm-1 µm. Son secretadas fuera de la célula por un proceso de evaginación o *sprout* de la membrana plasmática, que implica: (I) una reubicación de los fosfolípidos en la membrana externa; de manera que la PS, normalmente localizada en el lado interno de la membrana, queda expuesta en la superficie de la vesícula, (II) reordenamiento del citoesqueleto, (III) generación de la curvatura de la membrana y (IV) liberación de la vesícula (9, 11).

El tercer tipo de VE son los **cuerpos apoptóticos**, con un tamaño aproximado de 1-5 µm. Son liberados como vesículas tras producirse la apoptosis celular seguido de aumento de la permeabilidad de la membrana, fragmentación del ADN y, finalmente, cambios en el potencial de la membrana mitocondrial. Los cuerpos apoptóticos también exponen PS en su superficie (9) y además, contienen orgánulos celulares así como material genético en su interior (6, 12).

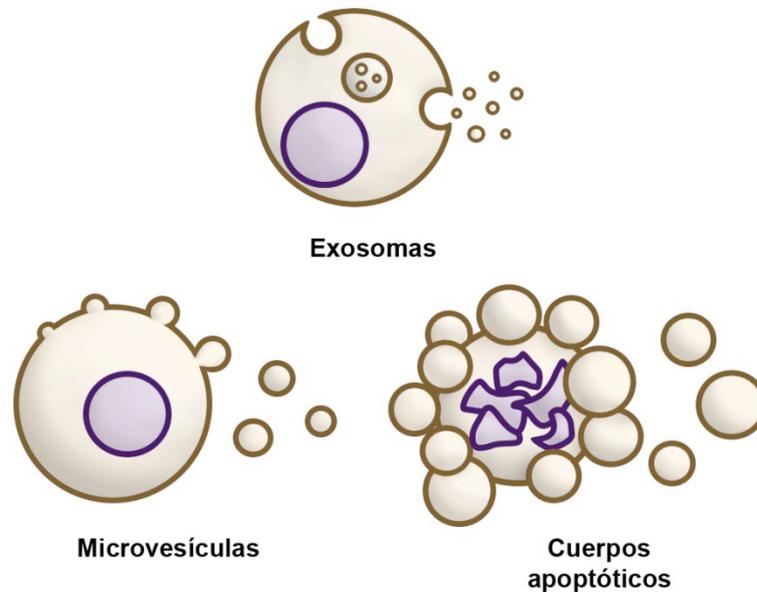


Figura 1. Proceso de formación y liberación de vesículas extracelulares (9). Las células pueden secretar tres tipos de vesículas extracelulares en función de su tamaño, morfología, composición bioquímica y mecanismo de liberación. Estos tres tipos son: exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos.

3. MICROVESÍCULAS

Las MVs son partículas esféricas rodeadas por una membrana lipídica en cuya superficie puede haber: (I) moléculas de adhesión transmembrana específicas de la célula de origen como integrinas, selectinas y cadherinas, que median las interacciones célula-célula o de la célula

con la matriz extracelular (13), (II) ligando CD40, (III) metaloproteinasas (MMPs) y (IV) factor tisular (FT) (3, 9) implicado en las primeras etapas de la coagulación al formar complejos con el factor VII/VIIa que conducen al inicio de la cascada de coagulación (**Figura 2**).

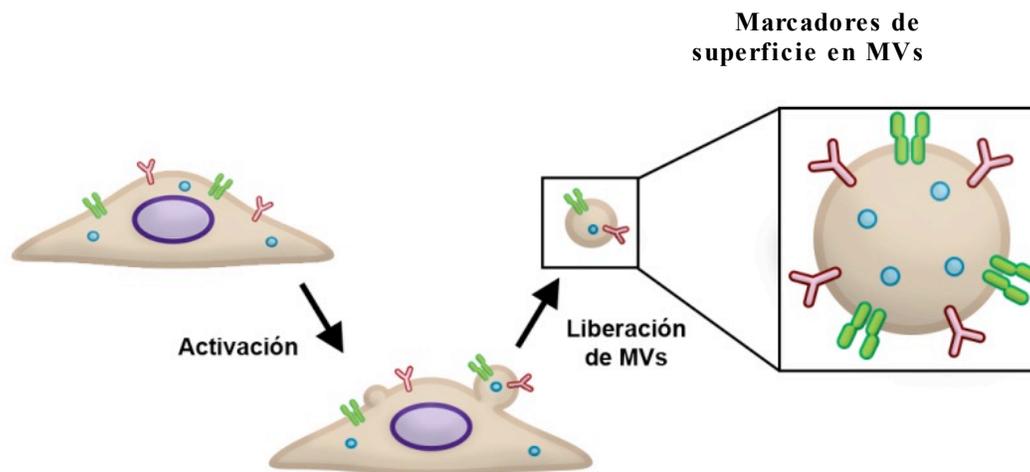


Figura 2. Características de las microvesículas (13). Las células se activan mediante diferentes estímulos, tanto fisiológicos como patológicos, y como consecuencia liberan microvesículas al medio extracelular. Estas microvesículas se caracterizan por transportar en su interior diferente contenido, entre el que se encuentran: proteínas, ácidos nucleicos y lípidos. Además, estas microvesículas expresan en su membrana diferentes marcadores de superficie (proteínas y fosfatidilserina).

Su formación y liberación a la circulación sanguínea, desde un punto de vista cualitativo (fenotipo) y cuantitativo (cantidad), depende tanto de la célula de origen, como del estímulo responsable de la liberación (9, 12); pero también de factores externos como la edad o el

sexo (9). Como ya se ha explicado, durante su formación se produce un cambio en la asimetría de la bicapa lipídica de tal forma que quedan expuestos en la superficie de la membrana fosfolípidos con carga negativa como la PS, que actúan como lugar de unión de los factores de

coagulación II, Va y Xa y, además, proporcionan un lugar para el montaje del complejo protombinasa. Esto es de gran importancia, ya que aceleran la conversión de protrombina en trombina favoreciendo el fenómeno de coagulación lo que aumenta el riesgo de formación de coágulos (11).

A nivel del sistema cardiovascular, un gran número de células secretan MVs a sangre; entre ellas, las células sanguíneas (leucocitos y eritrocitos) y las plaquetas, las células endoteliales y las células musculares lisas vasculares (8). La posibilidad de aislar las MVs de fluidos humanos, ha permitido observar niveles elevados de éstas en individuos con diversas afecciones cardiovasculares que se encuentran asociadas a disfunción endotelial (4). Además, existe una relación directa entre el incremento de

MVs en sangre y parámetros moleculares de diagnóstico de enfermedades que cursan con complicaciones vasculares (8); incluso se ha demostrado una asociación entre el Índice de Riesgo Framingham, utilizado para predecir el riesgo de enfermedad cardiovascular, y las concentraciones plasmáticas de MVs de los diversos orígenes celulares (leucocitos, plaquetas y células endoteliales) (14). Dependiendo del origen celular, se pueden subdividir tipos de subpoblaciones de MVs que difieren entre ellas, no solo en el contenido y los antígenos expuestos en su membrana que vienen determinados por el estímulo desencadenante de la liberación, sino también en la participación en el desarrollo y progresión de enfermedades (**Tabla 1**) (9)

Tabla 1. Tipos de microvesículas y su participación en la progresión de enfermedades.

Vesículas extracelulares	Papel en la progresión y desarrollo de enfermedades
MVPs	Coagulación, trombosis, procesos inflamatorios y progresión de tumores
MVEs	Aumento del estrés oxidativo, disfunción endotelial, angiogénesis, y crecimiento tumoral
MVs derivadas de leucocitos	Disfunción endotelial, inflamación vascular y sepsis

MVPs: Vesículas extracelulares derivadas de plaquetas; **MVEs:** Vesículas extracelulares derivadas de células endoteliales.

Alrededor del 70-90% del total de las MVs en sangre son aquellas derivadas de plaquetas (**MVPs**) (15). Interaccionan con las células sanguíneas y endoteliales e intervienen en la regulación de la función endotelial, pero principalmente participan en el proceso de coagulación (7). Cuando se produce disfunción endotelial, las plaquetas tienden a adherirse a la superficie dañada, generándose así una activación plaquetaria que consiste en la agregación de plaquetas y en la secreción de gránulos internos, lo que conlleva una translocación de la selectina P a la membrana plasmática, liberación de MVPs e inicio de la actividad pro-coagulante. Como consecuencia, las plaquetas liberan potentes factores mitogénicos tales como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento transformante β (TGF- β) y factor de crecimiento epidérmico (EGF), que conducen a la proliferación de las células del músculo liso y progresión de la lesión (16).

Por otro lado, la activación endotelial conlleva una liberación de MVs de células endoteliales al espacio extracelular, que se conocen como vesículas extracelulares endoteliales (**MVEs**), en un proceso de evaginación (4). Las MVEs que constituyen una pequeña subpoblación del total de las MVs, y su papel fundamental es servir como sistema de señalización entre los elementos que participan en la función y la homeostasis del vaso (15). Se ha postulado que las MVEs pueden estar implicadas en la etiopatogenia de varias enfermedades cardiovasculares, principalmente aquellas que derivan de una disfunción endotelial como la aterosclerosis.

Las MVs derivadas de leucocitos, que son aquellas que pueden originarse a partir de monocitos (**MVMs**), neutrófilos y linfocitos B y T, contienen mediadores pro-coagulantes y pro-inflamatorios por lo que son de especial importancia en procesos de disfunción endotelial y sepsis (17).

Se han detectado niveles plasmáticos elevados de MVs en pacientes con factores de riesgo cardiovascular (diabetes, hipertensión, enfermedad vascular periférica, insuficiencia cardíaca) y en individuos que han sufrido eventos trombóticos como infarto de miocardio agudo y accidente vascular cerebral (7). Diferentes estudios han demostrado que ciertos tratamientos farmacológicos dirigidos a estas patologías, disminuyen los niveles de MVs (14). Por esta razón, las MVs están emergiendo como un candidato prometedor en el diagnóstico clínico y una posible alternativa en el control para el seguimiento terapéutico, al actuar como biomarcadores por su implicación en la disfunción endotelial y la activación de la coagulación (9).

4. FUNCIONES DE LAS MVS SOBRE LOS PROCESOS VASCULARES

4.1. Microvesículas y estrés oxidativo

Las MVs procedentes de diversos orígenes como las células endoteliales, monocitos y linfocitos son capaces de promover el estrés oxidativo en el endotelio a través de procesos que pueden implicar varios sistemas enzimáticos (18). Las MVs tienen capacidad para regular la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), aunque existen

ciertas discrepancias con respecto a los sistemas de generación de ROS afectados. Estos resultados contradictorios pueden deberse a que las poblaciones de MVs estudiadas son de diferente origen o se han producido frente a diferentes estímulos. Estas diferencias en la producción de MVs tienen un interés potencial para poder definir poblaciones de MVs con diferentes actividades biológicas. Concretamente, la respuesta celular generando MVs podría ser diferente frente a un estrés oxidativo agudo, por ejemplo en el caso de una inflamación aguda, o bien ante una situación crónica como es un proceso de senescencia (19, 20).

4.2. Microvesículas y coagulación

La actividad trombogénica de las MVs está estrechamente relacionada con el FT. Este factor, del que depende la activación de la cascada de coagulación, está ausente en las células en condiciones fisiológicas normales. Sin embargo, como consecuencia de un daño celular se produce una exposición del FT, sobre todo, en células endoteliales y monocitos. Varios estudios *in vitro* han demostrado la presencia de FT en la superficie de la membrana de MVs en determinadas situaciones patológicas como el síndrome coronario agudo (3).

La presencia de fosfolípidos con carga negativa, en particular de PS, en la superficie de las MVs contribuye a su potencial pro-coagulante pues es un potente promotor de la coagulación ya que atrae diferentes factores de coagulación y permite el montaje del complejo protrombinasa (13).

Las MVPs y, seguidamente, las MVEs son responsables principalmente de esta actividad trombogénica (21). Estas últimas, promueven la coagulación mediante la generación de trombina a través del factor VII y el FT (7), y mediante la unión de plaquetas activadas a través del receptor de selectina P. De hecho, se ha reportado que la interacción receptor-ligando en las MVs contribuye al desarrollo de trombos en ratones (21). También las MVPs se adhieren al subendotelio donde activan a las células endoteliales. El resultado es que favorecen el reclutamiento de plaquetas en la zona dañada, favoreciendo la formación de trombos locales y la aterogénesis, y contribuyendo al progreso de la lesión (3).

4.3. Microvesículas y su relación con la inflamación y la aterosclerosis

La exposición de las células a diferentes estímulos como son el estrés oxidativo, la presencia de agonistas endógenos o factores pro-apoptóticos, o bien una lesión celular, provoca la liberación de MVs a la sangre, lo que contribuye al daño endotelial y al desarrollo de enfermedades cardiovasculares (5).

El endotelio es uno de los principales objetivos de estas MVs circulantes. La respuesta endotelial a ellas puede ser una liberación de diferentes factores (respuesta aguda) o un cambio en la expresión de genes (respuesta prolongada). En condiciones normales, las MVs participan en la regulación de las funciones de las células endoteliales, incluyendo la coagulación y la inflamación.

Bajo situaciones de estrés, algunas células liberan MVs que difieren en número, composición y función, y que pueden ser responsables de la modificación del tono vascular, lo que llevará a la disfunción endotelial, la amplificación de la respuesta inflamatoria y al desarrollo de trombosis intravascular, desencadenando el desarrollo de patologías cardíacas (5). Es importante señalar que la inflamación crónica focalizada conduce a la fase de aterosclerosis, siendo esta la fase final del proceso de envejecimiento endotelial. Mediadores inflamatorios tales como el TNF- α , la interleuquina-1 β (IL-1 β) y la trombina intervienen la generación y liberación de MVs (13) que, a su vez, actúan sobre las células endoteliales favoreciendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias y promoviendo una mayor inflamación vascular (14).

La placa de ateroma contiene grandes cantidades de MVs, lo que sugiere una producción a nivel local (14). Al aislarlas, se ha visto que a) participan en la regulación de la respuesta inflamatoria en células endoteliales, b) aumentan la adhesión de monocitos al endotelio y c) favorecen la migración sub-endotelial, promoviendo la progresión de la lesión aterosclerótica.

El efecto que tienen las MVPs ha sido ampliamente estudiado. Su papel se extiende más allá de su participación en la coagulación y es que, las MVPs tienen acción sobre la pared vascular, ya que se adhieren tanto a las células endoteliales lesionadas como al sub-endotelio a través del receptor de glicoproteína (GP) IIb/IIIa presente en la membrana de éstas. *In vitro* se ha visto que la estimulación del endotelio por las MVPs da lugar a la liberación de citoquinas e interleuquinas como IL-6 e IL-8 y al aumento de la expresión de moléculas de adhesión celular como la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1), la molécula de adhesión vascular (VCAM-1), y la E-selectina. Además, las MVPs contienen suficiente cantidad de la quimioquina CCL-5/RANTES, proteína con actividad pro-inflamatoria capaz depositarse sobre el endotelio activado, como para promover el reclutamiento de leucocitos en la placa aterosclerótica y, posteriormente, inducir progresión de la aterosclerosis (17). Las MVPs también transfieren ácido araquidónico a las células endoteliales y éste a su vez, induce la producción de ciclooxigenasa-2 (COX-2) e ICAM-1. El ácido araquidónico se metaboliza a tromboxano A₂, que provoca la contracción vascular (17).

Las MVs derivadas de leucocitos también actúan a nivel endotelial como agonistas inflamatorios al estimular la liberación de citoquinas, IL-6 e IL-8, y la expresión de moléculas de adhesión. En el estudio realizado Wang *et al.*, se observó que las MVMs son capaces de activar las células endoteliales porque contienen IL-1 β responsable de intensificar el proceso inflamatorio (17).

En definitiva, las MVs no sólo son reflejo del estado de activación de las células, sino que también confieren una mayor actividad inflamatoria sistémica, siendo causa y consecuencia de la inflamación vascular.

4.4. *Microvesículas en la disfunción endotelial y angiogénesis*

Las MVs modifican la función del endotelio vascular al originar estrés oxidativo y reducir las concentraciones de óxido nítrico en las células endoteliales. Las MVEs a pesar de constituir una pequeña proporción en sangre, presentan una estrecha relación con el origen de varias enfermedades cardiovasculares, fundamentalmente porque participan en el inicio de la disfunción endotelial (17, 22).

Se ha visto que las MVEs en pacientes con infarto de miocardio, diabetes, preclampsia, síndrome metabólico o apnea (8), son capaces de actuar a nivel de la síntesis, liberación y acción del óxido nítrico y como consecuencia, modifican el tono vascular (5); este efecto pueden producirlo al inhibir reversiblemente la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) y/o al disminuir la biodisponibilidad de óxido nítrico a nivel celular. También, pueden atenuar la biodisponibilidad del óxido nítrico al actuar como estímulo de la formación de ROS, alterando así la función endotelial normal (21). Las MVEs se caracterizan porque producen cantidades significativas de aniones superóxido y radicales libres mediante la fosforilación a través de la vía de señalización dependiente de las quinasas PI3K/ERK, al contener la enzima NADPH oxidasa (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa) (5), que son responsables de que las MVEs actúen aumentando la nitración de proteínas en las células endoteliales e intensificando el estrés oxidativo (14).

Brodsky *et al.*, observaron que las MVEs causan relajación de la pared vascular de la aorta en ratas; este efecto está asociado a la producción de aniones superóxido en el anillo aórtico y a la reducción de la biodisponibilidad de óxido nítrico (18).

La acumulación de MVs en la placa aterosclerótica representa una señal de neo-vascularización y vulnerabilidad (3) ya que las MVs presentan propiedades angiogénicas. Para ello es necesario la activación y la expresión de factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (3). Este proceso es clave en la transición de lesión estable a inestable; de hecho, la formación de nuevos vasos sanguíneos aumenta el riesgo de ruptura de la placa y favorece las hemorragias (13).

En general, las diferentes MVs se caracterizan por tener propiedades pro- y anti-angiogénicas. Por un lado, las MVs derivadas de plaquetas son capaces de estimular la proliferación, supervivencia, migración y formación de nuevos capilares en el endotelio a través del VEGF. Por otro lado, las MVs derivadas de células endoteliales promueven la degradación de la matriz extracelular (contienen metaloproteasas) y la formación de nuevos vasos sanguíneos a través de un mecanismo que implica la vía de señalización PI3K/Akt (4). Leroyer *et al.*, demostraron que las MVs CD40 positivas pueden aumentar la proliferación endotelial, al promover la formación de nuevos vasos *in vivo* lo que favorece la

hemorragia intra-placa (13, 21). Además de sus características pro-angiogénicas, se ha visto que las MVEs así como las MVs derivadas de leucocitos también inhiben la angiogénesis porque estimulan la síntesis de ROS y disminuyen los niveles de óxido nítrico (3).

4.5. *Microvesículas, apoptosis y senescencia*

Además de ser un potente estímulo para la formación de MVs, la apoptosis también puede ser una consecuencia de la señalización de MVs (23). Las VEs derivadas de monocitos, eritrocitos, células endoteliales y plaquetas contienen caspasa 3. Se piensa que el contenido de caspasas puede ser un mecanismo dirigido al control de la apoptosis, y se sugiere que las MVs liberarían la caspasa 3 en las células diana, participando en la inducción de apoptosis. Además de la muerte celular, la caspasa 3 está implicada en numerosos procesos celulares, por lo que la liberación de caspasa puede tener un impacto todavía mayor sobre la célula diana. Además, las MVEs podrían actuar a otros niveles conducentes al proceso de apoptosis y relacionados con el estrés y el daño celular y genómico. Por ejemplo, la metilación del ADN, la modificación de histonas y la regulación post-transcriptional del ARN pueden ser algunos procesos epigenéticos implicados (24). Recientemente, se ha demostrado que las MVs pueden jugar un importante papel en procesos de senescencia celular (25), ya que se han propuesto como elementos de respuesta endotelial que pueden participar en los procesos dañinos y reparadores del endotelio (26-28).

4.6. *Microvesículas endoteliales y regeneración vascular*

Inicialmente, la proliferación y migración de células endoteliales adyacentes se habían identificado como un factor de reparación endotelial. Estudios posteriores describen un mecanismo para el mantenimiento de la estructura endotelial que se asocia con la capacidad de células progenitoras endoteliales circulantes (EPCs) para diferenciar y reparar el tejido endotelial dañado. Debido a la importancia de este mecanismo de reparación daño-endotelial en el mantenimiento de la homeostasis vascular, es lógico pensar en la existencia de una estrecha comunicación entre las células endoteliales dañadas y las EPCs. Algunos estudios indican que las MVEs de plasma, tanto en sujetos sanos como en pacientes con enfermedad renal crónica, participan sobre la actividad de las EPCs (26). De hecho, la hipótesis que se plantea es que las MVEs pueden ser un importante y necesario mecanismo fisiológico de señalización para iniciar el reclutamiento de células reparadoras de endotelio desde la médula ósea. En modelos *in vitro* se ha demostrado que las MVEs pueden ser un elemento clave en la regeneración y mantenimiento de la homeostasis vascular actuando sobre células EPCs (29).

4.7. *Microvesículas endoteliales y calcificación vascular*

La calcificación vascular es un proceso cada vez más frecuente en los países desarrollados y puede contribuir de manera importante a un incremento del riesgo cardiovascular. Los procesos y mecanismos que participan

en la formación de calcificaciones vasculares son poco conocidos y es necesario desarrollar nuevas estrategias terapéuticas para prevenir o revertir la calcificación.

Los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) tienen una mayor frecuencia de calcificación vascular, y las MVEs se encuentran incrementadas en pacientes con un mayor grado de calcificación (26). Además, en estudios *in vitro*, las MVEs producidas en un entorno inflamatorio o que proceden de pacientes con ERC promueven la calcificación de células de músculo liso *in vitro* (30). Varios autores han descrito un papel de las MVs en la mineralización de células de músculo liso vascular (31, 32).

5. MICROVESÍCULAS COMO BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO CLÍNICO

Los biomarcadores son una herramienta analítica que puede ser utilizada como indicador de función biológica, de procedimientos patógenos o de respuesta farmacológica a una intervención terapéutica característica objetivamente medible y evaluable. Comúnmente, permiten identificar individuos con alto riesgo patológico, diagnosticar enfermedades y tratar a los pacientes (16). Como la evaluación directa del estado biológico puede ser muy invasiva y/o costosa, los biomarcadores son de significativa utilidad clínica a la hora de evaluar el riesgo y/o identificar patologías. Además, permiten una detección temprana y llevar a cabo una intervención terapéutica antes de que la patología progrese de forma irreversible o se agrave (3).

Las MVs presentan diversas propiedades que las hacen responsables del inicio y la progresión de enfermedades cardiovasculares, así como de la aparición de complicaciones (14). Al secretarse bajo condiciones de estrés o daño celular se han convertido en un candidato interesante para ser utilizados como biomarcador no invasivo y potencialmente sensible de enfermedades cardiovasculares, pues reflejan el grado de activación o apoptosis de plaquetas, leucocitos, eritrocitos y células endoteliales (3, 9). Por esta razón, medir sus concentraciones en sujetos con enfermedades cardiovasculares se ha propuesto no solo para diagnosticar la entidad clínica, sino también para evaluar la gravedad y evolución de ésta (9).

Con el fin de demostrar que el incremento del número de MVs en sangre es indicativo de riesgo cardiovascular

(21) y que, por tanto, demostrar que las MVs pueden usarse como biomarcadores de actividad en el desarrollo clínico temprano (14), los niveles de MVs de referencia deben establecerse de forma independiente a otros factores de riesgo. Esta independencia ha sido demostrada, aunque se ha visto que existe una correlación entre los elevados valores de MVs en sangre encontrados en enfermedades tales como diabetes, obesidad, hipertensión, etc. (21). Además, se han demostrado elevadas concentraciones plasmáticas de MVs en una variedad de estados patológicos, en particular, en pacientes que padecen aterosclerosis asociada a lesión vascular, inflamación y estado pro-trombótico (3).

Mezentsev *et al.*, llevaron a cabo un ensayo *in vitro* mediante el cual cuantificaron los niveles fisiológicos de MVEs en individuos sanos, encontrando valores comprendidos entre 10^3 - 10^4 MVEs/mL; mientras que la concentración de MVEs en individuos con enfermedad cardiovascular eran de 10^5 MVEs/mL (22).

En individuos sanos, las MVs derivan principalmente de plaquetas y, en menor medida, de leucocitos y células endoteliales (5). En individuos con afectación cardiovascular se han observado distintos fenotipos de MVs en sangre. Otros autores han descrito niveles elevados de MVs derivadas de plaquetas, eritrocitos y células endoteliales en individuos con síndrome metabólico respecto a individuos sanos; Sabatier *et al.*, observaron un aumento de los niveles de MVs derivadas de plaquetas y células endoteliales en pacientes con Diabetes Mellitus (DM) Tipo 1 (22). Recientemente Carmona *et al.*, han publicado que los niveles de MVs, se encuentran elevados en pacientes con enfermedad renal crónica en hemodiálisis, fundamentalmente diabéticos, y que este número va a determinar la mortalidad de causa cardiovascular (33).

La mayoría de los estudios que analizan los efectos biológicos de las MVs en la aterogénesis y sus complicaciones se han realizado *in vitro*, utilizando MVs producidas a partir de células tratadas con estímulos inflamatorios o apoptóticos; o bien MVs aisladas *ex vivo* de sangre o placas ateroscleróticas. Cabe destacar que, como hemos comentado anteriormente, las propiedades que presentan son muy diferentes según dos parámetros: el tipo de célula de origen y el estímulo utilizado para generarlos (14).

Tabla 2. Resumen de diferentes estudios clínicos en relación con las microvesículas.

Estudio (Autores)	Tipo VEs	Resultado	Referencia
Agouni <i>et al.</i> Helal <i>et al.</i>	MVPs, MVEs y VEs de eritrocitos	Niveles plasmáticos elevados en individuos con Síndrome Metabólico	(8)
Sabatier <i>et al.</i>	MVPs y MVEs	Niveles plasmáticos elevados en pacientes con DM1	(22)
Mezentsev <i>et al.</i>	MVEs	Niveles en voluntarios sanos: 10^3 - 10^4 MVEs/mL; en individuos con ECV: 10^5 MVEs/mL	(17, 22)
Katopodis <i>et al.</i> Mallat <i>et al.</i>	MVPs y MVEs	Niveles dos veces mayores en individuos con IAM y angina inestable	(22)
Koga <i>et al.</i>	MVEs	Niveles aumentados en voluntarios con DM y ECV. Marcador de aterosclerosis indicativo de disfunción endotelial.	(22)
Shiro <i>et al.</i>	MVEs	Niveles significativamente elevados en pacientes con sintomatología de enfermedad cardiaca	(21)
Nozaki <i>et al.</i>	MVs	Aumento de los niveles, indicativo de riesgo cardiovascular	(3)
DISFUNCIÓN ENDOTELIAL y ANGIOGÉNESIS			
Brodsky <i>et al.</i>	MVEs	Causan relajación de la pared vascular de la aorta en ratas	(18)
Leroyer <i>et al.</i>	MVs	Aumentan la proliferación endotelial por su acción sobre angiogénesis	(13, 21)
Szotowski <i>et al.</i>	MVEs	Relación entre formación de ROS y MVEs El uso de antioxidantes disminuye formación de ROS y de MVEs	(22)
Lozito y Tuan	MVEs	Capacidad de activar Ves de plaquetas lo que evidencia la capacidad de las VEs en inducir la degradación de la matriz; importante durante la angiogénesis y aterosclerosis	(14)
MEDIADOR PROINFLAMATORIO			
Wang <i>et al.</i>	MVEs	Contienen IL-1 β responsable de intensificar el proceso inflamatorio	(17)
ACTIVIDAD TROMBOGÉNICA			
Shiro	MVs de leucocitos	Inestabilidad de la placa aterosclerótica	(21)
Leroyer <i>et al.</i>	MVs de placa de ateroma	Potencial trombogénico	(13)

DM: Diabetes Mellitus; **ECV:** Enfermedad cardiovascular; **IAM:** Infarto Agudo de Miocardio; **ROS:** Especies Reactivas de Oxígeno; **MMP:** metaloproteinasas.

6. MICROVESÍCULAS EN EL ÁMBITO TERAPÉUTICO

Hemos explicado repetidamente que las MVs participan en las etiopatogenias de múltiples enfermedades cardiovasculares, particularmente en el inicio de la aterosclerosis (14). Por ello, existe un gran interés en evaluar los cambios que se producen en los niveles de MVs en respuesta a un tratamiento farmacológico (8). Por un lado, existe la posibilidad de actuar a nivel de la producción y liberación de MVs. El inconveniente es que los mecanismos celulares que intervienen en ambos procesos no están completamente claros por lo que aún no es posible dirigir estos procesos (8).

Aun así, varios fármacos anti-ateroscleróticos o algunos nutrientes dietéticos son capaces de dirigir su

acción terapéutica hacia MVs de diferente origen celular en sangre y mostrar un efecto protector cardiovascular (3). La reducción de los niveles del total de MVs o de una subpoblación específica, puede ser indicativo de la eficacia de un tratamiento o de la regresión de la enfermedad (34). También, una modulación de los niveles de MVs por la acción de un fármaco podría disminuir los efectos deletéreos inducidos por éstas (8).

Por otro lado, es importante resaltar que las MVs ofrecen una gran información de las posibles moléculas que pueden ser susceptibles de funcionar como dianas farmacológicas. Su contenido puede modificarse para contener las proteínas o genes activos deseados para dirigirse al sistema cardiovascular (3) (**Figura 3**).

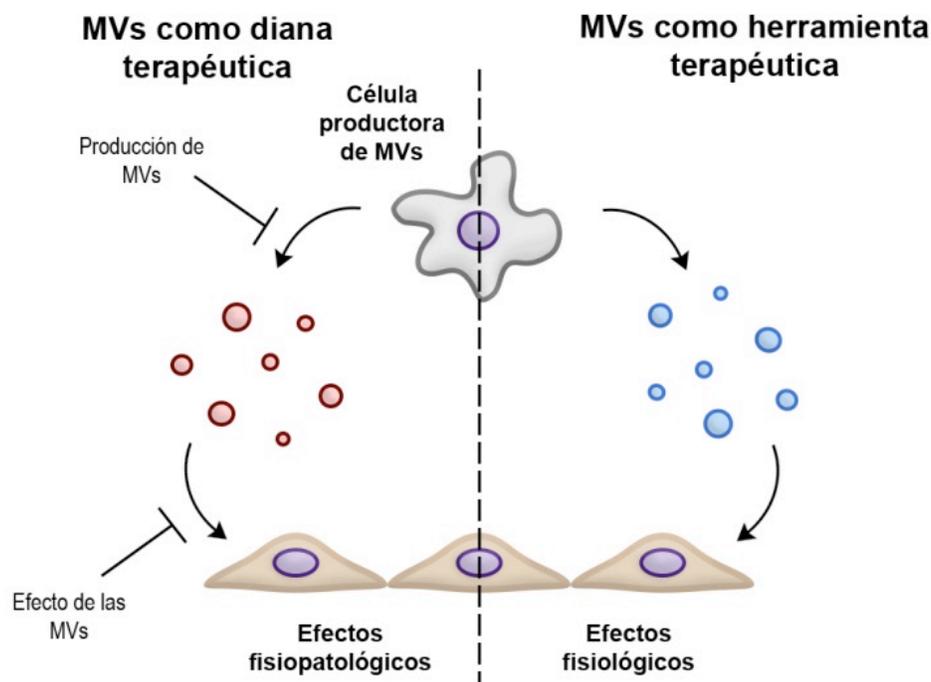


Figura 3. Función de las MVs como diana terapéutica y herramienta terapéutica (8). En el caso de actuar como diana terapéutica, la producción de MVs por diferentes tipos celulares en procesos patológicos, puede ser regulada al inhibir tanto la producción como el efecto de estas MVs. También las MVs pueden actuar como herramienta terapéutica, al poder modificar su contenido y así al actuar sobre la célula diana modifica su respuesta (efectos fisiológicos).

6.1. Microvesículas como diana terapéutica

Las MVs generadas a partir de diferentes tipos de células inducen disfunción endotelial debido a que son responsables de aumentar el estrés oxidativo, reducir la biodisponibilidad de óxido nítrico y producir inflamación cardiovascular. En teoría, el conocimiento sobre su formación y liberación representan un interesante objetivo terapéutico con el fin de limitar los niveles de MVs, pero los mecanismos subyacentes a la liberación no están completamente elucidados y es probable que no sean específicos. En cambio, una inhibición directa o indirecta del efecto que producen las MVs es una propuesta más efectiva (8).

Se ha demostrado el efecto de ciertos fármacos que se utilizan para disminuir el riesgo cardiovascular, tienen sobre los niveles plasmáticos de MVs, lo que sugiere que los efectos beneficiosos de estos fármacos podrían, al menos en parte, estar mediados a través de una reducción de la concentración de MVs (14). Entre estos fármacos y factores se encuentran:

Fármacos anti-ateroscleróticos: ciertos medicamentos cardio-protectores tales como bloqueadores de receptores de angiotensina II y bloqueadores de calcio actúan reduciendo las concentraciones plasmáticas de MVs o sobre marcadores en su superficie (21), lo que sugiere una relación con la acción beneficiosa de estos fármacos sobre

la enfermedad (9).

Hipolipemiantes como las **estatinas**, que disminuyen las concentraciones de colesterol plasmático (especialmente colesterol LDL), a través de la inhibición de la HMGCoA reductasa. Estos fármacos tienen efectos beneficiosos en la prevención de enfermedades cardiovasculares, no solo por la reducción de los niveles de colesterol, sino también por sus resultados sobre la función endotelial, la inflamación vascular y la activación y agregación de plaquetas (3, 9). Diferentes estudios demuestran que las estatinas reducen el número total de MVs en sangre, incluyendo las MVEs, las MVPs y las MVs derivadas de leucocitos, o modifican su composición (14). Parece ser que las estatinas inhiben la vía de las Rho-quinasas, implicada en la reorganización del citoesqueleto y, por tanto, en la formación de las MVs. Como resultado las estatinas influyen sobre el proceso de secreción de las MVs lo que conlleva una disminución de los niveles de MVs en sangre (3). Entre los estudios mencionados, se ha demostrado que las MVs liberadas por células endoteliales activadas por factor TNF- α , en pacientes con enfermedad coronaria, son suprimidas por fluvastatina (3). Por otro lado, el tratamiento con pravastatina durante 8 semanas redujo la expresión del receptor de GP IIb/IIIa en VEs de plaquetas, en pacientes con DM Tipo 2. Este receptor para el fibrinógeno juega un papel importante en la formación de trombos y está presente en las MVPs, donde su concentración depende del estímulo que ha inducido la formación de éstas. Su inhibición podría disminuir la formación de coágulos y contribuir a la disminución de eventos cardiovasculares. De igual modo, la atorvastatina durante 2 meses de tratamiento en pacientes con DM Tipo 1 y dislipidemia redujo el número de MVs que expresan GP IIb/IIIa, selectina P y FT (14).

Por otro lado, muchos estudios han revelado el efecto de la terapia combinada estatinas junto a fármacos cardio-protectores sobre los niveles plasmáticos de MVs; la asociación de simvastatina con losartán, un antagonista del receptor de angiotensina II utilizado en el tratamiento de la hipertensión, disminuyó las concentraciones de MVEs, MVPs y MVMs en pacientes con hipertensión y DM Tipo 2 (14).

Antiagregantes plaquetarios

a) **Aspirina**: el tratamiento crónico con aspirina (ácido acetilsalicílico) en una dosis estándar de 100 mg una vez al día, se ha comprobado que disminuye los niveles de VEs de plaquetas y VEs endoteliales después de 8 semanas de terapia en un 62,7% y 28,4%, respectivamente (3, 9). Sin embargo, existe una heterogeneidad de resultados dependiendo de la duración del tratamiento (9).

b) **Clopidrogel**: se ha visto que disminuye los niveles de MVEs *in vitro* e *in vivo*. Además, a medida que aumenta la concentración de clopidrogel en sangre disminuye el número de MVPs, lo que sugiere un papel protector frente a la enfermedad coronaria (3).

Antagonistas del receptor de glicoproteína IIb/IIIa: El efecto de estos fármacos está relacionado con

la inhibición de la unión del fibrinógeno a la GP IIb/IIIa, presente en la superficie de la membrana de las MVPs, y consecuentemente, la agregación plaquetaria. El tratamiento con **Abciximab** demostró disminuir los niveles plasmáticos de MVPs con acción pro-coagulante y de MVs derivadas de leucocitos en pacientes con infarto de miocardio (3).

IECAs como el **Irbesartán**: aumentan la movilización de EPCs en aterosclerosis inhibiendo así las MVs circulantes lo que contribuye a la reparación vascular (3).

Antioxidantes: se sabe que el estrés oxidativo, a través del estímulo en la liberación de MVs a plasma, es responsable de numerosos procesos deletéreos en la aterosclerosis. Una posible reducción de los niveles de MVs por el uso de antioxidantes, podría suponer una mejora de la función endotelial y una reducción de la activación plaquetaria (14). Curiosamente, un estudio que analiza los efectos del tratamiento con vitamina C durante 5 días, ha informado de una disminución de MVEs y MVPs en pacientes diabéticos y con dislipidemia después de sufrir infarto de miocardio, lo que contribuye a mejorar la función endotelial (3).

Dieta: Diferentes autores han resaltado la importancia de la dieta sobre la liberación de MVs, siendo quizás estas uno de los mecanismos implicados en el papel que la dieta tiene sobre el desarrollo de patologías cardiovasculares (35, 36).

a) Alimentos ricos en ácidos grasos monoinsaturados disminuyen los niveles de MVEs y aumentan la concentración de células endoteliales progenitoras en sangre, lo que refleja su acción a la hora de reducir el daño endotelial.

b) Polifenoles solos o junto con espirolactona previenen el aumento de la concentración de MVs en sangre, la inflamación vascular, el estrés oxidativo y la disfunción endotelial.

c) Flavonoides mejoran la función endotelial pues disminuyen los niveles de MVEs (3).

Otra vía de control terapéutico puede estar en el área de prevención de la interacción de las MVEs con el tejido diana. Este tipo de mecanismo terapéutico podría explorarse para prevenir interacciones con un tipo de interés celular. Los antagonistas de la integrina β_3 se han utilizado para evitar que las MVs interactuaran con el endotelio en un modelo de vaso-reactividad de la aorta del ratón. Los agentes específicos que se dirigen a la generación de MVEs también podrían ser de valor, tales como agentes que inhiben la actividad de la calpaína, la quinasa Rho o la disrupción del citoesqueleto (14).

6.2. Microvesículas como herramienta terapéutica

Las MVs pueden provocar efectos funcionales sobre células diana a través de diversos mecanismos conocidos como el contacto directo vesícula-célula, por interacción ligando-receptor, fusión y transferencia del contenido vesicular a la célula diana o indirectamente proporcionando un sitio de acoplamiento de moléculas o células que

interaccionan con la célula diana (13).

Los elevados niveles plasmáticos de MVs no siempre se acompañan por un efecto deletéreo; de hecho, algunas poblaciones de MVs pueden entregar mensajes biológicos protectores, preservando la función endotelial y/o la integridad vascular. Por ejemplo, las MVs circulantes de pacientes con sepsis han demostrado tener función protectora, en lugar de perjudicial, porque restauran la hiporeactividad vascular en vasos tratados con lipopolisacáridos a través de una mejora de la producción de tromboxano A2 (8).

Hay fenotipos específicos de MVs que tienen potencial terapéutico por su papel en la modulación de procesos y mecanismos celulares y por la capacidad de inducir reparación tisular después de la reprogramación de la célula diana; algunas MVs actúan sobre las EPCs aumentando su capacidad de diferenciarse a células endoteliales maduras y de migrar a las zonas lesionadas para reparar la lesión vascular (8).

Estas propiedades vienen de la gran variedad de biomoléculas y sustancias bioactivas con función anticoagulante y antiinflamatoria que contienen (37). Pérez Casal *et al.*, demostraron que se produce una liberación de MVs por células endoteliales tras exponerse a proteína C activada (APC); esta proteína C es un mediador con actividad anticoagulante y antiinflamatoria que reduce la producción de 1) trombina al inhibir la acción de los factores Va y VIII, 2) FT y 3) citoquinas, IL-6 y TNF- α , a través de su unión al receptor de proteína C en las células endoteliales y en las MVEs (21).

Desde que se conoce que las MVs son capaces de transferir a otras células información biológica, cobra mayor interés el uso de éstas como vehículo de suministro de moléculas con potencial terapéutico (21); su contenido podría modificarse químicamente para obtener una entrega más específica de moléculas bioactivas a un cierto tipo de célula que deba ser reparada o eliminada (37). También, por su capacidad para superar barreras naturales, sus propiedades en la comunicación celular y su estabilidad en la circulación, las MVs pueden aportar múltiples ventajas en terapias dirigidas como sistema de administración de terapias farmacológicas actualmente disponibles. Sin embargo, esta aplicación farmacéutica de las MVs tiene limitaciones por la falta de métodos y experiencia para el aislamiento de éstas y problemas asociados a la inyección de cantidad de fármaco suficiente para ser efectivo (21).

7. CONCLUSIÓN

Los diferentes tipos de MVs juegan un papel crucial en muchos procesos fisiológicos y patológicos. La medida de la disfunción endotelial a través de la detección de niveles plasmáticos de MVs mediante métodos mínimamente invasivos constituye una interesante perspectiva de ayuda diagnóstica y de orientación pronóstica adicional a la que se obtiene con la evaluación tradicional de los factores de riesgo convencionales.

Dado que se ha demostrado que las MVs actúan como mecanismos etiopatogénico en la disfunción endotelial y

subsecuente, en la enfermedad cardiovascular, caracterizar la expresión diferencial que caracteriza a estas MVs está permitiendo identificar nuevas dianas terapéuticas en estas patologías que incluso, emplean las MVs como herramienta farmacológica.

CONFLICTO DE INTERÉS Y DECLARACIÓN DE PRIVACIDAD

Los autores declaran no tener conflictos de intereses. Los nombres y direcciones de correo-e se usarán exclusivamente para los fines indicados y no estarán disponibles para ningún otro propósito o persona

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está financiado por el Plan Nacional Proyectos de Investigación en Salud del Instituto de Salud Carlos III (ISCIII) Fondos Feder (PI14/00806); Red de Investigación Renal (REDinREN; RD16/0009/0034) and Junta de Andalucía Grants, P12-CTS-7352.

8. REFERENCIAS

1. Emanuelli C, Shearn AI, Angelini GD, Sahoo S. Exosomes and exosomal miRNAs in cardiovascular protection and repair. *Vascul Pharmacol.* 2015;71:24-30.
2. Milasan A, Tessandier N, Tan S, Brisson A, Boilard E, Martel C. Extracellular vesicles are present in mouse lymph and their level differs in atherosclerosis. *J Extracell Vesicles.* 2016;5:31427.
3. Yin M, Loyer X, Boulanger CM. Extracellular vesicles as new pharmacological targets to treat atherosclerosis. *Eur J Pharmacol.* 2015;763(Pt A):90-103.
4. Rovira J, Diekmann F, Campistol JM, Ramírez-Bajo MJ. Therapeutic application of extracellular vesicles in acute and chronic renal injury. *Nefrologia.* 2017;37(2):126-37.
5. Lovren F, Verma S. Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction. *Clin Chem.* 2013;59(8):1166-74.
6. Díez-Campos A. Fisiopatología de la aterosclerosis. *Acta Neurol Colomb* 2010; 26(2): 4-15.
7. Mahajan K. Microparticles in Atherosclerosis: Biomarkers of Disease. *J Clin Exp Cardiology* 2015; 6:356.
8. Martinez MC, Tual-Chalot S, Leonetti D, Andriantsitohaina R. Microparticles: targets and tools in cardiovascular disease. *Trends Pharmacol Sci.* 2011;32(11):659-65.
9. Tomaniak M, Gąsecka A, Filipiak KJ. Cell-derived microvesicles in cardiovascular diseases and antiplatelet therapy monitoring - A lesson for future trials? Current evidence, recent progresses and perspectives of clinical application. *Int J Cardiol.* 2017;226:93-102.
10. Amabile N, Cheng S, Renard JM, Larson MG, Ghorbani A, McCabe E, et al. Association of circulating endothelial microparticles with

- cardiometabolic risk factors in the Framingham Heart Study. *Eur Heart J*. 2014;35(42):2972-9.
11. Xiong J, Miller VM, Li Y, Jayachandran M. Microvesicles at the crossroads between infection and cardiovascular diseases. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2012;59(2):124-32.
 12. Jayachandran M, Miller VM, Heit JA, Owen WG. Methodology for isolation, identification and characterization of microvesicles in peripheral blood. *J Immunol Methods*. 2012;375(1-2):207-14.
 13. Curtis AM, Edelberg J, Jonas R, Rogers WT, Moore JS, Syed W, et al. Endothelial microparticles: sophisticated vesicles modulating vascular function. *Vasc Med*. 2013;18(4):204-14.
 14. Baron M, Boulanger CM, Staels B, Tailleux A. Cell-derived microparticles in atherosclerosis: biomarkers and targets for pharmacological modulation? *J Cell Mol Med*. 2012;16(7):1365-76.
 15. Minciocchi VR, Freeman MR, Di Vizio D. Extracellular vesicles in cancer: exosomes, microvesicles and the emerging role of large oncosomes. *Semin Cell Dev Biol*. 2015;40:41-51.
 16. Espinosa Ferrer S. Tesis doctoral "Neovascularización mediada por factor tisular en la placa aterosclerótica"; Universidad de Barcelona, 2015.
 17. França CN, Izar MC, Amaral JB, Tegani DM, Fonseca FA. Microparticles as potential biomarkers of cardiovascular disease. *Arq Bras Cardiol*. 2015;104(2):169-74.
 18. Brodsky SV, Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286(5):H1910-5.
 19. Bodega G, Alique M, Bohórquez L, Ciordia S, Mena MC, Ramírez MR. The Antioxidant Machinery of Young and Senescent Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Their Microvesicles. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:7094781.
 20. Davalos AR, Coppe JP, Campisi J, Desprez PY. Senescent cells as a source of inflammatory factors for tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 2010;29(2):273-83.
 21. Vader P, Mol EA, Pasterkamp G, Schiffelers RM. Extracellular vesicles for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016;106(Pt A):148-56.
 22. Paudel KR, Panth N, Kim DW. Circulating Endothelial Microparticles: A Key Hallmark of Atherosclerosis Progression. *Scientifica (Cairo)*. 2016;2016:8514056.
 23. Burger D, Schock S, Thompson CS, Montezano AC, Hakim AM, Touyz RM. Microparticles: biomarkers and beyond. *Clin Sci (Lond)*. 2013;124(7):423-41.
 24. Qian Z, Shen Q, Yang X, Qiu Y, Zhang W. The Role of Extracellular Vesicles: An Epigenetic View of the Cancer Microenvironment. *Biomed Res Int*. 2015;2015:649161.
 25. Lei Q, Liu T, Gao F, Xie H, Sun L, Zhao A, et al. Microvesicles as Potential Biomarkers for the Identification of Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells. *Theranostics*. 2017;7(10):2673-89.
 26. Soriano S, Carmona A, Triviño F, Rodriguez M, Alvarez-Benito M, Martín-Malo A, et al. Endothelial damage and vascular calcification in patients with chronic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2014;307(11):F1302-11.
 27. Liu ML, Williams KJ. Microvesicles: potential markers and mediators of endothelial dysfunction. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2012;19(2):121-7.
 28. Schiro A, Wilkinson FL, Weston R, Smyth JV, Serracino-Inglott F, Alexander MY. Endothelial microparticles as conveyors of information in atherosclerotic disease. *Atherosclerosis*. 2014;234(2):295-302.
 29. Luna C, Carmona A, Alique M, Carracedo J, Ramirez R. TNF α -Damaged-HUVECs Microparticles Modify Endothelial Progenitor Cell Functional Activity. *Front Physiol*. 2015;6:395.
 30. Buendía P, Montes de Oca A, Madueño JA, Merino A, Martín-Malo A, Aljama P, et al. Endothelial microparticles mediate inflammation-induced vascular calcification. *FASEB J*. 2015;29(1):173-81.
 31. Kapustin AN, Davies JD, Reynolds JL, McNair R, Jones GT, Sidibe A, et al. Calcium regulates key components of vascular smooth muscle cell-derived matrix vesicles to enhance mineralization. *Circ Res*. 2011;109(1):e1-12.
 32. Alique M, Ruíz-Torres MP, Bodega G, Noci MV, Troyano N, Bohórquez L, et al. Microvesicles from the plasma of elderly subjects and from senescent endothelial cells promote vascular calcification. *Aging (Albany NY)*. 2017.
 33. Carmona A, Agüera ML, Luna-Ruiz C, Buendía P, Calleros L, García-Jerez A, et al. Markers of endothelial damage in patients with chronic kidney disease on hemodialysis. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2017;312(4):F673-F81.
 34. Valencia-Núñez DM, Kreutler W, Moya-Gonzalez J, Alados-Arboledas P, Muñoz-Carvajal I, Carmona A, et al. Endothelial vascular markers in coronary surgery. *Heart Vessels*. 2017.
 35. Marin C, Ramirez R, Delgado-Lista J, Yubero-Serrano EM, Perez-Martinez P, Carracedo J, et al. Mediterranean diet reduces endothelial damage and improves the regenerative capacity of endothelium. *Am J Clin Nutr*. 2011;93(2):267-74.
 36. Marin C, Delgado-Lista J, Ramirez R, Carracedo J, Caballero J, Perez-Martinez P, et al. Mediterranean diet reduces senescence-associated stress in endothelial cells. *Age (Dordr)*. 2012;34(6):1309-16.
 37. Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV. Extracellular vesicles and atherosclerotic disease. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(14):2697-708.