



TESIS DOCTORAL

**PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO
ARTERIALES EN CULTIVO.**

Memoria que presenta la licenciada en
Bioquímica, Sonia Perales Romero,
para optar al grado de doctor.

Fdo. Sonia Perales Romero

VºBº

DIRECTORES DEL TRABAJO

Mª José Alejandro Pérez
Dra. en Ciencias Biológicas
Profesora Titular de la
Universidad de Granada

Ana Linares Gil
Dra. en Ciencias Biológicas
Catedrática de la
Universidad de Granada

Fdo. Mª José Alejandro

Fdo. Ana Linares Gil

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Sonia Perales Romero
D.L.: Gr. 1032 - 2005
ISBN: 84-338-3467-3

La presente memoria ha sido realizada en su totalidad en el departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, con ayuda de una beca de Formación de personal Docente e Investigador de la Junta de Andalucía.

En la realización de la presente tesis he recibido el apoyo de numerosas personas a las que debo agradecer la ayuda prestada. Realizarla no hubiese sido posible sin su colaboración constante.

En primer lugar he de agradecer a mis dos directoras de tesis, Marichu y Ana, por el apoyo, confianza y estímulo que desde el primer momento han supuesto para la realización de esta tesis doctoral, además de reconocer que su dedicación ha ido mucho más allá de la labor propia de un director de tesis.

Igualmente he de agradecer a todos los miembros del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias su apoyo durante todos estos años, y muy especialmente a Rogelio, mi compañero de laboratorio en estos últimos años, por su ayuda incondicional y por recordarme la ilusión por la investigación. También a María y M^a Paz por su cercanía y apoyo, por último a Marisa por soportar mis elucubraciones científicas, acompañarme entre interminables tiempos de incubación y sobretodo por ser mi amiga.

A mis padres, mis maestros. Uno siempre recuerda con cariño los años de escuela y aquellos maestros que comenzaron a sembrar la curiosidad del saber, yo he tenido la suerte de que me acompañen durante toda mi vida. A ellos les debo todo lo que soy.

A mis hermanas, por su incomprensible confianza ciega en mí, por su aliento constante y por tantas cosas que sólo nosotras sabemos.

Finalmente y muy especialmente a Luis, mi consejero, mi cómplice, mi confidente, mi apoyo, mi alegría, mi aliento y mi amor, por pintar mi vida de colores.

A mi familia

A Luis

Abreviaturas

25-OH-Ch.- 25-hidrocixolesterol.

ACL_P.- Proteína aortica similar a carboxipeptidasas.

ADP.- Adenosin dinucleótido fosfato.

AIF.- Factor inductor de apoptosis.

ANT.- Translocador de nucleótidos de adenina.

Apaf-1.- Factor activador de apoptosis-1.

ApoE.- Apolipoproteína E.

ARC.- Dominio de reclutamiento de caspasas.

ARF.- Marco de lectura alternativo, del ingles *alternative reading frame*.

ATP.- Adenosin trinucleótido fosfato.

Bad.- Promotor de muerte asociado a Bcl-X_L/Bcl-2.

Bak.- Bcl-2 antagonista/killer.

Bark1.- Factor de transcripción bark.

Bax.- Proteína x asociada a Bcl-2.

Bcl-2.- Célula B del linfoma 2, del inglés *B-cell lymphoma 2*.

bcl-w.- Miembro de Bcl-2 anti-apoptótico.

bcl-X_L.- Forma larga del bcl-x, anti-apoptótico.

bFGF.- Factor de crecimiento de fibroblastos.

BH.- Bcl-2 homólogo.

Bid.- Dominio de muerte para la interacción BH3, del inglés *BH-3 Interacting Domain Death*.

Bik.- Del inglés *Bcl-2 interacting killer*.

Myb.- Oncogen myb.

BrdU.- 5-Bromo-2' deoxiuridina.

BrEt.- Bromuro de etidio.

BSA.-Albumina sérica bovina.

CARD.- Dominios de reclutamiento de caspasas.

CARDIAK.- Quinasa asociada a CARD.

Casp.- caspasa.

Cdc.- ciclinas.

Cdk.- ciclinas dependientes de quinasas.

c-fos.- Oncogen c-fos.

c-myc.- Oncogen c-myc.

Cp.- Punto de corte.

CPP 32.- Caspasa-3.

DD.- Dominio de muerte.

DED.- Dominio efector de muerte.

DDF.- Factor de fragmentación de DNA.

DHA.- Ácido decosahecanoico.

DHFR.- Dihidrofolato Reductasa.

dNTPs.- Desoxinucleótido trifosfato.

DR5.- Receptor de muerte 5.

DTT.- Ditioneitol.

E2F.- Factor de transcripción E2F.

EDTA.- Ácido etilén diaminotetraacético.

egr-1.- Oncogen egr-1.

EPA.- Ácido eicosapentanoico.

ERK.- Quinasas reguladoras de señal extracelular.

FADD.- Dominio de muerte asociado a Fas.

FAK.- Quinasas de adhesión focal.

Fas.- CD95/APO-1. Fas es miembro de la familia de receptores TNF .

FBS.- Suero bovino fetal.

FITC.- Isotiocianato de fluoresceína .

FLIP/FLICE.- Proteína inhibidora de FLICE/proteína ICE similar a Fas caspasa-8.

FO.- Aceite de pescado.

F-PP.- Farnesil pirofosfato .

GG-PP.- Geranyl geranyl pirofosfato .

HDL.- Lipoproteína de alta densidad.

HMG-CoA.- 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A.

Hsp.- Proteínas del choque térmico.

IAP.- Proteína inhibidora de apoptosis.

ICAD.-DNAsa inhibidora de caspasas activadas.

ICE.- Proteína convertora de la interleuquina.

IGF-1.- Factor de crecimiento similar a la insulina.

IL-3.- Interleuquina.

INF.- Interferón.

IP.- Ioduro de propidio.

I κ β .- Inhibidor de $\kappa\beta$

JNK/SAPK.- Jun quinasas/Sap quinasas

LDL.- Lipoproteínas d baja densidad.

LXR.- Receptor X de hígado.

MADS.- Motivo de factores de transcripción: MCM1, Agamous, Deficiens, SRF.

MAPK.-Quinasas de proteínas activadas por mitógenos.

MDM-2.- Proteína de unión a P53, del inglés *Mouse double minute 2*

MEKK-1 Quinasa activada por mitogenos/ERKquinasa.

MHC.- Cadena pesada de miosina.

Mhox.- Factor de transcripción Mhox.

MMP.- Metaloproteinasas.

MTT.- Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, sal de tetrazolio.

NADPH.- Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato.

NF-AT.- Factor nuclear de células T activadas.

NF- κ β .- Factor nuclear del locus kappa de las inmunoglobulinas en células B.

NGF.- Factor de crecimiento nervioso.

Nkx.- Factor de transcripción Nkx.

NO.- Óxido nítrico.

NOS.- Óxido nítrico sintasa.

Noxa.- Miembro proapoptótico de la familia Bcl-2.

Omi/HtrA2.- del inglés *high temperatura required protein A*.

oxLDL.- LDL oxidadas.

PARP.- Poly-ADP-Ribose-Polymerase.

PBS.- Tampón salino fosfato.

PCD.- Muerte celular programada.

PC-PLC.- Fosfolipasa C específica de fosfatidil colina..

PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa.

PDGF.- Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

PERP.- Efectores de apoptosis de p53 relacionados a PMP.

PMP.- Proteína polimorfa de membrana.

PI3K.- Fosfatidil inositol 3 quinasa.

PKC.- Proteína Quinasa C.

PLA2.- Fosfolipasa A2.

PLD.- Fosfolipasa D.

PMP-22/gas.- del inglés *peripheral myelin gene*

PMSF.- Fluoruro fenilmetasulfónico.

POD.- Peroxidasa.

PPAR.- Receptor peroxisomal de activación de proliferación.

PS.- Fosfatidil serina.

PTP.- Poro de permeabilidad transitoria.

PUFA.- Ácidos grasos poliinsaturados.

PUMA.- Miembro pro-apoptótico de la familia Bcl-2.

PVDF.- Polifluoruro de vinilideno.

RAIDD.- Proteína homóloga asociada a RIP con dominio de muerte.

Ras.- Oncogen ras.

Rb.- Proteína del retinoblastoma.

ROK.- Quinasas de rhoA/rho.

RIP.- Proteína de interacción con receptor.

ROS.- Sustancias reactivas del oxígeno.

SDS.- Dodecil Sulfato Sódico.

Smac/diablo.- Segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria/proteína de unión directa a IAP de bajo pI.

SMC.- Células de músculo liso.

SM-MHC.- Cadena pesada de la miosina de músculo liso.

SNAP.- S-Nitroso-N-Acetil Penicilinas.

SNP.- Nitroprusiato sódico.

SREBP.- Proteína de unión al elemento sensible a esteroides.

SRF.- Factor de respuesta a suero.

TCE.- elemento de control para TGF- β .

TGF- β .- Factor de crecimiento transformante.

TIMP.- Inhibidores de metaloproteinasas tejido específicas .

Tm.- Temperatura media de fusion o *meelting*.

TNF-R.- Receptor del factor de necrosis tumoral.

TRADD.- Proteína con domonio de muerte asociada a TNF-R1.

TRAF.- Factor asociado al receptor TNF.

TRIAL.- Ligando inductor de apoptosis relacionado con TNR.

TUNEL.- del ingles *terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP-mediated nick end labelling*

INDICE

ANTECEDENTES	1
A. MUERTE CELULAR PROGRAMADA	3
A.1.-Introducción	3
A.2.- Mecanismos moleculares de las rutas de la PCD	5
A.2.1.- Fase de decisión	6
A.2.1.1.- Genes que regulan el ciclo celular.....	6
A.2.1.1.1.- Gen supresor de tumores p53	7
A.2.1.1.2.- Factor de transcripción E2F-1	9
A.2.1.1.3.- Protooncogen c-myc.....	11
A.2.1.1.4.- Factor de transcripción NF- κ B.....	12
A.2.1.2.- Genes de la familia bcl-2.....	14
A.2.1.2.1.- Niveles de actuación de Bcl-2	17
A.2.1.3.- Receptores de la muerte celular.....	19
A.2.1.3.1.- Receptor Fas (CD95).....	20
A.2.1.3.2.- Receptor TNF-R1	22
A.2.1.4.- Citoquinas de supervivencia celular.....	22
A.2.2.- Fase de compromiso	22
A.2.2.1.- Papel de la mitocondria	23
A.2.2.2.- Papel del citocromo.c: formación del apoptosoma	25
A.2.3.- Fase de ejecución	26
A.2.3.1.- Caspasas	26
A.2.3.1.1.- Acciones de las caspasas	28
A.2.3.1.2.- Inhibición de caspasas	29
B.- LA CÉLULA MUSCULAR LISA	31
B.1.- La célula muscular lisa en las arterias	31
B.2.- Mecanismos moleculares que originan la diferenciación de las SMCs.....	33
B.3.- Modulación fenotípica de las SMC y su implicación en las patologías vasculares	36
B.4.- La célula muscular lisa en cultivo	39
C.- APOPTOSIS EN LAS SMC	42
C.1.- Introducción.....	42
C.2.- Tipos de SMC en relación con la apoptosis en la aterosclerosis.....	43
C.3.- Regulación de la apoptosis en lesiones ateroscleróticas tempranas	45
C.3.1.- Interacciones de SMC con otras células	46
C.3.2.- Interacciones SMC-citoquinas.....	47
C.3.3.- Interacciones en SMC proteínas-matriz extracelular.....	48
C.3.4.- Expresión de moléculas reguladoras de apoptosis en SMC	49
C.3.4.1.- Expresión del gen p53 en SMC	50
C.3.4.2.- Factor de transcripción c-Myc.....	51
C.3.4.3.- Familia bcl-2 de SMC	53

C.3.5.- Efecto de los factores circulantes en las SMC.....	53
C.4.- Papel de las lipoproteínas en el desencadenamiento del proceso apoptótico	54
C.4.1.- Efecto de las oxLDL sobre la expresión de genes de la familia bcl-2....	57
C.4.2.- Aumento en la actividad caspasa-3 por oxLDL	57
C.4.3.- Activación Fas/Fas-L por oxLDL.....	58
C.4.4.- Generación de sustancias reactivas del oxígeno por oxLDL.....	58
C.4.5.- Acumulación de ceramidas por oxLDL.....	59
C.4.6.- Aumento de los niveles de Ca ²⁺ por oxLDL	60
C.4.7.- Inhibición de la síntesis de colesterol por oxLDL.....	60
C.4.8.- Inducción por oxLDL de la degradación o el bloqueo de supervivencia Akt.....	62
C.4.9.- Otros efectos de las oxLDL sobre el proceso apoptótico	62
C.5.- Apoptosis en SMC regulada por óxido nítrico	63
C.5.1.- Acciones pro-apopticas del NO en SMC	65
C.5.2.- Acciones anti-apoptóticas del NO en SMC.....	68
D. CONTROL NUTRICIONAL Y REGULACIÓN GÉNICA POR NUTRIENTES EN LA ATROSCLEROSIS Y LA APOPTOSIS	69
D.1.- Papel del colesterol en la aterosclerosis y la apoptosis	69
D.2.-Papel de los ácidos grasos polinsaturados en la aterosclerosis y apoptosis ...	72
OBJETIVOS.....	77
MATERIAL Y MÉTODOS	81
E.1.- Material.....	83
E.1.1.- Material biológico.....	83
E.1.2.- Instrumentación	84
E.1.3.- Productos químicos.....	86
E.2.- Métodos	87
E.2.1.- Animales y dietas.....	87
E.2.2.- Obtención de los cultivos de células de músculo liso.....	87
E.2.3.- Mantenimiento de los cultivos de células de músculo liso.....	88
E.2.4.- Tratamientos <i>in vitro</i>	89
E.2.5.- Análisis de la proliferación celular en cultivos SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO	89
E.2.5.1.- Análisis del contenido celular de DNA, mediante citometría de flujo.....	89
E.2.5.2.- Medida de la Síntesis de DNA: incorporación de BrdU.....	90
E.2.5.2.1.- Incorporación de BrdU	91
E.2.5.2.2.- Inmunoensayo.....	91
E.2.6. Detección de citotoxicidad y viabilidad celular	92
E.2.7.- Detección de Apoptosis	93
E.2.7.1.- Detección morfológica de apoptosis.....	93
E.2.7.2.- Cuantificación de apoptosis mediante Anexina-V.....	93
E.2.7.2.1.- Análisis de las muestras mediante citometría de flujo.....	95

E.2.8.- Análisis de proteínas mediante Western-Blot.....	95
E.2.8.1.- Extracción de proteínas.....	95
E.2.8.2.- Electroforesis y transferencia de proteínas.....	96
E.2.8.3.- Inmunodetección.....	96
E.2.9.- Extracción y cuantificación de RNA.....	97
E.2.9.1.- Electroforesis de RNA.....	97
E.2.10.- Síntesis de cDNA.....	98
E.2.11.- PCR a tiempo-real.....	98
E.2.11.1.- Curvas de eficiencia y linealidad.....	101
E.2.11.2.- Cuantificación.....	105
E.2.11.3.- Variabilidad y reproducibilidad.....	108
 RESULTADOS.....	 109
 F.- ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN CULTIVOS SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO.....	 111
F.1.- Análisis del contenido celular de DNA mediante Citometría de Flujo.....	111
F.1.1.- Porcentaje de células SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO en fase G0/G1.....	116
F.1.2.- Porcentaje de células SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO en fase G2/M.....	117
F.1.3.- Porcentaje de células SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO en fase S.....	118
F.2.- Medida de la Síntesis de DNA por medio de la incorporación de BrdU.....	119
 G.- CITOTOXICIDAD Y VIABILIDAD CELULAR.....	 123
G.1 Citotoxicidad del 25-Hidroxicolesterol en SMC procedentes de pollos de 10 días.....	123
G.2 Citotoxicidad del 25-Hidroxicolesterol en SMC procedentes de pollos de 20 días.....	126
G.3 Citotoxicidad del NO en SMC procedentes de pollos de 10 días.....	128
G.4 Citotoxicidad del NO en pollos de 20 días.....	130
 H.- DETECCIÓN DE APOPTOSIS EN CULTIVOS SMC.....	 131
H.1.- Detección morfológica de apoptosis.....	131
H.2.- Detección de Apoptosis en cultivos SMC por medio de Anexina-V.....	134
 I.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN- BLOT.....	 140
I.1.-Expresión a niveles basales de Bax, Bcl-X _L y Bcl-2 en cultivos de células SMC procedentes de pollos alimentados durante 20 días.....	140
I.2.- Efecto del 25-hidroxicolesterol y del nitroprusiato sobre los niveles de expresión de Bax.....	141
I.2.1.- Expresión de Bax en SMC procedentes de pollos alimentados durante 10 días.....	142
I.2.2.- Expresión de Bax en SMC procedentes de pollos alimentados durante 20 días.....	143

I.3.- Efecto del 25-hidroxicolesterol y del nitroprusiato sobre los niveles de expresión de Bcl-X _L	144
I.3.1.- Expresión de Bcl-X _L en cultivos de SMC procedentes de pollos alimentados durante 10 días	144
I.3.2.- Expresión de Bcl-X _L en cultivos de SMC procedentes de pollos alimentados durante 20 días	146
I.4.- Efecto del 25-hidroxicolesterol y del nitroprusiato sobre los niveles de expresión de Bcl-2 en cultivo de células SMC procedentes de pollos alimentados durante 20 días	147
I.5.- Proporción de expresión Bcl-2/Bcl-X _L y Bcl-2/Bax en los cultivos SMC ...	150
J.- CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT-PCR A TIEMPO-REAL.....	152
J.1.-Cálculo de eficiencias de amplificación	153
J.1.1.- Cálculo de eficiencias de amplificación para el gen de la β-actina	154
J.1.2.- Cálculo de eficiencias de amplificación para el gen de Bcl-2	155
J.1.3.- Cálculo de eficiencias de amplificación para el gen de bcl-X _L	157
J.1.4.- Cálculo de eficiencias de amplificación para el gen de c-myc.....	158
J.1.5.- Cálculo de eficiencias de amplificación para el gen de p53	160
J.1.6.- Cálculo de eficiencias de amplificación para el gen de caspasa-3	161
J.2.- Comprobación de la especificidad del producto de PCR	163
J.2.1.- Análisis de la curva de desnaturalización para el gen de actina	164
J.2.2.- Análisis de la curva de desnaturalización para el gen de bcl-2	164
J.2.3.- Análisis de la curva de desnaturalización para el gen de bcl-X _L	165
J.2.4.- Análisis de la curva de desnaturalización para el gen de c-myc.....	165
J.2.5.- Análisis de la curva de desnaturalización para el gen de p53.....	166
J.2.6.- Análisis de la curva de desnaturalización para el gen de caspasa-3	166
J.3.- Cuantificación relativa de la expresión génica para los genes bcl-2, bcl-X _L , c-myc, p53, caspasa-3	167
J.3.1.- Análisis de la expresión de bcl-2 en SMC-C, SMC-Ch y SMC-CH-FO a nivel basal, tras la adición de 25-Hidroxicolesterol y nitroprusiato.....	168
J.3.2.- Análisis de la expresión de bcl-X _L en SMC-C, SMC-Ch y SMC-CH-FO a nivel basal, tras la adición de 25-Hidroxicolesterol y nitroprusiato.....	169
J.3.3.- Análisis de la expresión de c-myc en SMC-C, SMC-Ch y SMC-CH-FO a nivel basal, tras la adición de 25-Hidroxicolesterol y nitroprusiato.....	170
J.3.4.- Análisis de la expresión de p53 en SMC-C, SMC-Ch y SMC-CH-FO a nivel basal, tras la adición de 25-Hidroxicolesterol y nitroprusiato.....	172
J.3.5.- Análisis de la expresión de caspasa-3 en SMC-C, SMC-Ch y SMC-CH-FO a nivel basal, tras la adición de 25-Hidroxicolesterol y nitroprusiato.....	173

DISCUSIÓN.....	175
K.1. Modelo celular de aterosclerosis experimental temprana SMC-C/SMC-Ch y SMC-Ch-FO	177
K.2. Análisis de la proliferación celular en cultivos SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO	179
K.3. Citotoxicidad y viabilidad celular.....	182
K.4. Detección de apoptosis en cultivos SMC	184
K.5. Análisis de la expresión de proteínas mediante “western-blot”	187
K.6. Cuantificación de la expresión génica mediante RT- PCR a tiempo-real	190
CONCLUSIONES.....	195
REFERENCIAS	201

ANTECEDENTES

A. MUERTE CELULAR PROGRAMADA

A.1.-Introducción

El término apoptosis lo utilizaron por primera vez los investigadores Wyllie, Kerr y Currie en 1972, para indicar una nueva forma de muerte celular (1). En este caso las células morían de una manera morfológicamente distinta a la muerte por necrosis, ya que se producían una serie de cambios secuenciales que no tenían como resultado la pérdida de la integridad de la membrana celular y que además no desencadenaban una respuesta inflamatoria, tal y como ocurría en la muerte por necrosis. Más tarde los embriólogos describieron estos mismos cambios como muerte celular programada (PCD) (2,3). Lo cierto es que puede haber tantas formas de morir “activa o programadamente” como tipos celulares hay. Por esta razón, actualmente muchos autores prefieren utilizar el termino PCD en vez de apoptosis, siempre que los componentes de la célula participen de una forma activa en su muerte, sin necesidad de que se den todos los cambios morfológicos que se han descrito en el término apoptosis.

Puesto que existen distintos tipos de muerte celular definidos por criterios morfológicos y bioquímicos, vamos a señalar las diferencias entre necrosis y apoptosis o PCD.

En el proceso de necrosis, la célula se caracteriza por incrementar su tamaño celular, los orgánulos celulares se desorganizan y la mitocondria se hincha mientras que la membrana mitocondrial interna se contrae, la cromatina aparece dispersa y finalmente la membrana celular se rompe liberando todo el contenido celular y moléculas pro-inflamatorias que desencadenan una respuesta inmune.

En el proceso apoptótico, los cambios celulares que se producen son diferentes tal y como se describe a continuación (4):

- Las células se encogen y pierden el contacto con células vecinas. Se han descrito reducciones en el volumen celular de incluso el 30%. Esto es

provocado por el movimiento de fluidos fuera de la célula, debido a la inhibición del sistema de cotransporte $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{Cl}^-$.

- Las cisternas del retículo endoplásmico liso se dilatan y pueden fusionarse con la membrana plasmática, pero el resto de orgánulos celulares en el citoplasma permanecen intactos. También hay una gran activación de transglutaminasas las cuales producen el entrecruzamiento de proteínas citoplasmáticas, que van formando polímeros.
- La fosfatidilserina, presente en la cara interna de la membrana plasmática, pasa al exterior de la membrana plasmática. Esto va a hacer que la célula sea reconocible por los macrófagos.
- La cromatina se condensa, el núcleo sufre unos cambios dramáticos y el primero de ellos es la condensación de la cromatina y su acumulación en su periferia. Además el nucleolo se desintegra en partículas osmiófilas.
- Fragmentación nuclear por las endonucleasas endógenas que rompen el DNA en fragmentos oligonucleosomales de entre 180-200pb. Esto produce el característico patrón de DNA en escalera cuando se analiza en electroforesis y se utiliza como marca bioquímica en el reconocimiento de la apoptosis. Este patrón no es visible en todos los tipos celulares ya que depende de que la rotura se produzca en las dos cadenas y del grado de fragmentación.
- La membrana plasmática comienza a tener circunvoluciones y adquiere una apariencia vesicular característica, externamente la célula parece que hierve. Además, la célula pierde elementos de superficie como microvellosidades y uniones célula-célula.
- Como resultado de las grandes invaginaciones aparecen los cuerpos apoptóticos. Estos tienen la membrana intacta (son impermeables a los colorantes vitales), mantienen sus mitocondrias intactas, y contienen cuerpos densos granulares que corresponden a fragmentos nucleares, los cuales, también se producen por las grandes invaginaciones de la membrana nuclear. Estos cuerpos apoptóticos pueden ser reconocidos por macrófagos y ser fagocitados. En cambio, cuando las células están en cultivo, suelen hincharse y destruirse, conociéndose entonces como apoptosis secundaria o falsa necrosis.

Dentro de la PCD se han descrito, en el contexto del desarrollo embrionario, tres tipos morfológicos de PCD (5), que son:

Tipo I, muerte celular por apoptosis, en la que se dan los principales eventos morfológicos descritos anteriormente.

Tipo II, muerte celular autofágica, caracterizada por la formación de vacuolas autofágicas.

Tipo III se caracteriza por la pérdida rápida de la integridad de la membrana plasmática y la fuga del contenido intracelular.

El papel que tiene el proceso apoptótico en los organismos pluricelulares no es solamente durante el desarrollo (en particular en la morfogénesis, diferenciación sexual, formación y maduración del sistema nervioso y sistema inmune) sino que también es crucial para mantener la homeostasis tisular en el adulto, eliminando células dañadas o anómalas en la defensa contra infecciones y en la regulación del proceso fisiológico de envejecimiento.

Antes de descubrir el proceso apoptótico se pensaba que los procesos de senescencia, diferenciación y proliferación controlaban la población celular. El descubrimiento de que la apoptosis es un proceso activo implica también que es un proceso regulado (6-8). Por lo que la desregulación de la maquinaria de PCD está implicada en condiciones patológicas tan importantes como pueden ser el cáncer y las enfermedades autoinmunes.

A.2.- Mecanismos moleculares de las rutas de la PCD

El mecanismo de la apoptosis es extremadamente complejo y sofisticado. Así, múltiples moléculas promueven la muerte celular, amplificando efectos en cascada y retroalimentación positiva, todo para asegurar que una vez iniciado el proceso sea rápido, fatal e irreversible. Como mecanismo de seguridad, la célula produce reguladores para asegurar que pequeñas alteraciones no den lugar a una muerte innecesaria.

La regulación de la PCD se produce a varios niveles que dividimos en tres fases: fase de decisión, fase de compromiso y fase de ejecución.

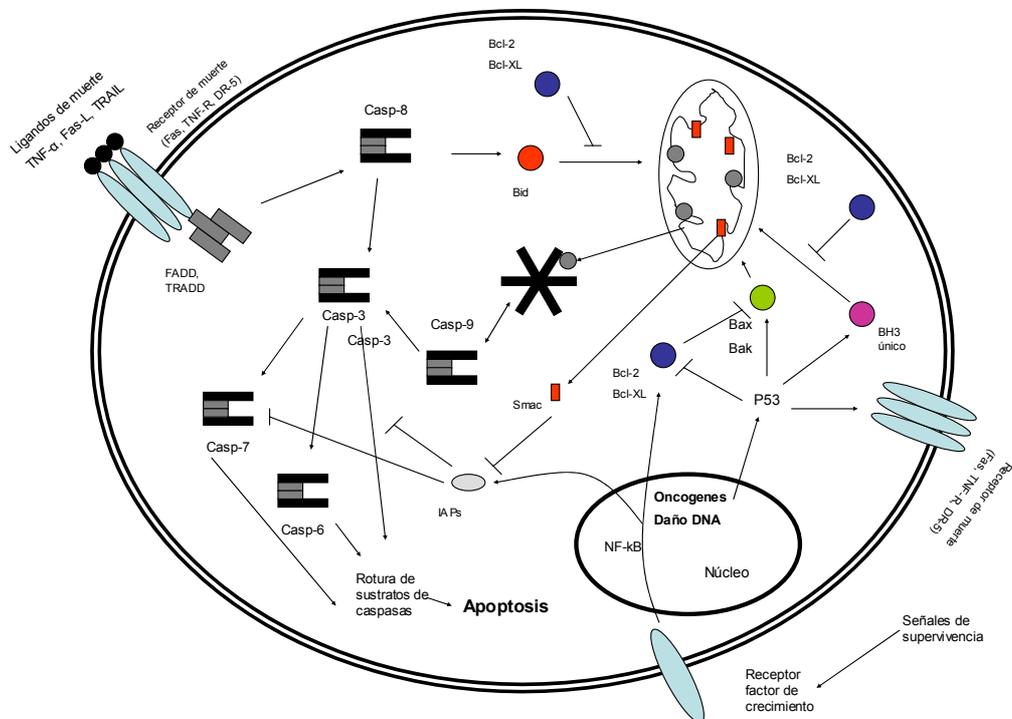


Figura A 1.- Representación esquemática de las rutas apoptóticas más importantes

A.2.1.- Fase de decisión

Es la fase en la que la célula toma la “decisión” de entrar en apoptosis no presentando ningún evento morfológico, por lo que es difícil de observar. En esta fase la célula integra los estímulos de señales pro y antiapoptóticas tanto externas como internas. Estas señales vienen dadas por proteínas codificadas por genes, algunos conocidos y otros desconocidos, entre los que se encuentran: algunos genes de los que regulan el ciclo celular, los genes de la familia Bcl-2 y las citoquinas de supervivencia:

A.2.1.1.- Genes que regulan el ciclo celular

Los procesos de proliferación y apoptosis están íntimamente relacionados, ya que muchos de los genes implicados en el proceso de proliferación tienen un doble

papel al participar también en la PCD. Este doble papel, se interpreta como un doble control celular, ya que las células que tienen lesiones oncogénicas son más sensibles a los estímulos apoptóticos (9). Esto significa que si escapan al control del ciclo celular, como ocurre con las células cancerígenas, el organismo “decide” deshacerse de ellas. Así, en el caso de que los genes que inhiben la apoptosis estén mutados sería altamente tumorigénico (10). Algunos de estos genes son: p53, c-myc, E2F, NF- κ B (11,12).

A.2.1.1.1.- Gen supresor de tumores p53

El gen supresor de tumores p53 se activa en respuesta a un daño en el DNA o mediante estímulos de estrés celular. Su activación da lugar a una parada del ciclo celular (en G1 y/o G2) y a un proceso de senescencia o de apoptosis. El que suceda una cosa u otra depende de las señales que le lleguen tanto externas como internas.

Entre los genes que regulan transcripcionalmente la proteína P53 están implicados genes necesarios para la parada del ciclo celular y genes que codifican proteínas implicadas en la regulación de la apoptosis (13). Su papel como factor de transcripción directo está demostrado en el proceso de parada del ciclo celular, sin embargo en el proceso apoptótico hay descritos casos en los que su papel como factor de transcripción no es fundamental para su acción apoptótica (14). En este caso la acción apoptótica de P-53 se localizaría fundamentalmente a nivel mitocondrial (15), donde P53 puede interaccionar directamente con Bcl-2 y Bcl-X_L, liberando moléculas proapoptóticas como Bak y Bax que se hayan unidas a Bcl-2 y Bcl-X_L y por tanto quedarían libres para inducir los cambios mitocondriales que llevarían a la liberación de factores apoptogénicos de la mitocondria. De acuerdo con esto, un exceso de Bcl-X_L y Bcl-2 inhibiría la liberación del citocromo-c de la mitocondria inducida por P53. (16). El dominio por el que P53 se une a Bcl-2 y a Bcl-X_L, es considerado como punto caliente de mutación, ya que en muchos tipos de tumores esta zona está mutada. Al no responder la célula a la inducción apoptótica de P53, se produce una presión selectiva positiva para la formación de tumores.

Así, la proteína P53 como factor de transcripción en la apoptosis actuaría a varios niveles y en dos rutas distintas, una extrínseca en la que están implicados los receptores de muerte, y otra intrínseca en la que está implicada la mitocondria:

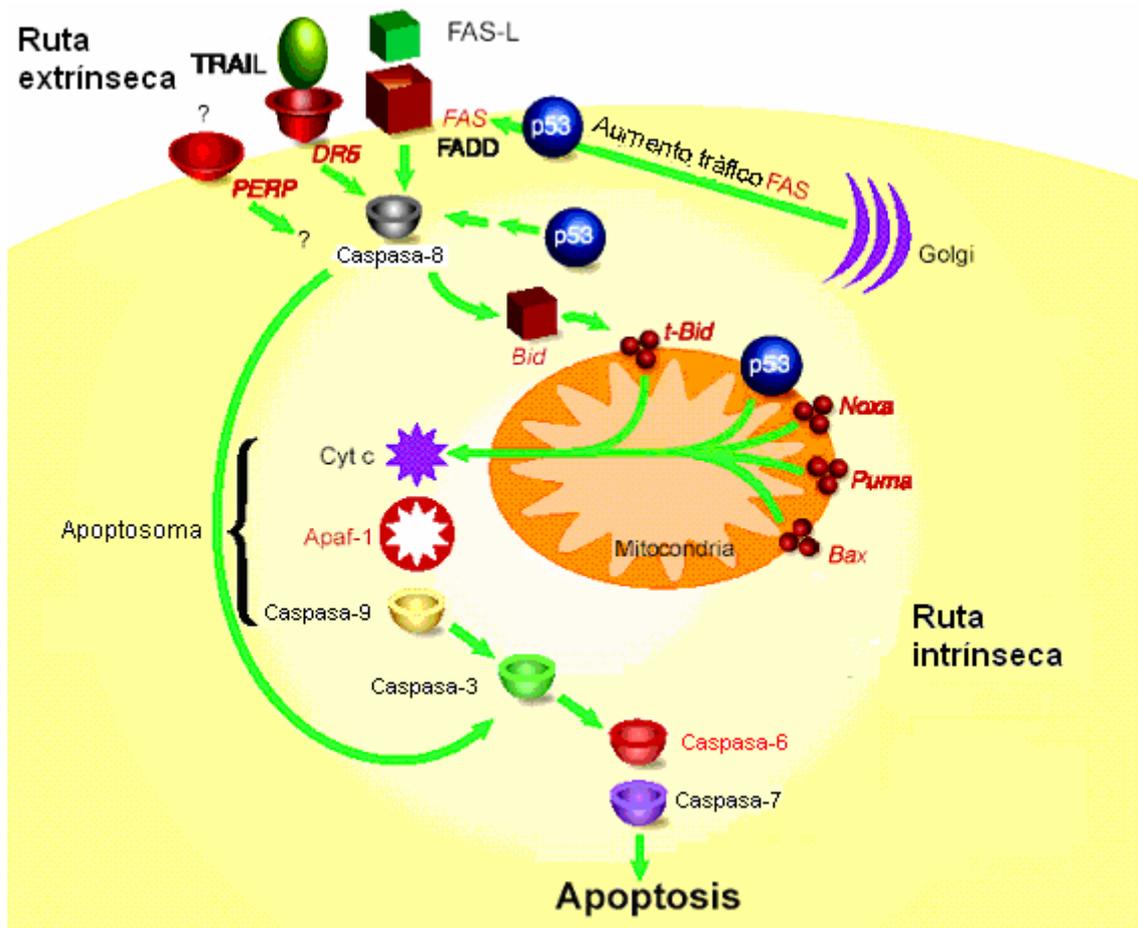


Figura A.2.- Ruta extrínseca y ruta intrínseca en la apoptosis mediada por P53

La ruta extrínseca, es aquella en la cual están implicados los llamados receptores de muerte, pertenecientes a la familia TNF-R, los cuales mediante transducción de señales llevan a la activación de caspasas, especialmente caspasa-8 y caspasa-3. P53 puede activar esta ruta induciendo la expresión de tres proteínas transmembrana que son: Fas, DR5 y PERP:

- El receptor de superficie Fas (CD95/Apo-1 de la familia TNF-R), (17) y favorecer el tráfico de Fas a la membrana de forma que sensibiliza a las células a la muerte mediada por Fas (18).

- El receptor DR5 (DR5/Killer) contiene el dominio de muerte para el ligando TRAIL (ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF). (19).
- PERP es una proteína transmembrana miembro de la familia PMP-22/gas (implicadas en la regulación del crecimiento celular), este es una diana directa de P53.

La ruta intrínseca implica a la mitocondria donde produce la liberación de factores proapoptóticos desde ella. P53 es responsable de la inducción directa de los genes proapoptóticos de la familia bcl-2 que codifican para Bax, Noxa, PUMA y Bid entre otros. Además P53 activa la expresión de Apaf-1 (20), que junto al citocromo c proveniente de la liberación de la mitocondria, son los iniciadores para la formación del apoptosoma. Esta activación está incrementada por E2F-1.

La conexión de la ruta extrínseca con la intrínseca también la realiza P53, mediante la regulación transcripcional de Bid. Este miembro proapoptótico de la familia Bcl-2 es activado por caspasa-8, la cual se activa por la ruta extrínseca y una vez activado Bid es capaz de traslocarse a la mitocondria y activar a Bak, desencadenando la activación de la ruta intrínseca (21).

Por último P53 también puede activar la cascada de caspasas tanto por su acción transcripcional como sin ella. Así, puede inducir directamente a caspasa-6 e indirectamente a caspasa-8

A.2.1.1.2.- Factor de transcripción E2F-1

E2F-1 es el miembro de la familia de factores de transcripción E2F mejor caracterizado. Su acción más conocida es la activación de la proliferación, ya que regula genes implicados en el control del ciclo celular como son las ciclinas cdc2, cdc25a y la ciclina E, así como genes que codifican proteínas implicadas en la síntesis de DNA como DHFR (dihidrofolato reductasa), timidita quinasa, y DNA polimerasa- α .

La actividad de E2F-1 más importante es a nivel de regulación de la proteína Rb. La fosforilación de Rb durante la fase G1 por las ciclinas dependientes de quinasas (Cdk) provoca la disociación de E2F-1 y por tanto este queda libre y puede activar la transcripción de genes que están implicados en la entrada de la célula en fase S.

El papel de E2F-1, no es importante sólo en la proliferación sino también en la apoptosis (22) ya que ésta puede ser inducida por E2F-1 al menos por tres mecanismos:

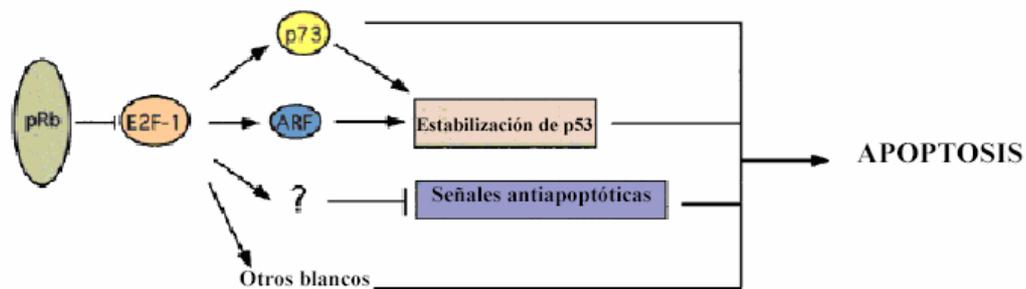


Figura A.3.- Esquema sobre las principales acción apoptótica de E2F

- Inhibición de señales antiapoptóticas: Como ya se ha dicho, la activación del receptor TNF-R, lleva a la activación de la cascada de caspasas y por tanto a la ejecución de la apoptosis, pero también activa una ruta antiapoptótica mediante la activación de las funciones de supervivencia celular de NF-KB y JNK/SAPK. E2F-1 puede anular esta ruta o bien la señal antiapoptótica, manteniendo intacta la proapoptótica (23,24).
- Activación transcripcional de p73 (homólogo de p53): La habilidad de p53 para inducir apoptosis es compartida por otros miembros de la familia de genes supresores de tumores como p73. E2F-1 es un activador transcripcional directo de p73.
- Estabilización de P53: La proteína P53 se encuentra siempre en un nivel bajo, mediante regulación feedback negativa, es decir P53 activa a MDM-2, que es un mediador de la degradación de P53 (25). E2F-1

provoca la estabilización de P53 ya que es capaz de inducir a P14^{ARF}, la cual inactiva a su vez a MDM-2. En muchos sistemas se ha comprobado que la cooperación entre P53 y E2F-1 es necesaria para que la apoptosis se produzca..

A.2.1.1.3.- Protooncogen c-myc

El protooncogen c-myc codifica el factor de transcripción c-Myc, el cual está desregulado en una gran variedad de tumores humanos (26,27). c-Myc actúa a muchos niveles ya que puede activar la proliferación, el crecimiento celular, inhibir la diferenciación terminal de la mayoría de los tipos celulares y sensibiliza a las células para entrar en la apoptosis (28).

La expresión de c-myc está muy controlada por señales externas del tipo factores de crecimiento y mitógenos. La activación de c-myc, provoca la entrada en la fase G1 induciendo la proliferación y actúa a varios niveles: Es un activador transcripcional de ciclinaE-cdk2, necesaria para la progresión de G1-S (29,30), así como de ciclinaD2 y cdk4, estas secuestran a KIP1 (inhibidor de ciclinas/p27). Esto hace que no se pueda inactivar el complejo ciclinaE-cdc2 y por tanto que se produzca la progresión del ciclo celular. Además, cdk2 y cdk4 van a hiperfosforilar Rb, provocando la liberación de E2F-1, como se ha visto anteriormente.

c-Myc posee además actividad proapoptótica (31-33). Una de las explicaciones de esta doble acción es el hecho de que oncoproteínas como c-myc ponen en funcionamiento toda la maquinaria proteica de la proliferación que está íntimamente ligada con la maquinaria apoptótica, por tanto, su acción sensibiliza a la célula a los estímulos apoptóticos. Los mecanismos por los que puede inducir la apoptosis son:

- Inhibición de la señal de supervivencia de la ruta NF-KB (34).
- Activación de la proteína proapoptótica Bax que libera el citocromo c de la mitocondria.
- Activación indirecta de P53 vía ARF (35).

- Activación de la unión de Fas con su proteína adaptadora intracelular FADD (dominio de muerte asociado a Fas), que culmina con la activación de caspasa-8 (36).

Las rutas por las cuales c-myc ejerce estas funciones no son muy conocidas y hay que destacar que es muy posible que c-myc por si mismo no induzca la apoptosis, si no que sensibilice a la célula para recibir otros estímulos apoptóticos.

A.2.1.1.4.- Factor de transcripción NF- κ B

NF- κ B es un factor de transcripción de respuesta al estrés que juega un papel muy importante en el desarrollo y en la inmunidad, y cuya principal función es la de activar los llamados genes de supervivencia, los cuales incluyen genes implicados en el crecimiento celular, en la inflamación y en la apoptosis. La familia NF- κ B/Rel consta de cinco miembros: c-Rel, P65, RelB, P50 y P52, los cuales forman heterodímeros siendo los más frecuentes P50/P65.

Estas formas están secuestradas en el citoplasma por el grupo de proteínas inhibitoras denominadas I κ B. Determinados estímulos como factores de crecimiento, citoquinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF), especies reactivas del oxígeno y productos virales, producen la activación de las quinasas de I κ B (I κ K) que fosforilan la región consenso del extremo N-terminal de I κ B. El I κ B fosforilado es la señal para la ubiquitinización de éste y la subsiguiente degradación por el proteasoma. Esto da como resultado la liberación NF- κ B, su translocación al núcleo y su unión a los elementos de respuesta NF- κ B, seguido de una activación transcripcional de estos genes (37).

La activación de NF- κ B como ya se ha dicho viene determinada por muchos estímulos pero el más conocido es la acción del TNF (38). En este caso la activación de NF- κ B, se encarga de inhibir la señal apoptótica mediada por este. En ausencia de NF- κ B, TNF es capaz de activar la cascada de proteasas específicas de la apoptosis (caspasas) y de activar al proteína Bid, que es un miembro pro-apoptótico de la familia bcl-2, y cuya misión es la de trasladarse a la mitocondria y desencadenar por distintos

mecanismos, la liberación del citocromo c y otros factores proapoptóticos de la mitocondria.

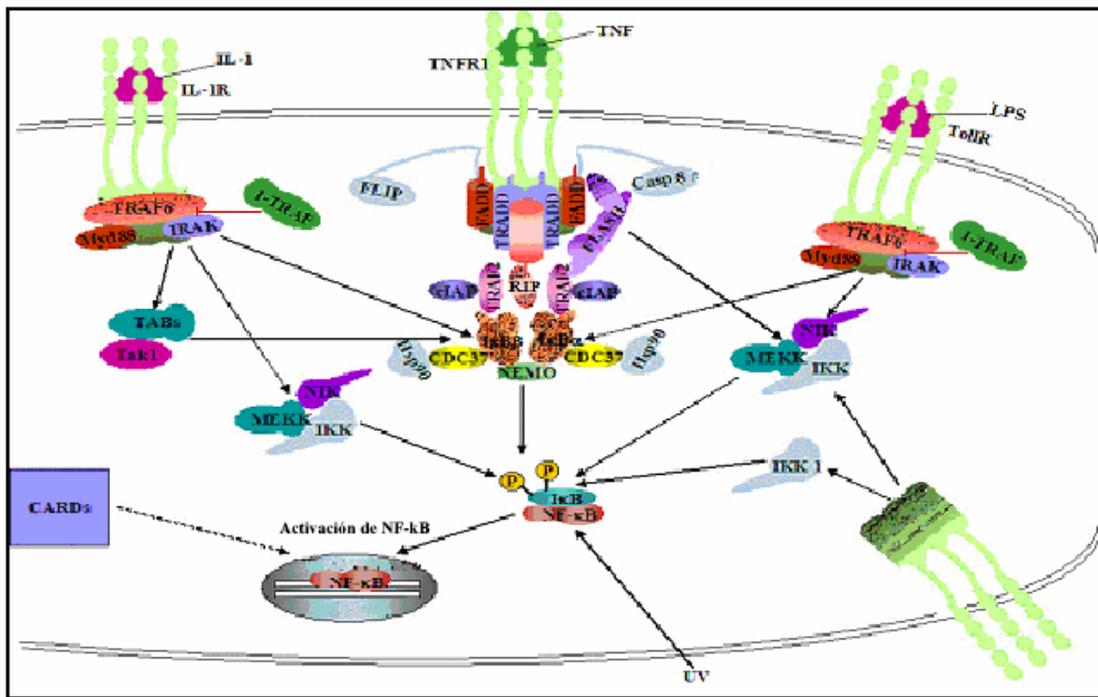


Figura A.4.- Principales rutas que llevan a la activación del factor NF-κβ

Entre los genes que controla NF- κβ hay que destacar (37, 38):

- Genes que promueven la proliferación celular como el oncogen c-myc, cuyo promotor tiene sitio de unión para este factor de transcripción. La activación de c-myc en definitiva se produce por las señales de crecimiento que le llegan a la célula y promueve la proliferación celular. En diversos tipos celulares está demostrado que sustancias que reducen el nivel funcional de NF- κβ, producen también la disminución de la expresión de c-myc al estar éste bajo el control de NF- κβ, lo que lleva a las células a la apoptosis.
- Genes que inhiben la apoptosis y por tanto promueven la supervivencia celular como son: Genes antiapoptóticos de la familia bcl-2, que preservan principalmente la integridad mitocondrial; genes que codifican

para proteínas de la familia IAP (inhibidor apoptótico), las cuales puede inhibir enzimáticamente a determinadas caspasas; y genes que expresan proteínas de la familia TRAF, que median en la activación de NF- κ B e inhiben la formación de ceramida inhibiendo a su vez a esfingomielinasas activadas por receptores de membrana de tipo TNF.

Por todo esto es fundamental que, NF- κ B esté activo para que la célula pueda dividirse, si los estímulos son los adecuados, mientras que si la célula recibe señales de muerte o las condiciones para su crecimiento no son adecuadas, se inhiba el crecimiento y la acción de NF- κ B.

A.2.1.2.- Genes de la familia bcl-2

De los genes implicados en la supervivencia celular de mamíferos, bcl-2 fue el primero que se descubrió y por ello da el nombre a la familia (39). La proteína Bcl-2 es capaz de inhibir la apoptosis en respuesta a estímulos específicos. La familia Bcl-2 contiene tanto miembros antiapoptóticos Bcl-2, Bcl-X_L, como proapoptóticos: Bax, Bak, Bad, Bik. Se encuentran localizados en la membrana externa mitocondrial, retículo endoplásmico y membrana nuclear (40). Una de las características más importantes de la familia Bcl-2 es su capacidad para convertirse en proteínas integrales de membrana.

La familia Bcl-2 contiene cuatro dominios de homología (BH) llamados BH1, BH2, BH3 y BH4, los cuales corresponden a segmentos de α -hélice (41-43). Según estos criterios la familia se divide en tres subfamilias:

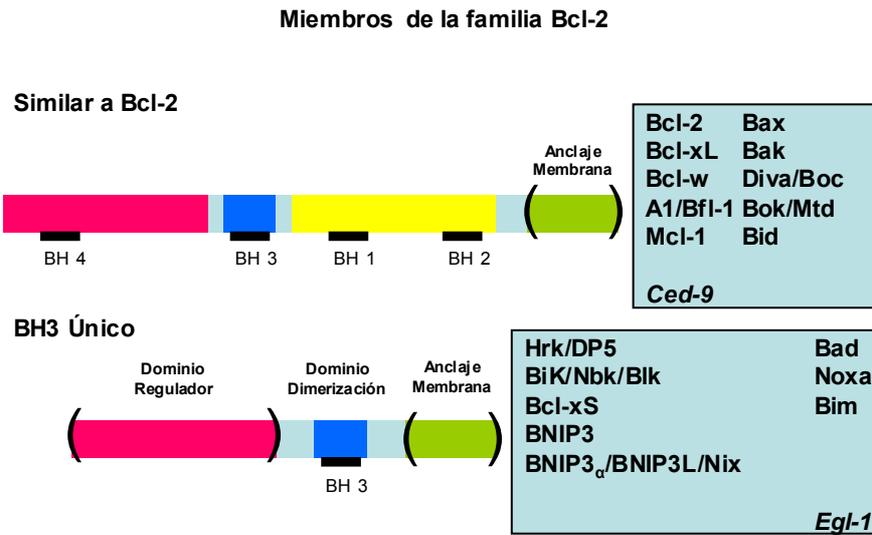


Figura A.5.- Esquema sobre los dominios de homología BH en la familia Bcl-2.

- (a) Subfamilia Bcl-2, compuesta por los miembros antiapoptóticos, poseen los cuatro dominios de homología. Ejemplos son: Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w.
- (b) Subfamilia de Bax, compuesta por miembros proapoptóticos, suelen tener homología en el dominio BH-1,2 y 3 pero no en el BH4. Ejemplos son Bax y Bak.
- (c) Subfamilia con dominio único-BH3, todos son proapoptóticos y sólo presentan homología BH3, como es el caso de Bid y Bik.

El dominio BH3, tiene carácter anfipático y es un dominio “crítico de muerte” que se encuentra presente en todos los miembros proapoptóticos. y parece ser esencial para la heterodimerización de los miembros de la familia (42,43), la heterodimerización está mediada por la inserción de este dominio BH3 dentro del bolsillo hidrofóbico compuesto por los dominios BH1,BH2, BH3 de las proteínas antiapoptóticas (44). Algunos de los miembros proapoptóticos tienen este dominio escondido y la activación por un estímulo apoptótico supone un cambio conformacional que exponga al exterior este dominio BH3, esto se ha visto que ocurre con Bax y Bak (45,46). Dado que tanto los miembros proapoptóticos como

antiapoptóticos poseen dominio BH3 y sabiéndose que éste es esencial para la actividad proapoptótica (46), debe haber alguna secuencia diferente y crítica dentro de este dominio. Muchos de los componentes poseen un dominio carboxiterminal hidrofóbico, esencial para integrarse en la membrana (47).

Los miembros de la familia Bcl-2 interactúan de una forma dinámica para regular la apoptosis. Los miembros proapoptóticos como Bax pueden heterodimerizar con los antiapoptóticos como Bcl-2 y bloquear su acción antiapoptótica. Por tanto la relación en los niveles de expresión entre antiapoptóticos/proapoptóticos determina si la célula va a sufrir apoptosis o no tras un estímulo apoptótico. Cuando Bcl-2 está en exceso, las células están protegidas de la muerte celular, sin embargo cuando Bax está en exceso la célula está avocada a entrar en apoptosis. Bax también tiene la habilidad de heterodimerizar con Bcl-X_L, por lo cual un balance entre los dos también es necesario para la inducción o represión del estímulo apoptótico.

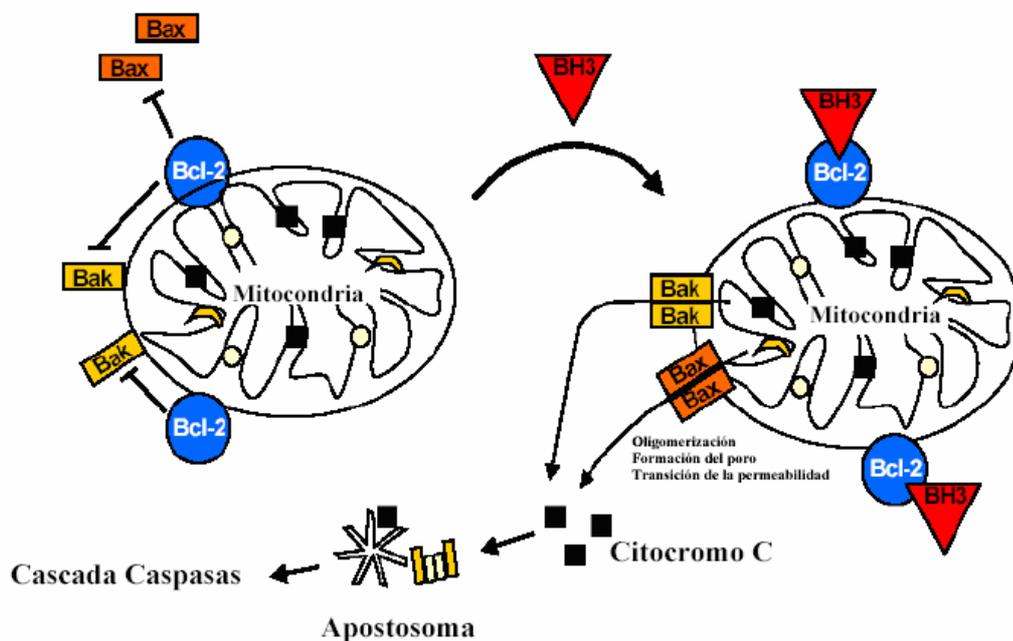


Figura A.6.- Regulación de la apoptosis por la familia Bcl-2

Los miembros de la familia Bcl-2 parecen tener localizaciones subcelulares diferentes ya que mientras que los miembros antiapoptóticos suelen estar como

proteínas integrales en las membranas del núcleo, del retículo endoplásmico y fundamentalmente de la mitocondria, los proapoptóticos se encuentran en el citosol o asociados con el citoesqueleto (48,49). Una vez que llega la señal apoptótica los miembros proapoptóticos sufren un cambio conformacional que les permite integrarse también en la membrana, especialmente en la membrana mitocondrial externa, produciéndose una traslocación subcelular. Esto se ha podido comprobar incluso con Bim, el cual sólo posee un dominio BH3 (49). Una vez que llegan a la mitocondria interactúan con los miembros antiapoptóticos, de modo que las moléculas antiapoptóticas serían “los guardianes de la puerta mitocondrial” y los pro-apoptóticos después de una señal apoptótica lograrían entrar al interior de la mitocondria.

Otro nivel de regulación de la familia Bcl-2, a parte de la homo/heterodimerización, es por fosforilación, por ejemplo, la fosforilación de Bad la inactiva y solo al quedar desfosforilada es capaz de unirse a Bcl-2 y Bcl-X_L, por tanto la fosforilación regula la exposición al exterior del dominio BH3 de Bad. También Bcl-2 puede ser fosforilada *in vivo* y cambios en el estado de fosforilación afecta a su actividad antiapoptótica.

A.2.1.2.1.- Niveles de actuación de Bcl-2

Los miembros de la familia Bcl-2 regulan la liberación de moléculas inductoras de apoptosis presentes en el espacio intermembrana a través de membrana externa, (50), pero esta no es su única acción ya que pueden actuar a distintos niveles:

1.- Nivel mitocondrial.

El modo de actuación de las proteínas de la familia Bcl-2 a nivel mitocondrial se basa en que estas proteínas son capaces de producir la liberación de factores proapoptóticos presentes en el espacio intermembrana mitocondrial. Para explicar esto han surgido varios modelos:

- a. Una de las teorías más importantes acerca de cómo se produce la disrupción del potencial de membrana es el de la formación de poros permeables de transición (PTP), los cuales forman puntos de contacto

entre membrana mitocondrial externa e interna (51,52). Los PTP son canales de conductancia larga que dejan pasar moléculas de peso molecular menor o igual a 1500 D. Este poro está constituido por proteínas de membrana interna tales como translocador de nucleótidos de adenina (ANT) y canales aniónicos voltaje-dependientes en membrana externa (VDAC), además otro componente fundamental son las porinas (en la membrana interna). Estos son necesarios para el libre intercambio de sustratos de la cadena respiratoria, por ejemplo ANT produce el intercambio entre ADP por ATP

Cuando los PTP se abren se produce la disipación del potencial de membrana y finalmente pueden producir la ruptura por hinchamiento de la membrana mitocondrial externa, dejando salir las moléculas proapoptóticas del espacio intermembrana.

Se ha comprobado que Bcl-2 puede mantener los poros cerrados y que Bax puede abrirlos, de hecho Bax interacciona directamente con el poro (53). Pero a su vez la liberación del citocromo c puede ocurrir incluso sin pérdida del potencial de membrana, por lo cual esta vía podría ser una especie de retroamplificación para la apoptosis.

- b. Otro modelo para explicar la liberación de proteínas desde la mitocondria se basa en la teoría de que estas pueden formar canales en la membrana externa mitocondrial, o bien que puedan regular canales existentes en la membrana alterando su conductancia (54-56). Así, se ha comprobado que Bcl-X_L, Bcl-2 y Bax pueden formar canales en membranas sintéticas. A su vez, tienen gran tendencia a formar homodímeros y heterodímeros, lo cual facilita la formación de canales con características distintas. Por ejemplo Bax junto con Bak son capaces de formar canales tetraméricos a través de los cuales el citocromo c puede salir (57). De esta forma se produce la alteración del potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) (58) o bien se forman canales “selectivos” para determinadas sustancias como el citocromo c, AIF (factor inductor de apoptosis) y Smac/diablo los cuales son moléculas proapoptóticas, sin que sea necesario que se produzcan grandes cambios en el potencial de membrana.

(2) A nivel de las caspasas.

Bcl-X_L puede interaccionar indirectamente con caspasa-8 y directamente con Apaf-1 o Apaf-1/caspasa-9, esta unión puede romperse por la unión de Bax a Bcl-X_L (59). Basándose en esto se propone que Bcl-X_L secuestra a estas caspasas para evitar su activación.

(3) A nivel de las membranas del retículo endoplásmico y del núcleo.

En las membranas del retículo endoplásmico y por tanto de la envoltura externa del núcleo se encuentran localizados en abundante cantidad, Bcl-2 y Bcl-X_L, donde ejercen su acción antiapoptótica, ya que pueden heterodimerizar con miembros proapoptóticos o también secuestrar caspasas, como la caspasa-8, a la que se unen mediante una proteína asociada a membrana del retículo denominada P28Bap31 (60).

(4) Otros niveles

Bcl-2 afecta a la translocación de P53 al núcleo, y también del factor NF-AT. Además tiene la habilidad de reducir la entrada de Ca²⁺ al núcleo.

A.2.1.3.- Receptores de la muerte celular

El descubrimiento de determinados anticuerpos que inducen la muerte de células tumorales llevó a la identificación de receptores en la superficie celular responsables de esos efectos (61). Estos receptores pertenecen a la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR) tales como: Fas (CD95), TNF-R1 y de receptores de muerte tales como DR-4 y DR-5 (62). La unión de estos a sus ligandos provoca la agregación del receptor y el reclutamiento de un gran complejo de proteínas adaptadoras, que mediante la interacción proteína-proteína van a transmitir la señal de muerte hasta las moléculas efectoras.

A.2.1.3.1.- Receptor Fas (CD95)

Cuando se produce la unión Fas/Fas-L, da lugar a la trimerización del receptor (63). Este último tiene en su dominio citoplasmático una región, homóloga a otros receptores capaces de provocar apoptosis, de unos ochenta aminoácidos y muy rica en aminoácidos cargados con los que puede interaccionar con señales proapoptóticas. A este dominio encargado de transducir la señal, se le denomina dominio de muerte (DD). Como ya se ha dicho, la activación de este receptor provoca el reclutamiento y unión de otras moléculas adaptadoras como son FADD y RIP (63,64).

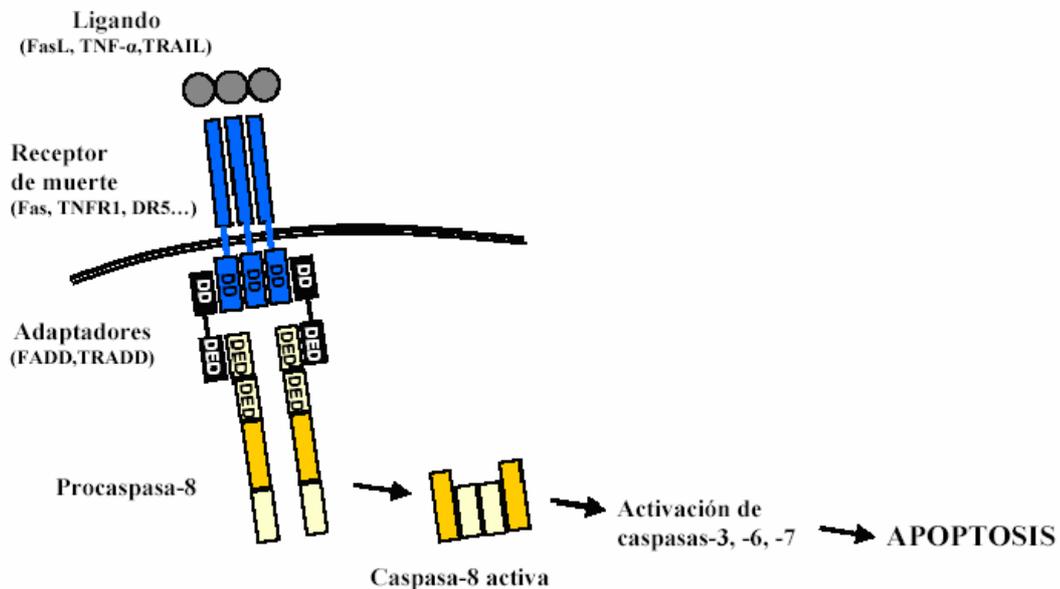


Figura A.7.-Activación de caspasas por medio de receptores de muerte

FADD (Proteína con dominio de muerte asociado a Fas) contiene dos dominios importantes, que son el dominio DD, con el cual interacciona Fas, y el dominio DED (dominio efector de muerte), que es el encargado de transmitir la señal apoptótica a los efectores, es decir a las caspasas, por ejemplo con caspasa 8, ya que tiene también un dominio DED.

RIP (Proteína de interacción con receptor), es una proteína Ser/Thr quinasa. Tiene dos formas de actuación dependiendo de que su unión sea a Fas o a TNF. En el

caso de unirse a Fas, lo hace también por su dominio DD al DD de Fas. En este momento está en condiciones de interactuar con RAIDD (proteína homóloga asociada a RIP con dominio de muerte), el cual también tiene dominio DD y otro dominio homólogo a caspasa-2.

La apoptosis inducida por Fas puede inhibirse por la expresión de una serie de moléculas intracelulares como son FLIPs (Proteínas inhibidoras de FLICE-caspasa8) e IAPs (Proteínas inhibidoras de apoptosis). FLIP tiene un dominio DED con el que puede unirse a FADD y que no interactúa con caspasa-8. IAPs puede inhibir enzimáticamente a determinadas caspasas y mediar en la activación de determinadas señales antiapoptóticas como la del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B), que a activar la transcripción de los genes de supervivencia.

Dentro de esta activación existen dos mecanismos muy importantes, que dependen del tipo celular (63-65). Así algunos autores diferencian dos tipos de células:

Tipo I, células en las que la expresión de caspasa-8 sería bastante abundante y podrían activar directamente a caspasa-3, aunque también a caspasa-6 y 7 a través de las cascadas de las caspasas. Esto llevaría a la ejecución de la apoptosis al producirse condensación de la cromatina, fragmentación del DNA, etc. Este tipo de inducción no requiere de la mitocondria y por tanto no está inhibida por factores como Bcl-2 o Bcl-X_L, ya que no requiere amplificación de la señal por factores pro-apoptóticos derivados de la mitocondria.

Tipo II, en este tipo de células no hay una abundante expresión de caspasa-8 y esta por tanto no puede activar eficientemente a caspasa-3, ni a otras caspasas que se encuentran corriente abajo en la cascada de caspasas. En estas células la activación de caspasa-8 provoca la activación proteolítica de un miembro de la familia Bcl-2, como es Bid. Esta activación provoca la traslocación de Bid a la mitocondria, donde va a interactuar con moléculas antiapoptóticas que se encuentran como componentes de la membrana mitocondrial.

A.2.1.3.2- Receptor TNF-R1

Respecto a TNF y su receptor TNF-R1, su acción es igual a la de la unión Fas/Fas-L. También tienen un dominio intracelular DD, pero las moléculas que se unen a él son distintas. Por un lado, se pueden unir a FADD, pero a través de una molécula denominada TRADD (Dominio de muerte asociado a TNF-R1 (65). Éste receptor no tiene dominio DED, por lo que ha de asociarse a FAAD, que sí lo tiene, para poder activar a caspasa-8 y la ruta continua como la descrita anteriormente. Por otra parte, puede también interaccionar a través de TRADD con RIP y en este caso activaría a NF- $\kappa\beta$ y de esta manera, se opondría a la acción apoptótica del TNF. Además TNF-R1 puede activar dos tipos de esfingomielinasas, una de ellas, localizada en la membrana plasmática y denominada esfingomielinasa neutra, provocaría la acumulación de ceramida al romper el enlace fosfodiéster entre la fosfocolina y la ceramida (66) activando una serie MAP-quinasas que llevan a la activación de la ruta de las caspasas; la otra, llamada esfingomielinasa acídica endosomal, quedaría activada de forma indirecta por TNF-R1 al activar este a la fosfolipasa C y el diacilglicerol resultante sería el que activara a este tipo de esfingomielinas.

A.2.1.4.- Citoquinas de supervivencia celular

Las citoquinas tienen diversos efectos pero uno de ellos es el de la supervivencia celular (67,68). Entre ellas cabe destacar al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el factor de crecimiento nervioso (NGF), interleuquina-3 (IL-3), el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1).

A.2.2.- Fase de compromiso

Dado que no existe ninguna molécula o conjunto de moléculas que sean estrictamente necesarias para que se produzca la muerte celular, las moléculas que cambian una vez que la célula ha tomado “la decisión” de muerte son difíciles de establecer, ya que como se ha dicho anteriormente, todo depende tanto del estímulo como del tipo celular.

A.2.2.1.- Papel de la mitocondria

La mitocondria es el punto donde convergen las distintas rutas apoptóticas, provenientes de distintos estímulos apoptóticos, y a partir de ese momento la célula “decide” si se produce o no la muerte programada, es decir a partir de aquí es un punto de no retorno. Aunque hay que destacar que no todas las rutas apoptóticas pasan por la mitocondria como es el caso de la apoptosis inducida por Fas.

Entre los candidatos más importantes que regulan esta fase están todos los factores apoptogénicos que se liberan de la mitocondria tales como:

- (a) Citocromo c que participa en la activación de caspasas a través de la formación del apoptosoma (cuya formación se analizará más adelante).
- (b) Procaspasas-2, -3 y-9 (47), las cuales pueden activarse una vez liberadas. Se ha descubierto que estas caspasas están nitrosiladas, pero su papel no está claro (69). Por el contrario hay investigadores que no han encontrado caspasas en la mitocondria (70).
- (c) Proteínas del choque térmico hsp10 y hsp60, las cuales facilitan la activación de caspasa-3. Sin embargo Hsp70, es un factor citoprotector, capaz de unirse y neutralizar la acción de AIF.
- (d) Factor inductor de apoptosis (AIF). Es una flavoproteína que al liberarse de la mitocondria se transloca al núcleo donde se ha demostrado que provoca la condensación y rotura de DNA en fragmentos de alto peso molecular (50KB). Además, a nivel de membrana activa a la flipasa e inhibe a la translocasa. Esto hace que los restos fosfatidilserina que en células normales se encuentran en la cara interna de la membrana se expongan ahora al exterior (71). El mecanismo de actuación no se conoce, pero se sabe que no tiene actividad nucleasa ni su actividad oxidoreductasa es necesaria para desencadenar la apoptosis. La actividad de AIF es inhibida por la sobreexpresión de bcl-2, pero no por los inhibidores de caspasas, es decir su acción es caspasa-independiente.

- (e) Smac/diablo (segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria/proteína de unión directa a IAP de bajo pI) es un inhibidor de las proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs) las cuales tienen la habilidad de inhibir a las caspasas activas; por tanto Smac/Diablo previene la inactivación de las caspasas. La unión de las IAPs a caspasas y a Smac/Diablo se produce en el mismo dominio, por tanto se produce una competencia de unión. Pero además parece tener otro mecanismo de inducción apoptótica ya que aunque se suprima el dominio de unión a IAP, Smac/Diablo sigue teniendo actividad proapoptótica (72).

- (f) Omi/HtrA2, es homóloga a HtrA en bacterias. Funciona también como inhibidor de IAPs, mediante la inactivación por corte, ya que se trata de una serinproteasa (73). Su acción sería redundante a Smac/diablo, aunque parece que tienen localización tisular distinta. La inducción que produce es tanto dependiente como independiente de caspasas (74).

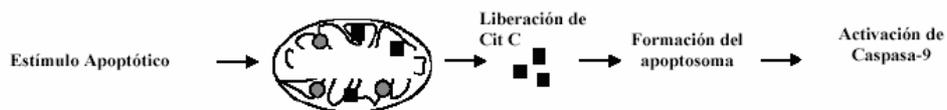
- (g) Endonucleasa G, se trasloca al núcleo tras la liberación y está involucrada en la fragmentación del DNA junto con exonucleasas y DNasa I, produciendo posiblemente el patrón en escalera típico de apoptosis (75). Esta acción al igual que AIF es caspasa-independiente.

Es importante señalar el porqué la célula utiliza tantas proteínas mitocondriales como factores apoptóticos, el hecho de que estén confinados en la mitocondria y que sus sustratos estén en el citoplasma supone una garantía de que sólo van a ejercer su acción mortal si son liberados durante el proceso apoptótico. Además tiene también la ventaja de que dentro de la mitocondria ejercen otra función: el citocromo c participa en la cadena de transporte electrónico entre los complejos III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial; AIF al tener un dominio con actividad oxidoreductasa protege a la célula del estrés oxidativo; Omi/HtrA2 funciona como chaperona.

A.2.2.2.- Papel del citocromo.c: formación del apoptosoma

Una vez liberado de la mitocondria, el citocromo c activa a las caspasas, pero esta activación es muy compleja, ya que depende de la unión del citocromo c, Apaf-1, caspasas-9 y dATP, formando un complejo conocido como apoptosoma (76).

A. Ruta de activación de caspasas en la mitocondria.



B. Formación y activación del apoptosoma.

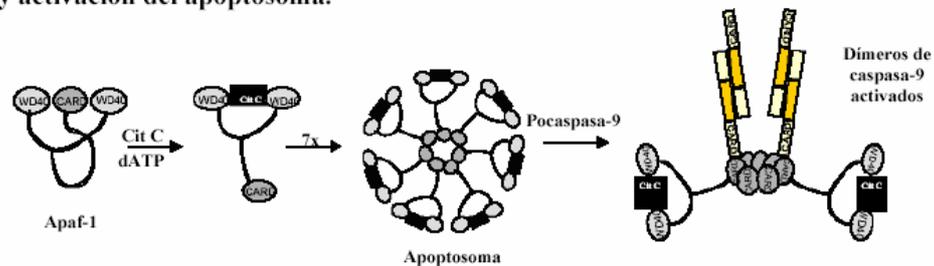


Figura A.8.- Activación de caspasas por la ruta mitocondrial mediante la formación del apoptosoma.

La unión del nucleótido a Apaf-1 es crucial para la formación del apoptosoma y está estimulado por el citocromo c el cual se une a Apaf-1 en su extremo C-terminal (dominio WD-40). Hay que destacar que la unión de dATP, no implica la hidrólisis de este ya que en el apoptosoma maduro no se encuentra dADP (77).

Una vez que se ha unido el citocromo c al dominio C-terminal de Apaf-1 esta sufre un cambio conformacional desde una forma rígida a una forma flexible, de manera que se facilita la unión del ATP a sus dominios de unión a nucleótidos. Esto lleva a la formación de un complejo formado por siete moléculas de Apaf-1 interaccionando por los extremos N-terminal. El apoptosoma une a caspasa-9 en su zona central por interacción de dominios CARD (dominios de reclutamiento de caspasas). Esta unión provoca un cambio conformacional en caspasa-9 que convierte al apoptosoma en una forma activa, capaz de activar en ese momento a caspasa-3 y a caspasa-7 (78).

A.2.3.- Fase de ejecución

Esta fase representa el momento en el cual todos los cambios morfológicos se hacen evidentes. Los mediadores de esta fase son las caspasas (79, 80).

A.2.3.1.- Caspasas

Las caspasas son proteasas que únicamente cortan después de un residuo de aspártico, y tienen un sitio activo muy conservado QACxG (79,80). En mamíferos se conocen 14 tipos de caspasas, que se pueden dividir entre caspasas iniciadoras y caspasas efectoras. Las iniciadoras son por tanto las primeras en activarse y estas activarían a las efectoras. Las caspasas actúan en cascada y como substrato final tienen a proteínas que van a producir los cambios morfológicos de la muerte celular (81). Entre las más importantes están la caspasa-9, como caspasa iniciadora y la caspasa-3 como efectora, ambas son críticas para la PCD en numerosas células.

Las caspasas se sintetizan como zimógenos y necesitan de una activación proteolítica. La estructura tridimensional de las caspasas nos indican su función y los mecanismos de activación: Constan de un pre-dominio N-terminal, una subunidad larga (17-21 KDa) y otra pequeña (10-13 KDa), que a veces están unidas por un pequeño conector. La activación supone un corte entre la subunidad larga y la pequeña y la eliminación del pre-dominio, lo cual da como resultado una enzima activa heterodimérica. Estos heterodímeros se asocian para formar tetrámeros como en el caso de la caspasa-3 (82,83).

El pre-dominio juega un papel fundamental en la activación, además según el pre-dominio se clasifican en dos grupos como se ha dicho anteriormente. Caspasas efectoras las cuales no tienen pre-dominio o bien lo tienen muy corto como caspasa-3, caspasa-6, caspasa-7, caspasa-14 y caspasas iniciadoras las cuales poseen un pre-dominio largo como caspasa-1, caspasa-2, caspasa-4, caspasa-5, caspasa-8, caspasa-9, caspasa-10, caspasa-12 y caspasa-13. Mediante este dominio se produce la unión de las procaspasas a los receptores de muerte para el ensamblaje de complejos activadores de

caspasas, por tanto, este dominio regula su actividad y además sirve para la homodimerización.

Dentro del pre-dominio se encuentran dos únicos dominios de interacción proteína-proteína que son el dominio DED (dominio efector de muerte) unidos mediante asociaciones hidrofóbicas y CARD (dominio de reclutamiento de caspasas) unidos mediante interacciones electroestáticas (84). Estos dominios necesitan de moléculas adaptadoras de unión.

Como molécula adaptadora para los dominios DED de caspasa-8 y caspasa-10 está FADD (dominio de muerte asociado a Fas). FADD además de un dominio DED para caspasas tiene un dominio DD (dominio de muerte) para anclar el complejo a los complejos activados de receptores de membrana de Fas, TNF-R1, DR3 y DR5.

Para los dominios CARD de caspasa-1, caspasa-2 y caspasa-9 las moléculas adaptadoras son las llamadas “moléculas adaptadoras que contienen CARD” como CARDIAK, RAIDD y Apaf-1 respectivamente. Estas moléculas pueden tener también dominios DD como es el caso de RAIDD que media entre caspasa-2 y el dominio DD de RIP, el cual se une directamente con Fas o TNF-R1.

Una vez que llega la señal apoptótica se activan muchas caspasas mediante una cascada de activación secuencial de caspasas, lo cual sirve para amplificar la señal apoptótica y puede ser regulada a varios niveles. Los mecanismos de activación pueden ser transactivaciones, por cortes proteolíticos por parte de otras caspasas o por autoactivación.

La transactivación por parte de las caspasas se produce de una forma secuencial y son las caspasas iniciadoras las que cortan y activan a las caspasas efectoras que han perdido el pre-dominio. Estas amplifican la señal y ejecutan la muerte celular cortando proteínas reguladoras y estructurales lo que conlleva el colapso de la célula. Así caspasa-8, caspasa-9 y caspasa-10 activan a caspasa-3 y caspasa-7; caspasa-3 puede activar a caspasa-9 con lo que se produce un bucle de amplificación (85,86).

Existen aparte de las caspasas otras moléculas capaces de transactivarlas como es la granzima B, la cual es una serin proteasa que puede activar a caspasa-3 directamente.

La autoactivación se produce principalmente por agregación, lo que puede producirse tanto en el citosol como en la membrana y es evidente que el pre-dominio es necesario para esta agregación y autoactivación (87). Los principales ejemplos a nivel de membrana ocurren con la activación de caspasa-8 y en el citoplasma la activación de caspasa-9 en la formación del apoptosoma tal y como se ha explicado anteriormente.

A.2.3.1.1- Acciones de las caspasas

Por último hay que analizar los sustratos de las caspasas, sobre los que tienen dos efectos activación o inactivación. Dado que el papel de las caspasas se desarrolla en la apoptosis desencadenando los principales cambios morfológicos, no es difícil pensar que muchas de las proteínas que regulan la apoptosis son sustratos de las caspasas (88-91). Entre sus acciones hay que destacar:

- Inactivación de proteínas del citoesqueleto: laminina, actina, gelsolina, vimentina etc.
- Sobre las proteínas asociadas a DNA como PARP (Poli ADP-ribosa polimerasa), ICAD y DFF etc.
- Activación por proteólisis de Bid, que activado por caspasa-8, se transloca a la mitocondria para cooperar con Bax y Bak provocando la liberación de moléculas apoptóticas mitocondriales.
- Caspasa-3 es capaz de cortar a Bcl-2, quitando su dominio intermembrana y dejando siempre expuesto su dominio BH3, lo que la convierte en una molécula proapoptótica al igual que Bax .
- Inactivación de NF-KB, lo que bloquea la transcripción de genes de supervivencia, mediante el corte en la zona de regulación de su inhibidor IκB y también por corte directo de P65.
- Estabilización de P53 por corte del inactivador de MDM2 (inhibidor de P53) lo que facilita la acción de P53.

- Inactivación de Rb con lo que E2F está activo.
- El corte de MEKK-1 (quinasa activada por mitogenos/ERKquinasa) provoca un cambio en su acción (principalmente es de supervivencia) ante respuestas de estrés, al ser cortada promueve la apoptosis.

A.2.3.1.2.- Inhibición de caspasas

La inhibición de caspasas puede darse de dos formas:

(a) Inactivación por interacción de proteínas.

- Los IAPs son inhibidores de la apoptosis liberados por la mitocondria y ejercen su acción inhibiendo a caspasas. Pueden hacerlo de dos maneras, por unión directa a la forma activa como ocurre con caspasa-3, caspasa-7 y caspasa-9, o por unión a la procaspasa-9, lo cual evita que se forme el apoptosoma. De esta forma impide que esta caspasa se pueda activar, y por lo tanto tampoco se active la caspasa-3 que es su sustrato inminente. De esta manera se inhibe tanto los estímulos proapoptóticos que van por vía mitocondrial (caspasa-9), como los que no van por esta vía (caspasa-3 y -7) (92-94).
- FLIP/FLICE, contiene un dominio DED y antagoniza la apoptosis mediada por receptor, ya que compite con caspasa-8 en la unión a FADD, con lo que se evita la cascada proteolítica de caspasas, aunque también puede inactivar directamente a caspasa-8 por heterodimerización (95).
- El inhibidor ARC, contiene un dominio CARD y también antagoniza la apoptosis mediada por receptor, ya que es capaz de unirse e inactivar a caspasa-2 y caspasa-8 (96).

(b) Inactivación por modificación proteica

- Mediante fosforilación, por ejemplo Akt, la cual es una quinasa de supervivencia y mediador de PI3K, puede fosforilar el centro activo de caspasa-9 inhibiendo su función (97).
- Mediante nitrosilación, el óxido nítrico forma complejo con las caspasas quedando estas S-nitrosiladas e inactivas, aunque es un proceso reversible (98).

(c) Otros:

- Bcl-2 y Bcl-X_L evitan la liberación del citocromo c y por tanto la consiguiente activación de caspasa-9 y -3.
- Bcl-X_L puede unirse a Apaf-1 impidiendo la asociación entre Apaf-1 y caspasa-9.

B.- LA CÉLULA MUSCULAR LISA

B.1.- La célula muscular lisa en las arterias

Las células de músculo liso (SMC) en animales adultos son células altamente especializadas cuya principal función es la contracción y la regulación del tono vascular, la presión sanguínea y el flujo sanguíneo. Las SMC proliferan en los vasos a un nivel extremadamente bajo y con una actividad sintética muy baja, expresan casi exclusivamente una gran cantidad de proteínas implicadas en la contracción, canales iónicos y moléculas de la transducción de señales de la contracción. Pero además las SMC guardan una cierta plasticidad que les permite cambios profundos y reversibles en su fenotipo en respuesta a estímulos de su entorno (99). Los factores precisos y los mecanismos que regulan estos cambios fenotípicos no son muy conocidos. Ejemplos de esta plasticidad se observan en el desarrollo embrionario de los vasos donde juegan un papel fundamental en el desarrollo de estos. En este estado muestran una gran proliferación, migración y producción de matriz extracelular como colágeno, elastina y proteoglicanos que son los principales componentes de los vasos, al mismo tiempo que van adquiriendo la capacidad de contracción. De forma similar cuando se produce un daño en la pared vascular, las SMC incrementan su proporción de proliferación, migración y capacidad de síntesis, necesario para reparar el vaso dañado.

La plasticidad como propiedad inherente de las SMC diferenciadas les proporciona una ventaja de supervivencia ya que pueden reparar los vasos, pero también puede tener malas consecuencias ya que un ambiente adverso puede llevar a un cambio fenotípico que permita el desarrollo de lesiones vasculares.

Existen otras hipótesis distintas a la idea de que la reparación en los vasos se lleva a cabo por un cambio fenotípico y reversible de las SMC preexistentes, tal y como hemos dicho. Estos mecanismos alternativos son que células circulantes derivadas de la médula ósea y progenitoras de las SMC se encargan de reparar el vaso dañado (100-102). El segundo mecanismo se basa en que la población de las SMC dentro del vaso es heterogénea, con una población estable de SMC que son fenotípicamente distintas a las SMC contráctiles normales (103,104), es decir mostrarían un fenotipo sintético, y éstas

serían las encargadas de la reparación, pero no existen evidencias de que los fenotipos encontrados sean linajes estables (105). Por tanto es irrefutable que las SMC normales preexistentes, por un cambio fenotípico, reparan las lesiones y las otras dos formas expuestas pueden ser complementarias y estar limitadas a determinadas circunstancias (105).

En este sentido el cambio fenotípico, entendido como cualquier cambio en la estructura o función normal de las SMC diferenciadas, tiene un papel muy importante en la mayoría de las enfermedades vasculares como aterosclerosis, cáncer e hipertensión. En la aterosclerosis es donde se producen los cambios en las SMC más intensos. Otros trastornos asociados a disfunciones de las SMC son el asma y numerosos trastornos digestivos y reproductivos (105).

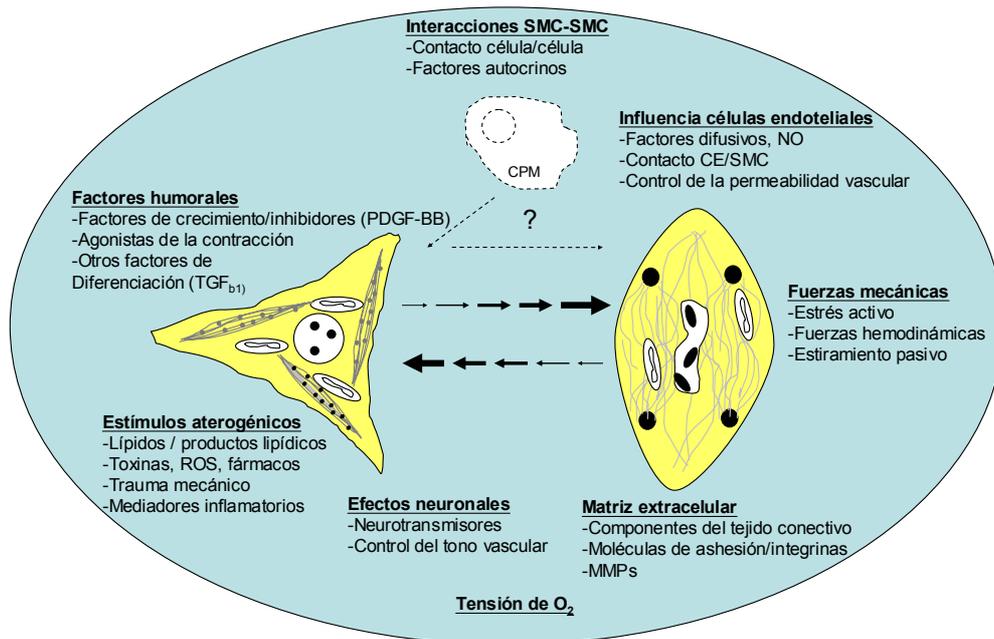


Figura B.1.- Representación del estado de diferenciación de las SMC dependiendo de la integración de múltiples factores locales

B.2.- Mecanismos moleculares que originan la diferenciación de las SMCs

El origen embrionario de las SMCs es diverso, procediendo (según su localización) de distintas líneas celulares precursoras. Este dato contrasta con el origen de las otras células musculares (esqueléticas y cardíacas), que derivan del mesodermo. Se han realizado pocos estudios sobre el patrón de expresión de los genes específicos de SMC durante la embriogénesis, por lo que los mecanismos moleculares que originan la diferenciación de las SMC no están aún bien conocidos.

El primer paso para conocer la diferenciación celular de las SMC es identificar qué genes son específicos de la función diferenciada. Durante el desarrollo embrionario y el desarrollo postnatal las SMC presentan una proporción de proliferación muy alto, pero al mismo tiempo se están induciendo gran cantidad de genes marcadores de la diferenciación (106). Sin embargo en la aterosclerosis las SMC muestran bajos niveles de proliferación y fenotípicamente están moduladas, evidenciado por la pérdida o la expresión reducida de estos genes marcadores de SMC (107,108). Así en las SMC se han identificado una variedad de genes que sirven para marcar en qué estado de diferenciación se encuentran. Entre estos se incluyen los que codifican para las proteínas del aparato de contracción de la célula muscular lisa: SM α -actina, SM-MHC, h₁-calpaina, SM22 α , proteína aortica similar a carboxipeptidasas (ACLP), desmina, h-caldesmon, metavinculina, telokina, smootelina (109). En los últimos años se han hecho grandes progresos para conocer los mecanismos que contribuyen a la regulación transcripcional de estos genes marcadores de SMC y del estudio de rutas que suprimen la expresión de estos genes, ya que estas rutas están implicadas en la modulación fenotípica de las SMC en respuesta a un daño vascular o aterosclerosis.

Es muy interesante el hecho de que todos los marcadores SMC encontrados hasta la fecha poseen uno o más elementos CArG (motivos del tipo CC(AT)₆GG) en la región promotora y/o intrones (110-114). Por ejemplo el gen de la SM α -actina la mutación de cualquiera de estas 4pb del elemento CArG impide la expresión de actina, de forma similar ocurre con SM MHC, SM22 α y desmina. El gen SM-MHC posee tres elementos CArG y la mutación de cada uno de ellos tiene efectos distintos. Así la mutación de CArG1 (el más próximo a la región 5') impide la expresión totalmente, mientras que la mutación dentro del intrón impide la expresión en arterias largas y las

coronarias, pero no afecta en arterias musculares, pulmonares y gastrointestinales. Esto implica que dependiendo del subtipo de SMC emplean regiones modulares distintas para la expresión de genes. Este esquema de regulación está en consonancia con el alto grado de plasticidad de las SMC, y debe ser el resultado, al menos en parte, de la activación selectiva de estas regiones promotoras, provocada por elementos que responden a las condiciones ambientales a las que están expuestas las SMC (105).

El factor de transcripción SRF (factor de respuesta a suero) se une a estos motivos CArG, los cuales fueron identificados por primera vez en el gen c-fos y se denominaron elementos de respuesta a suero (SRE o caja CArG). El factor SRF se une como dímero a través del denominado dominio de caja MADS, y como hemos dicho, regula genes de respuesta al crecimiento como c-fos y genes marcadores de SMC, además de genes específicos de músculo esquelético y cardíaco (114).

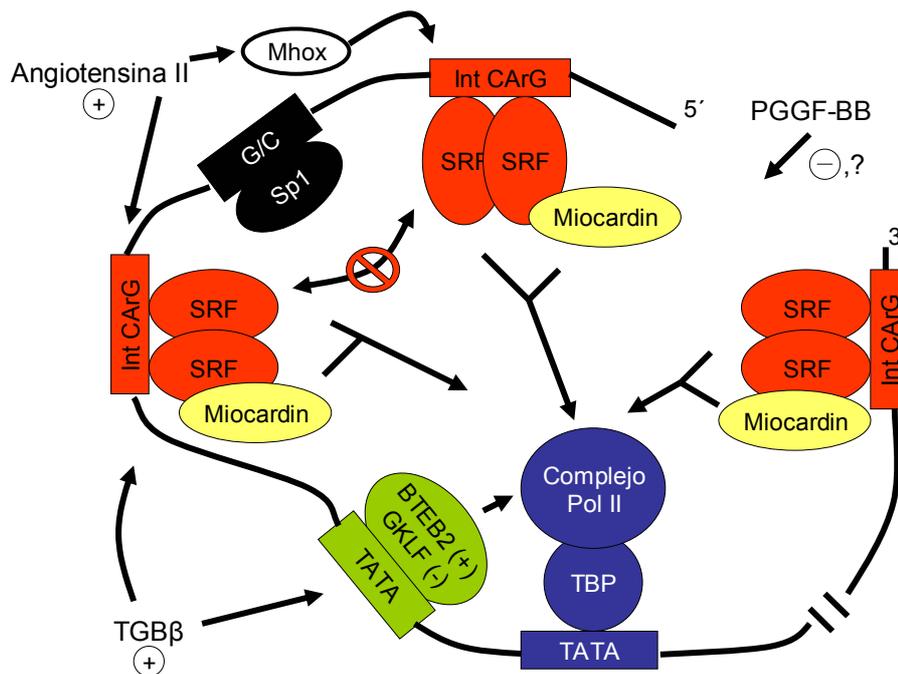


Figura B.2.- Esquema sobre los factores de transcripción que participan en la expresión de genes específicos de las SMC.

Lo que determina la acción específica de este factor de transcripción en la regulación de genes SMC (105) se ha descrito que puede deberse a:

- a. La expresión del factor de transcripción SRF en las SMC es mayor que en cualquier otro tipo celular, aunque parece que este no es el factor limitante y como tantos otros factores de transcripción lo que determina su especificidad es la diferente habilidad con la que se une a su secuencia reguladora en los elementos ACrG (115). En este sentido se ha visto que la afinidad con la que SRF se une a ACrG de genes SMC es baja comparado con la que se une a la caja CArG de los genes de crecimiento (c-fos, egr-1), de forma que éste podría ser un mecanismo de regulación para que sólo las células que expresan altos niveles de SRF puedan activar los genes SMC, o bien las células que tengan mecanismos para potenciar la afinidad de SRF por CArG (116).

Según esto, las SMC poseerían mecanismos para regular la afinidad de SRF. De hecho las SMC poseen una proteína de homodominio Mhox que aumenta muchísimo la capacidad de SRF para unirse a CArG de α -actina. Así, factores como la angiotensina II produce un aumento de actina mediado por la sobreexpresión de Mhox y otras proteínas de homodominio como Nkx tendrían el mismo efecto.

- b. Los genes SMC poseen más de un dominio CArG, éstos cooperan entre sí y además no son intercambiables. Por ejemplo los dos elementos CArG de α -actina están separados por 40 pb en todas las especies, dado que una vuelta de DNA tiene 10pb quiere decir que estos elementos están en fase, y además ha de ser así porque la pérdida de fase por inserción de pb hace que pierdan la actividad (105).
- c. Las modificaciones postranscripcionales también influyen en la actividad de SRF, entre ellas están: ajuste alternativo, la fosforilación que puede alterar la afinidad de unión a DNA y a cofactores y rhoA/rho quinasas (ROK) que provocan la translocación al núcleo y la activación de SRF. Se ha demostrado que la sobreexpresión de RhoA estimula la activación de muchos genes SMC (117), mientras que inhibidores de ésta disminuyen la expresión de estos genes.
- d. La presencia de coactivadores específicos en las SMC como las proteínas con homodominio Bark1 y Nkx3.2, las cuales forman un complejo estable con SRF

y con GATA6 para la unión a CArG activan genes SMC, pero no genes c-fos (118), además esta triada sólo se expresa en las SMC. Esto implica que los genes SMC sean regulados independientemente de genes que controlan el crecimiento celular en las SMC.

Otro coactivador de SRF descubierto en los últimos tiempos es la proteína miocardin que se expresa selectivamente en músculo cardíaco y en las SMC diferenciadas (119,120). Esta proteína presenta un motivo de cremallera de leucinas que sirve de puente entre regiones CArG, la sobreexpresión de esta en fibroblastos es suficiente para que se expresen todos los genes del linaje de las SMC.

Aunque las rutas SRF-ACrG son críticas para la expresión de genes SMC, no son las únicas, así otra región denominada TCE (elemento de control para TGF- β) es necesaria y es particularmente importante que TGF- β esté implicado en el daño vascular y en la aterosclerosis. TGF- β incrementa la expresión de la mayoría de genes marcadores de SMC (121), además es un activador de SRF, ya que aumenta su afinidad de unión a regiones CArG y por ejemplo para la correcta inducción de SM α -actina por TGF- β se requieren también los elementos CArG. Otros dominios importantes son la caja-E (motivos CANNTG) y represor de elementos G/C, los cuales están muy próximos a motivos CArG (122).

En definitiva el estado de diferenciación de las SMC depende de la integración de múltiples señales que determinan el patrón de expresión de los genes para situaciones concretas. Esto es crítico para las SMC ya que como se ha dicho anteriormente, ellas tienen que conservar una gran plasticidad inherente a las SMC diferenciadas.

B.3.- Modulación fenotípica de las SMC y su implicación en las patologías vasculares

La principal enfermedad en la que el cambio fenotípico juega un papel fundamental es en la aterosclerosis. Esta enfermedad es responsable del 55% de las muertes en la civilización occidental. En su desarrollo están implicados un gran número de células como son macrófagos, linfocitos, neutrófilos, células endoteliales y SMC

(123). Incluso por evidencias recientes se han incluido células circulantes pluripotenciales derivadas de la medula ósea.

El origen de la enfermedad es multifactorial, pero se cree que las lesiones iniciales son debidas a turbulencias locales de la corriente sanguínea que fluye a alta presión u otras acciones mecánicas, que alteran o rompen la barrera estructural formada por las células endoteliales. Al ponerse en contacto las plaquetas con el tejido conectivo, se liberan sustancias que estimulan la proliferación de células musculares lisas. Generalmente, el proceso se invierte, con re-epitelización local, a no ser que se produzca la lesión repetidamente o que haya otros factores aterogénicos como la presencia de gran cantidad de LDL. En este caso, prolifera el músculo liso y aumenta el tejido conectivo (colágeno y elastina) y se depositan lípidos intra y extracelulares (ésteres de colesterol, triglicéridos y fosfolípidos).

La entrada de lipoproteínas así como su retención y modificación en la pared arterial y la penetración de linfocitos y monocitos en el espacio subendotelial hace que estos se transformen en las denominadas células espumosas tras cargarse de LDL modificadas a través del receptor de eliminación (scavenger). Las células espumosas son fenotipos terminales que acaban necrosándose y liberando su contenido lipídico al entorno. Casi simultáneamente, se produce la liberación de señales moleculares por los macrófagos y las células endoteliales, que provocan en las SMCs de la íntima una modulación hacia el fenotipo sintético (124), seguida de migración al espacio subendotelial, proliferación y síntesis de matriz extracelular. Las SMCs sintéticas, al igual que los macrófagos pueden expresar receptores para LDL modificadas, lo que provoca su transformación en células espumosas (123). Todos estos eventos provocan la aparición, sobre la pared arterial de una estructura conocida como estría lipídica, la cual puede evolucionar hacia la denominada placa ateromatosa. En la formación de la placa ateromatosa se incrementan el acumulo de lípidos, continúa la proliferación de SMCs y síntesis de matriz extracelular. Se produce una intensa respuesta inflamatoria (con adhesión de monocitos, linfocitos T y plaquetas) y en los estadios avanzados aparece un proceso necrótico en el endotelio y las capas de SMC (123). Además de la necrosis, se ha encontrado evidencias de muerte celular por apoptosis en el interior de las placas ateromatosas (125-127). Finalmente, producidas por la placa ateromatosa,

aparecen las consecuencias clínicas de la arteriosclerosis como hipertensión, hemorragia interna, isquemia, gangrena e infarto (de miocardio y cerebral).

En definitiva los cambios que se producen implican lo que se denomina *modulación fenotípica* de las SMC, término que fue originariamente usado por Chamley-Campbell hace unos 30 años (128,129, 105). Esto implica:

- Cambios en el estado proliferativo.
- Incremento en la producción de matriz extracelular (130,131).
- Producción de proteasas, fundamentalmente metaloproteinasas (132).
- Participación en una respuesta inflamatoria crónica, incluido síntesis de citoquinas inflamatorias y de algunos marcadores de inflamación (133,134).
- Alteración de la contractilidad al estar alterada la expresión de proteínas contráctiles (135,136).

Los cambios fenotípicos asociados a la aterosclerosis proporcionan un gran ejemplo para comprender la modulación fenotípica de las SMC en otras muchas patologías. Al respecto hay que reconocer que hablar simplemente de dos estados de las SMC, contráctil y sintético, es simplificar mucho y además es inadecuado para explicar el amplio rango de fenotipos que pueden expresar las SMC bajo distintas circunstancias, en concreto respecto al proceso aterosclerótico el fenotipo de las SMC cambia dependiendo del estadio de la lesión y/o de la localización de estas SMC dentro de la lesión.

El papel de las SMC parece variar dependiendo del estado en el que se encuentra la lesión, de forma que juegan un papel negativo en el desarrollo de la lesión inicial, aterosclerosis temprana, y en la progresión (99,123), pero sin embargo juegan un papel beneficioso en la placa fibrosa, estabilizando la placa aterosclerótica, para que no se produzca la ruptura de esta (137).

Los factores ambientales son los determinantes de la modulación fenotípica, y además estos son muy importantes en la aterosclerosis, ya que algunos de ellos van a ser los responsables del reclutamiento inicial de SMC desde la media a la lesión en la

intima y otros se encargaran sin embargo de inhibir la apoptosis y las proteasas fundamentalmente de matriz extracelular en los estados finales. Entre estos factores podemos considerar los factores de crecimiento, citoquinas, células mediadoras de la inflamación, lípidos, lípidos oxidados, lípidos peroxidados, especies reactivas del oxígeno, óxido nítrico, entre otros (123,138, 139). De ellos entre los más estudiados está el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el cual ejerce su acción en los estadios iniciales provocando el reclutamiento, migración y proliferación de las SMC (140), en este sentido se ha visto que el PDGF es un gran modulador fenotípico de las SMC (141), ya que hace que disminuyan los marcadores selectivos de SMC. Otro factor es el TGF- β implicado en la rediferenciación de las SMC y por tanto en la estabilización de la placa aterosclerótica (142) y por último las metaloproteinasas (MMP) las cuales se van expresando con distinta especificidad según avanza la lesión ya que al principio son necesarias para la migración y la formación de la placa y en los estados finales pueden desencadenar la ruptura de esta.

B.4.- La célula muscular lisa en cultivo

Al igual que ocurre con los fibroblastos, las SMC en cultivo muestran una gran capacidad proliferativa y pueden ser subcultivadas varias veces, lo que permite una rápida obtención de masa celular. Además, la capa media de las arterias está compuesta casi exclusivamente por SMC, por lo que es relativamente fácil obtener cultivos de músculo liso vascular con una mínima contaminación de otros tipos celulares (128).

En los cultivos primarios, y según las características anteriormente señaladas, las células sufren un proceso de modulación de su fenotipo. En general, tras ser cultivadas, conservan el fenotipo contráctil durante unos pocos días (de 1 a 7), a continuación se produce una modulación hacia el fenotipo sintético, seguido de una intensa proliferación. Cuando el cultivo se acerca a la confluencia, disminuye la proliferación y se depositan grandes cantidades de matriz extracelular. Frecuentemente, una vez que el cultivo ha alcanzado la confluencia, modula de nuevo su fenotipo hacia el contráctil. De esta forma, el fenotipo contráctil únicamente se manifiesta en las etapas iniciales y finales (cuando alcanza la confluencia) del cultivo primario. Las capacidades de proliferación y síntesis de matriz extracelular, son exclusivas del fenotipo sintético

(128). Se ha descrito en numerosas ocasiones, que el fenotipo contráctil de la SMC cultivada, conserva su capacidad de contracción de forma espontánea o cuando se estimula eléctricamente (143).

Dependiendo de la especie y edad del animal del que procedan, los cultivos primarios de SMC vascular pueden subcultivarse entre 6 y 20 veces, hasta que el cultivo muere por un proceso de senescencia similar al descrito en los fibroblastos (144-146). Las SMC subcultivadas van perdiendo progresivamente la capacidad de modular su fenotipo, de forma que a partir del tercer o cuarto pase, la práctica totalidad de las células tiene el fenotipo sintético (inclusive en estado de confluencia). Posiblemente debido a la gran síntesis de matriz extracelular, los cultivos de SMC pueden crecer en varias capas cuando alcanzan la confluencia. Esta característica provoca un típico aspecto en la confluencia que se ha denominado de *colinas y valles*, las colinas contienen de 10 a 15 capas de células, mientras que los valles no contienen más de 3 capas celulares (128).

La composición de la matriz extracelular producida por la SMC en cultivo primario, es similar a la encontrada en el tejido conectivo de los vasos sanguíneos de los que proceden (principalmente colágeno I y II, elastina, proteoglicanos y glucosaminoglicanos), aunque se han descrito alteraciones en la composición relacionadas con la especie, las condiciones y el número de pases del cultivo (128).

Al igual que ocurre *in vivo*, durante la maduración postnatal de los vasos sanguíneos y durante la reparación de los mismos tras sufrir un daño físico, la síntesis de matriz extracelular de las SMC cultivadas se produce por el fenotipo sintético en estado de quiescencia, lo que se interpreta como un mecanismo de economía celular. Cuando la población celular se encuentra en una situación de crecimiento activo, la mayoría de los recursos se destinan a la proliferación y cuando ésta cesa, se activa la síntesis de matriz extracelular (147).

Se ha investigado la regulación de los genes que codifican proteínas responsables de la síntesis de matriz extracelular y se ha encontrado una relación inversa entre la expresión de dichos genes y ciertos protooncogenes presentes durante el estado de proliferación celular (148,149). Así, se ha demostrado que el patrón de

expresión del protooncogen b-myb (presente durante las fases G1 y S del ciclo celular) es opuesto al patrón de expresión de los dos genes ($\alpha 1$ y $\alpha 2$) del colágeno tipo I. El mecanismo de acción se basa en un efecto inhibitorio directo de la proteína b-Myb sobre los promotores de dichos genes, a través de secuencias denominadas MBS (*Myb-binding site*) que se encuentran en numerosos promotores regulados por los protooncogenes de la familia myb (150).

C.- APOPTOSIS EN LAS SMC

C.1.- Introducción

Las SMC dentro del vaso son capaces de proliferar, migrar, sintetizar/degradar matriz extracelular ante determinados estímulos. Sin embargo en un individuo adulto las arterias muestran unos índices de renovación muy bajos, con índices de proliferación y apoptosis muy bajos también (151). Bajo condiciones patológicas, determinados factores presentes en la vasculatura alteran el balance entre proliferación y apoptosis, así numerosos estímulos pueden producir apoptosis en las SMC, pero también es cierto que alteraciones específicas dentro de la célula provocan una sensibilización a estímulos específicos asociadas a situaciones patológicas. Por tanto a pesar de que la regulación de la apoptosis en la vasculatura es una combinación tanto de factores sistémicos como locales, la importancia de cualquier ruta apoptótica particular depende del tipo de célula y del estímulo que lo desencadena.

Las alteraciones que sufren las SMC relacionadas con la proliferación y la apoptosis son muy importantes en determinadas enfermedades, pero principalmente durante la aterosclerosis (152-154). Virchow en 1858 sugirió por primera vez que en la aterosclerosis se producía muerte celular (155). Él dijo que la placa aterosclerótica estaba formada por células que se dividen y después mueren, a este estado le llamó degeneración “*fibro-fatty*”. Posteriormente otros investigadores, estudiando lesiones ateroscleróticas inducidas por la dieta en animales de experimentación, identificaron mediante microscopía electrónica la muerte celular de la SMC en la aterosclerosis, la denominaron necrosis, aunque los cambios morfológicos a nivel nuclear y citoplásmico que presentaron estos investigadores correspondían a un proceso apoptótico. En 1995, varios laboratorios, publicaron la existencia de apoptosis en SMC, células endoteliales y macrófagos en las lesiones ateroscleróticas (156-161). También se han descrito fenómenos de apoptosis en estas células una vez aisladas de placas ateroscleróticas, o bien de células procedentes de una aterosclerosis experimental (161).

Las consecuencias de la apoptosis en las SMC dependen del estado y la localización en la placa aterosclerótica. El grado de muerte celular está fuertemente relacionado con el estado de desarrollo de la placa aterosclerótica. En general, los estados iniciales como la estría adaptativa inicial y la estría lipídica, muestran muy poca apoptosis, mientras que la lesión avanzada muestra evidentes localizaciones de muerte apoptótica. Sin embargo, existen evidencias de que en la aterosclerosis temprana hay apoptosis y que está positivamente ligada a la proliferación celular. En este sentido, en estudios *in vitro* se ha observado que las SMC proliferativas, tal y como ocurre en la aterosclerosis, muestran más apoptosis que aquellas que no son proliferativas, ya que las SMC tanto en humanos como en aterosclerosis experimentales muestran unos valores de replicación muy bajos (162), un leve incremento en el nivel de apoptosis de las SMC puede llevar a una disminución drástica del contenido en SMC del sistema vascular.

Se ha demostrado que las SMC derivadas de una placa aterosclerótica, pero no para las provenientes de la media, mueren cuando se cultivan. Esto hace pensar que están programadas para morir (160). El que a las células de la media no les ocurra lo mismo, y que incluso haya estudios en los que se muestra una cierta protección a la apoptosis de las SMC en la media (163) hace necesario la distinción de los procesos que ocurren en los distintos componentes de la lesión.

C.2.- Tipos de SMC en relación con la apoptosis en la aterosclerosis

Se han distinguido tres tipos celulares, que se corresponden con distintas localizaciones de la lesión aterosclerótica, basadas en la expresión de algunos genes apoptóticos y en el grado de apoptosis (164). Estas son:

1.- SMC tipo A

Están presentes en la media normal y en la estría adaptativa inicial. Esta última se define como la acumulación de SMC entre el endotelio y la media. Las SMC muestran un fenotipo contráctil. El citoplasma no contiene vacuolas de lípidos, pero si se observan numerosos microfilamentos. En la zona tampoco se encuentran

macrófagos infiltrados. Este tipo no se detectan Bax ni Bcl-2 ni caspasa-3. Tampoco muestran patrón de DNA en escalera (TUNEL negativas).

2.- SMC tipo B

Corresponden a las células que se encuentran en una estría lipídica, correspondiente a una aterosclerosis inicial. Se describe como una estría adaptativa inicial con depósitos de lípidos, los cuales se presentan en pequeñas vacuolas en el citoplasma. La población de macrófagos es muy inferior al 1%. Estas células mas tarde derivarán en lo que se conoce como células espumosas. Tanto unas como otras muestran una alta cantidad de Bax, mientras que Bcl-2 y caspasa-3 no son detectables y la prueba TUNEL es negativa. Esta sobreexpresión de Bax también se encuentra en SMC provenientes de placas en aterosclerosis experimentales (165,166). Es interesante destacar que esta sobreexpresión puede revertirse si se privan a las células de lípidos (167).

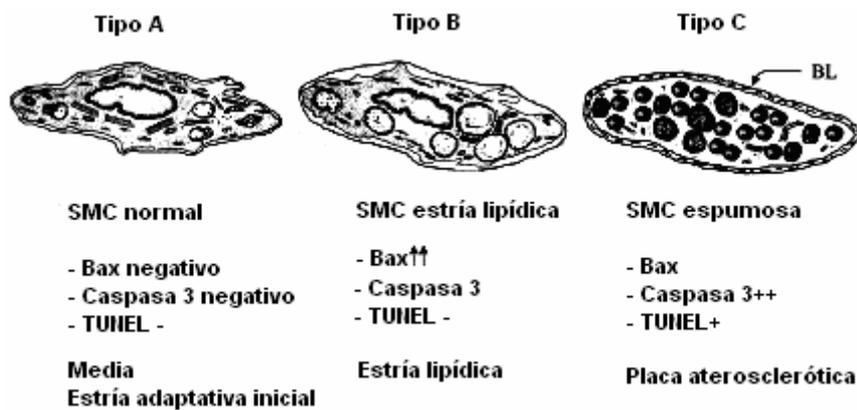


Figura C.1.- Tipos de SMC en relación con la apoptosis en la aterosclerosis

3.-SMC tipo C

Se corresponden con células que se encontrarían en una placa aterosclerótica avanzada y responden a una morfología de células espumosa (*foam cell*), este tipo de SMC presentan una muerte que responde a las características de la apoptosis (162). Estas regiones del vaso donde se encuentran se definen como núcleos necróticos. La región entre el núcleo y el endotelio se denomina capa fibrosa, tienen una alta infiltración de macrófagos que se han convertido en células espumosas por el acúmulo de lípidos en su interior.

El núcleo necrótico no muestra células lo cual sugiere que ha habido una muerte celular masiva, correspondiéndose con SMC que se han desintegrado en fragmentos citoplasmáticos. Estos fragmentos muestran una alta expresión de caspasa 3 y Bax. A su vez es posible la detección de fragmentación del DNA, dando TUNEL positivo.

C.3.- Regulación de la apoptosis en lesiones ateroscleróticas tempranas

Una vez que se produce el daño inicial en el endotelio, los monocitos se adhieren a la fibronectina vía integrinas (CD11/CD18). El desencadenamiento de la respuesta inflamatoria subsiguiente provoca también la acumulación de lípidos y la exposición a otras sustancias aterogénicas (168,169, 170). Uno de los cambios encontrados en las lesiones aterogénicas tempranas cuando la enfermedad es todavía reversible es la modulación de fenotipo contráctil a sintético de las células musculares lisas en la íntima arterial es. Estas células de fenotipo sintético, en cultivo se muestran desdiferenciadas, muy proliferativas y productoras de abundante matriz extracelular (124, 169, 170).

El hecho de que existe apoptosis en la placa aterosclerótica está bien demostrado, pero esto también ocurre en la aterosclerosis temprana, tal y como lo demuestran estudios realizados en aterosclerosis experimentales (161,171).

Entre los estímulos sistémicos que pueden inducir apoptosis hay una gran variedad de factores como son: las altas concentraciones de glucosa, el incremento del estrés oxidativo y las LDL oxidadas. En contraste existen factores protectores como el óxido nítrico (NO). El control de la apoptosis en las SMC *in vivo* reside en un complejo sistema de agentes pro y antiapoptóticos, gobernado por interacciones célula-célula, célula-matriz extracelular y células-citoquinas.

C.3.1.- Interacciones de SMC con otras células

Macrófagos y linfocitos T secretan citoquinas que pueden inducir apoptosis en las SMC, posiblemente a través de la producción de NO inducida por P53 y Fas. Pero el principal papel de estas citoquinas es preparar a la célula para la apoptosis y el contacto célula-célula es el principal efector apoptótico entre estas células y las SMC (172-174). Las SMC expresan Fas y los linfocitos T, macrófagos y células endoteliales expresan Fas ligando, por tanto la interacción célula-célula de las SMC con estas células provoca la apoptosis, y suele darse en zonas con gran infiltración de células inflamatorias.

Las SMC además expresan TNF-R y los macrófagos sintetizan TNF- α , por tanto la apoptosis vía TNF también se puede dar. Los linfocitos T además expresan granzima B, la cual puede matar vía granzima B/perforinas (que produce daños en la membrana). La acción de TNF- α produce directamente apoptosis pero también puede proteger de ella, la inducción a la apoptosis da como resultado final la degradación de Bcl-2 y la activación de caspasa-3. La protección está mediada por factor de transcripción NF-KB (175).

El nivel de expresión de Fas-L y TNF-R en las SMC normales es bajo, comparado con el nivel que expresan las células hematopoyéticas, de hecho la inducción única de Fas ligando provoca índices de apoptosis muy bajos. Incluso si se estimula por separado con TNF- α , IL-1B o INF- γ , pero la combinación de éstas sí induce apoptosis aunque a altas concentraciones. Es por esto que las SMC normales se dice que son resistentes a la apoptosis mediada por Fas (175).

Sin embargo, las SMC derivadas de placas ateroscleróticas aumentan la expresión de Fas en su membrana, porque las células están sensibilizadas mediante distintos estímulos como la combinación de citoquinas, que pueden sensibilizar a la apoptosis mediada por Fas en las SMC, ya que provocan una sobreexpresión de Fas en la membrana (176). Esto también ocurre con las oxLDL, las cuales impiden la degradación de Fas (177).

Este es un mecanismo común en el que se suman efectos de una forma sinérgica para promover la apoptosis. Además se ha visto que la estimulación con Fas en SMC produce apoptosis si previamente las células han sido tratadas con cicloheximida, la cual es un activador de p53. Como ya hemos dicho en el capítulo de introducción del proceso apoptótico, P53 sensibiliza a las células a la apoptosis y uno de sus mecanismos es aumentar la expresión de Fas e incrementar el movimiento de este hacia la membrana plasmática (175).

Dentro de la misma activación de Fas existen dos mecanismos muy importantes que dependen del tipo celular (63,64). Así, algunos autores diferencian dos tipos de células: Tipo I, células en las que la expresión de caspasa-8 sería bastante abundante y podría activar directamente a caspasa-3 y las de Tipo II, dentro de la cual estarían las SMC ya que su cinética de muerte inducida por Fas responde a este tipo. En este tipo de células no hay una abundante expresión de caspasa-8 y ésta por tanto no puede activar eficientemente a caspasa-3, ni a otras caspasas que se encuentran “corriente abajo” en la cascada de caspasas. En estas células la activación de caspasa-8 provoca la activación proteolítica de un miembro de la familia Bcl-2, como es Bid. Esta activación provoca la traslocación de este a la mitocondria, donde va a interactuar con moléculas antiapoptóticas que se encuentran como componentes de la membrana mitocondrial

C.3.2.- Interacciones SMC-citoquinas

La apoptosis en SMC puede ser regulada tanto positiva como negativamente por factores de crecimiento convencionales. Así, el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF-1), el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) actúan como factores de supervivencia para

las SMC. De hecho la ausencia de factores de crecimiento es un potente inductor de la apoptosis en las SMC.

Durante el proceso aterosclerótico se ha visto que existe una sobreexpresión de PDGF y IGF-1, cuya acción puede ser la de preservar las células de la apoptosis y aumentar la proliferación, aunque como ya se ha dicho la proliferación y apoptosis que presentan la SMC es muy baja a pesar de la presencia de factores de crecimiento. De hecho las SMC en la placa aterosclerótica muestran un fenotipo senescente, caracterizado por su incapacidad para proliferar, si le llegan señales de proliferación es más probable que entren en apoptosis que en proliferación. Una explicación es que a pesar de que estén presentes los factores de crecimiento las SMC pierdan la capacidad de respuesta a estos, así se ha demostrado que durante la aterosclerosis se reduce la expresión del receptor tipo 1 del IGF. Es importante destacar que las oxLDL, las cuales inducen apoptosis en las SMC, pueden suprimir la expresión de este receptor (178,179). Otro factor que puede disminuir la expresión de IGF-1 es el TNF- α , con la consecuente disminución en la viabilidad de las SMC. Parece ser que uno de los mecanismos para inducir apoptosis, incluso aunque esté presente IGF-1, pasa a través de la ruta de la protein quinasa C (PKC) (180).

C.3.3.- Interacciones en SMC proteínas-matriz extracelular

La presencia de matriz extracelular protege de la apoptosis en muchos tipos celulares mediante señales mediadas por integrinas. Por ejemplo la proteína fibronectina presente en la matriz extracelular, es capaz de transmitir señales de supervivencia vía FAK (quinasas de adhesión focal), la fosforilación de ésta inactiva el gen supresor de tumores, que como ya hemos visto es un gran inductor apoptótico, desarrollando por tanto una respuesta de supervivencia. La integrina $\alpha_v \beta_3$ es también muy importante en las señales de supervivencia proporcionadas por la matriz extracelular (181, 137).

Las metaloproteínas de matriz extracelular (MMPs) rompen estas interacciones y por tanto promueven la apoptosis. Estas MMP pueden incluso promover la apoptosis directamente al liberar de la membrana de las células tanto Fas-L como TNF. Las MMP las producen tanto las SMC como los macrófagos, principalmente en zonas vulnerables ateroscleróticas, puede ser que las MMP liberadas

por macrófagos provoquen la apoptosis de las SMC, predisponiendo a la ruptura de la placa. Las MMP se encuentran inhibidas normalmente por los inhibidores de metaloproteinasas tejido específicas (TIMP), estas proteasas deberían de proteger de la apoptosis, sin embargo se ha comprobado que TIMP-3 puede inducir directamente apoptosis en SMC, aunque actualmente el mecanismo es desconocido (181, 137).

C.3.4.- Expresión de moléculas reguladoras de apoptosis en SMC

Como ya hemos comentado las SMC en cultivo derivadas de una placa aterosclerótica incrementa la susceptibilidad a la apoptosis y además esto no varían con el subcultivo. Esto sugiere que existen cambios estables, intrínsecos a la célula, en la expresión de genes proapoptóticos o antiapoptóticos que controlan la apoptosis en las SMC más que las interacciones célula-célula o el microambiente que existe en la placa y que por tanto esta susceptibilidad debe desarrollarse en los estadios iniciales.

La fase de decisión incluye la expresión de genes específicos pro y antiapoptóticos, como son los protooncogenes y los genes supresores de tumores. Si la suma de estas señales da como resultado la apoptosis se desencadena toda la maquinaria proteica para la destrucción. La apoptosis en las SMC la puede promover por la desregulación en la expresión de c-myc o de E2F (182,159), estos a su vez pueden estar regulados por p53. La sola expresión de p53 puede promover la apoptosis en SMC (183), de hecho las SMC en la aterosclerosis son muy susceptibles a la apoptosis mediada por P53. De este modo, la parada del ciclo celular y la imposibilidad de fosforilar Rb protegería a las SMC de la apoptosis.

Otro regulador muy importante en la apoptosis en SMC es la familia bcl-2. La apoptosis puede ser bloqueada por Bcl-2. Las SMC expresan bajos niveles de Bcl-2 *in vitro* e *in vivo* (159, 160). En las SMC provenientes de un proceso aterosclerótico, aunque no muestran grandes diferencias en la expresión de bcl-2, el balance entre proteínas antiapoptóticas/proapoptóticas, puede cambiar a favor de las proapoptóticas y desencadenar la apoptosis principalmente por Bax.

C.3.4.1.- Expresión del gen p53 en SMC

La expresión de p53 está involucrada en el control de la proliferación, senescencia y apoptosis de las SMC en condiciones patológicas como la aterosclerosis (184). Este control lo realiza junto con Rb, de forma que existe un modelo de control del ciclo celular y la apoptosis. La inactivación de P53 en SMC normales prolonga la vida en cultivo pero no parece tener influencia en la proliferación, lo cual sugiere que la supresión de p53 en estas células bloquea la apoptosis. Sin embargo en SMC de placas ateroscleróticas la inactivación de Rb provoca una masiva apoptosis, y esta apoptosis está mediada por P53, esto quiere decir que para que las SMC proliferen se tienen que inhibir tanto p53 como Rb. Los mismos mitógenos que son capaces de fosforilar a Rb y liberar a E2F para que la célula prolifere en SMC normales, en SMC procedentes de placas ateromatosas inducen apoptosis dado que, como ya hemos dicho, necesitan suprimir p53 para proliferar. Esto podría explicar porqué mitógenos como PDGF, a pesar de que se encuentran en altos niveles en la aterosclerosis, no producen índices de proliferación muy distintos de las SMC de arterias sanas, y sin embargo aumentan los índices de apoptosis. Otros factores de supervivencia presentes como el factor de supervivencia IGF-1 puede ser anulado por P53 en las SMC, ya que induce la expresión de la proteína de unión a IGF, lo cual bloquea su señal. El bajo nivel de proliferación y la pronta senescencia que se encuentra en las SMC procedentes de placas ateromatosas puede deberse a la disminución en la fosforilación de Rb y por tanto, para que las SMC proliferen necesitan por un lado inhibir Rb e inhibir P53 para bloquear la apoptosis (184,185).

Existen hipótesis en las que se expone que P53 es el responsable del estado quiescente en el que se encuentran las SMC en la media arterial. Cuando se producen los primeros cambios en una aterosclerosis inicial, las SMC adquieren la capacidad de migrar desde la media a la intima y para esto necesita suprimir la expresión de p53, la cual puede estar inducida por mitógenos presentes en los vasos (186). Las agresiones bioquímicas y mecánicas que puede sufrir un vaso arterial hacen que las SMC de la media queden expuestas a mitógenos cuya señal producen la rápida degradación de los niveles endógenos de P53, en ese momento comienza la migración y la proliferación de las SMC de la media, una vez que estas se ponen en cultivo no re-expresan p53. Si esta disminución no se produce, las SMC entran en apoptosis.

Como ya se ha dicho, las SMC derivadas de placas ateroscleróticas muestran una gran sensibilidad tanto a la apoptosis como a la parada del ciclo celular mediada por P53 en comparación con las SMC derivadas de arterias normales, estas diferencias en la sensibilidad al estímulo de P53 parece ser debido a que las células estén o no progresando en el ciclo celular. Los mecanismos que emplea P53 para inducir apoptosis o parada del ciclo celular son distintos, de hecho si se inhibe la síntesis de proteínas no se reduce su capacidad para producir apoptosis, mientras que sí lo hace para parar el ciclo celular (187, 188). Esto sugiere que en las SMC de placas ateroscleróticas P53 debe tener una actividad adicional a la regulación transcripcional capaz de llevar a las células a la apoptosis. Por tanto este incremento de susceptibilidad no esta mediada por un aumento en la expresión de P53 ni de su actividad (188). En otros estudios más recientes se ratifican estos hechos con ratones ApoE “knockout”, con los que se demuestra que P53 es esencial para el control del ciclo celular (parada en G₁), pero no para la inducción de la apoptosis en la aterosclerosis en este modelo (189).

Lo cierto es que la expresión de p53 en las SMC está en controversia ya que por ejemplo no se detecta P53 en arterias después de “ballon-injured”, ni tampoco en SMC bovinas en cultivo (190), sin embargo sí se detecta expresión en cultivos de SMC de rata (161). El principal punto de controversia está en si los niveles endógenos de P53 regula predominantemente la proliferación o la apoptosis en las SMC. Estudios recientes han demostrado que los niveles endógenos de P53 protegen de la apoptosis a las SMC y que reducen el desarrollo de la aterosclerosis (191).

C.3.4.2.- Factor de transcripción c-Myc en SMC

El factor de transcripción c-Myc, está codificado por un gen de respuesta temprana, implicado en la proliferación, diferenciación y crecimiento celular. Está descrito que interfiere en el control de la proliferación de las SMC (192), incluso se ha demostrado que las SMC en cultivo derivadas de placas ateroscleróticas muestran una sobreexpresión de c-myc respecto a las SMC controles (193), también se ha demostrado su expresión en lesiones aterogénicas tempranas en animales de experimentación. Entre los factores aterogénicos responsables de esta elevación se apunta a las LDL, ya que éstas incrementan la expresión de c-myc (194).

En las SMC normales en estado quiescente los niveles de c-Myc son bajos o indetectables, pero una vez que se produce la inducción con mitógenos o por daños en la pared vascular, se produce una rápida inducción de c-myc, y después, una vez que las células ya están proliferando, permanece con una expresión estable pero no alta, (195,196). Así, la expresión continua de c-myc produce en las SMC una proliferación continua y además una reducción en los niveles de α -actina y apoptosis que responde a un cambio de fenotipo contráctil a sintético en las SMC (197). La inducción de c-myc es condición necesaria y suficiente para que la célula quiescente entre en el ciclo celular y que progrese en él, ya que si los niveles de c-Myc se mantienen artificialmente las SMC entran en apoptosis (195, 196).

Por otra parte c-Myc es además un potente inductor de la apoptosis en las SMC (182). Se ha comprobado que c-Myc media la apoptosis en las SMC cuando se priva a las células de factores de crecimiento y en respuesta a estrés fisiológico y que esta acción puede ser inhibida por Bcl-2, por lo que puede actuar vía mitocondrial para ejercer su acción apoptótica. Esto implica que c-myc en las SMC puede promover tanto apoptosis como proliferación y que por tanto serán los mediadores “corriente abajo” de c-myc los que puedan desarrollar un proceso u otro. En este sentido se ha visto que cdc25A, (fosfatasa asociada al ciclo celular, involucrada en la progresión de G1) es inducida directamente por c-Myc, y que se requiere tanto para la proliferación como para la apoptosis. La supresión de esta fosfatasa inhibe ambos procesos, aunque la expresión de cdc25A es necesaria pero no suficiente para inducir apoptosis en las SMC y su acción está limitada a la fase G0/G1.

Respecto al papel que c-myc juega en el desarrollo de la aterosclerosis se ha demostrado en animales hipercolesterolémicos que c-myc se activa no solamente en zonas de aterosclerosis temprana, si no incluso en zonas adyacentes susceptibles de unirse a la lesión (198), lo cual demuestra que la activación de c-myc se produce de forma muy temprana en las zonas donde los lípidos se acumulan. Hay que apuntar que cuando se produce un acúmulo de lípidos se crea un estrés oxidativo en la zona, y dado que c-myc es un gen sensible a procesos de estrés oxidativo, se activa. Otro factor sensible al estrés oxidativo es el NF-KB, este se ha demostrado que se activa de forma similar en las lesiones tempranas y en las mismas zonas (199). En este estudio se ha

comprobado que anulando el estrés oxidativo mediante la administración de antioxidantes se atenúa esta activación y el desarrollo de la lesión.

C.3.4.3.- Familia bcl-2 de SMC

La regulación de la apoptosis por miembros de la familia Bcl-2 es un proceso que se lleva a cabo mediante la dimerización de las moléculas pro- y anti-apoptóticas de la familia, por tanto la susceptibilidad a la apoptosis viene determinada por la proporción de expresión relativa de estas moléculas. La expresión de los genes de la familia bcl-2 en las SMC depende del estado de la lesión y de la localización de las SMC dentro de la arteria (200).

La expresión de bax se detecta tanto en las SMC de la intima y de la media normales como en toda la lesión aterosclerótica (201, 202). Pero en la lesión aterosclerótica la expresión es mucho mayor, por tanto ha de ser sobreexpresado a lo largo del proceso.

Bcl-2 inhibe la apoptosis generada por radicales libres y peroxidación lipídica en las SMC, acontecimientos muy importantes en el desarrollo de la aterosclerosis (203). Bcl-2 no es detectable en la mayoría de las SMC en la placa aterosclerótica, ni tampoco en las arterias sanas (174, 204), por lo cual su papel no está bien definido. bcl-X_L se expresa en las SMC procedentes de placas ateroscleróticas, y se cree que tiene el principal papel para evitar la apoptosis en la aterosclerosis (205), incluso se ha visto que puede aumentar en las SMC de la intima en lesiones ateroscleróticas tempranas (202). Otros miembros de la familia bcl-2 como Bak, se expresa mucho en las SMC procedentes de placas ateroscleróticas y tiende a heterodimerizar con Bcl-X_L.

C.3.5.- Efecto de los factores circulantes en las SMC

El papel de los factores circulantes es muy importante y no debe de ser subestimado. Los más importantes en relación con la apoptosis son las LDL, en particular las oxLDL y la producción local de sustancias reactivas del oxígeno, las cuales alteran el estado redox de las células, que puede llevar a las células a la apoptosis o hacer que otras sustancias se conviertan en inductores de apoptosis. Un estrés

oxidativo se produce cuando las células están expuestas a altos niveles de O_2 o sus derivados ROS (especies reactivas del oxígeno), el más conocido es el anión superóxido O_2^- , el cual es producido principalmente por células inflamatorias. Este puede peroxidar lípidos y provocar apoptosis en las SMC (206-208). En el sistema vascular la principal fuente de O_2^- se produce por la NADPH oxidasa, la cual está sobreexpresada en la aterosclerosis.

C.4.- Papel de las lipoproteínas en el desencadenamiento del proceso apoptótico

La relación entre altas concentraciones de colesterol en el suero y la aterosclerosis es algo que está establecido desde hace más de 50 años, esta acción viene desencadenada por las lipoproteínas LDL (209). La presencia de radicales del oxígeno junto con los altos niveles de LDL en la pared vascular lleva a la oxidación y peroxidación de estas LDL. Las oxLDL son inductores apoptóticos muy potentes, las cuales se produce mediante rutas intrínsecas, y son capaces de sensibilizar a las células a estímulos externos.

Tanto el colesterol como sus óxidos están involucrados en la iniciación del proceso aterosclerótico (210-212), una de las hipótesis de formación de la placa aterosclerótica sugiere que los altos niveles en plasma de LDL ricas en colesterol y la oxidación de LDL acumuladas en el espacio subendotelial promueven el desencadenamiento de la aterosclerosis (213). Los cambios estructurales y biológicos que se producen en las LDL en este nivel son principalmente acumulación de lisofosfatidilcolina y lípidos peroxidados, incluido el colesterol, dando como producto oxysterol. Las oxLDLs son capaces de provocar que las células vasculares liberen factores quimiotácticos localizados que provocan el reclutamiento de monocitos y su posterior diferenciación en macrófagos. Incluso ellas mismas pueden producir estos efectos (214). Los monocitos son responsables de producir la peroxidación de las LDL y su posterior ingestión por receptores no regulados por colesterol, los llamados “receptores basureros” y de esta manera convertirse en células espumosas, las cuales son fenotipos terminales que acaban necrosándose y liberando su contenido lipídico al entorno. Además, debido a factores derivados del entorno que se está creando, se produce una modulación del fenotipo de las SMC, pasando de un fenotipo contráctil a un fenotipo sintético. Las SMC sintéticas, al igual que los macrófagos, pueden expresar

receptores para LDL modificadas, lo que provoca que se vayan cargando de lípidos dando lugar a su posterior transformación en células espumosas. Además, las oxLDL son citotóxicas por sí mismas, ya que provocan la liberación de lípidos intracelulares y de enzimas lisosomales que aumentan la progresión de la aterosclerosis (214).

Las oxLDL van cargadas de óxidos de colesterol (215), los cuales tienen una gran cantidad de acciones (214, 216-218) entre las cuales las más importantes son:

- Potente regulador de los niveles de esteroides en la célula. Esto lo hacen de dos formas:
 - a) Mediante la regulación negativa de la HMG-CoA reductasa, enzima reguladora de la biosíntesis del colesterol y también del número de receptores de LDL en la célula.
 - b) Aumentando la esterificación del colesterol intracelular por la activación de la AcilCoA colesterol acil transferasa
- Inhiben la proliferación de las SMC.
- Tienen efectos citotóxicos.
- Son capaces de inducir apoptosis *in vitro*.

De los óxidos de colesterol encontrados en la placa ateromatosa humana, los más numerosos son el 7-hidroxicolesterol y el 7-cetocolesterol, mientras que el 7-cetocolesterol y el 25-hidroxicolesterol son los más abundantes en la pared aórtica tras una dieta rica en colesterol en animales de experimentación. De éstos, se ha visto que los dos últimos son efectivos para inducir muerte celular, pero especialmente el 25-hidroxicolesterol (214).

El papel de las oxLDL en la apoptosis de las SMC, no sólo se reduce a aquellas áreas de la placa ateromatosa donde hay una infiltración de macrófagos. Es decir, no sólo actúa en una aterosclerosis avanzada, sino también en la aterosclerosis temprana. Este fenómeno ha sido estudiado en animales de experimentación, a los cuales se les ha proporcionado una dieta rica en colesterol durante un tiempo determinado, el cual no es suficiente para que se desarrolle la placa aterosclerótica. La apoptosis que se observa en estos modelos está directamente relacionada con el incremento de lípidos y sus

derivados. Como ya se ha dicho anteriormente, hay una relación directa entre el grado de acumulación de lípidos por las SMC, provocado por las oxLDL, el aumento en la expresión de bax (molécula pro-apoptótica) y el aumento de la apoptosis (218).

Por otro lado, determinados estudios muestran que de todas las sustancias que componen las oxLDL, solamente tienen una significación en la inducción apoptótica de las SMC el 7-cetocolesterol y el 25-hidroxicolesterol, mientras que los fosfolípidos no tienen efectos a este nivel. El 7-cetocolesterol tiene más influencia en la inhibición de la proliferación de SMC y en la inducción a la apoptosis de las células endoteliales, mientras que el 25-hidroxicolesterol tiene efecto pro-apoptótico en las SMC, a la vez que es el que más potencia proapoptótica tiene de los dos (214).

Los mecanismos que parecen involucrados en la acción proapoptótica de las oxLDL y, en particular, de los oxiesteroles, no están en absoluto bien conocidos, apareciendo en la bibliografía una serie de relaciones entre los oxiesteroles y diversas moléculas y acciones proapoptóticas. Debido a esto, a continuación se van a describir los principales acontecimientos que se producen bajo la acción de oxLDL, oxiesteroles y la relación que estos factores tienen con el proceso apoptótico. Los hechos observados son:

- 1.- Regulación negativa de bcl-2 y aumento en la expresión de bax
- 2.- Aumento en la actividad caspasa-3.
- 3.- Activación Fas/Fas-L
- 4.- Generación de ROS
- 5.- Acumulación de ceramidas
- 6.- Aumento de los niveles de Ca^{2+} .
- 7.- Inhibición de la síntesis de colesterol.
- 8.- Inducen la degradación o el bloqueo de quinasas de supervivencia Akt
- 9.- Otros efectos de la acción de oxLDL sobre el proceso apoptótico

C.4.1.- Efecto de las oxLDL sobre la expresión de genes de la familia bcl-2

Como se ha dicho, la principal función de la familia Bcl-2 es la de regular la apoptosis a nivel mitocondrial. Una de sus principales actuaciones es la de evitar o inducir que se produzca la salida del citocromo c de la mitocondria, el cual activaría de forma irreversible la ruta de las caspasas y por tanto la muerte celular.

Durante la apoptosis el citocromo c se libera de la mitocondria y este hecho es inhibido por la presencia de Bcl-2. El citocromo c una vez en el citoplasma forma parte del apoptosoma: citocromo c, Apaf-1 caspasa-9. La liberación de citocromo c provocada por Bax no es contrarrestada con inhibidores de caspasas, lo que quiere decir que su acción no esta mediada por estas proteínas.

Los oxiesteroles en especial el 25-hidroxicolesterol pueden disminuir la expresión de bcl-2 y bcl-X_L (219-221), activar a Bad y aumentar la expresión de genes que codifican para proteínas proapoptóticas de dominio único BH3 como Bim, lo cual lleva también a la activación de Bax/Bak. Estas acciones parecen estar mediadas por la inhibición de quinasas de supervivencia Akt (216).

Respecto a los estudios de expresión de bcl-2 en SMC, se ha comprobado que no está sobreexpresado y que cuando se produce una inducción apoptótica con 25-hidroxicolesterol se produce una rápida disminución en la cantidad de Bcl-2 (221). Pero la relación causa-efecto entre oxiesteroles y bcl-2 no se conoce. Además existe una relación entre las oxLDL y la elevación de los niveles de Bax en las SMC dependiente del estado de la lesión aterosclerótica (218).

C.4.2.- Aumento en la actividad caspasa-3 por oxLDL

La caspasa-3 (CPP 32) es un miembro de la denominada familia cistein proteasas de la proteína convertora de la interleukina 1 β (ICE), comúnmente llamada caspasas. Están involucradas en la ejecución de la apoptosis ante determinados estímulos. CPP 32 es una de las caspasas más importantes al ser un ejecutor muy eficiente. Tiene como sustratos proteínas tan importantes como PARP (Poly-ADP-Ribose-Polymerase) que es una enzima de reparación del DNA que se une

especialmente al de cadena simple; proteína Rb (proteína del retinoblastoma) implicado en el control del ciclo celular; SREBPs (proteínas de unión a elementos de respuesta a esteroides) implicados en el control del metabolismo de esteroides; y U1-70Kd necesaria para la maduración de los mRNA.

Se ha observado que al inhibir la caspasa-3 se contrarrestan los efectos apoptóticos inducidos por los oxisteroides, por tanto la apoptosis inducida por oxisteroides debe producir la activación de caspasa-3 (CPP32). Si se inhiben CPP 32 y ICE (caspasas de iniciación: 1,5 y 4) se produce la inhibición de la apoptosis si el tratamiento ha sido con 7-cetocolesterol, además esta inhibición es aditiva, es decir es mayor que inhibiendo solo CPP-32, pero esto no ocurre con 25-hidroxicolesterol (221). Esto sugiere que, en la apoptosis producida por 7-cetocolesterol, ICE actuaría secuencialmente a CPP-32, pero en el caso del 25-hidroxicolesterol sería independiente, o bien podrían ser otras caspasas las implicadas.

C.4.3.- Activación Fas/Fas-L por oxLDL

Oxisteroides como el 25-hidroxicolesterol incrementan la activación de Fas/Fas-L en las SMC (222) . En estas células la activación de Fas es detectable mientras que apenas lo es la activación de Fas-L (176), por tanto un incremento en Fas-L, como el provocado por los oxisteroides es crucial para el desencadenamiento de la apoptosis en las SMC. Este hecho queda confirmado ya que al antagonizar a Fas-L se inhibe la inducción apoptótica generada por oxLDL.

C.4.4.- Generación de sustancias reactivas del oxígeno por oxLDL

La exposición de SMC a oxLDL, lleva asociado una rápida generación de sustancias reactivas del oxígeno (ROS). Además, el aumento de ROS que producen las oxLDL no se observa con las LDL nativas. Tanto el anión superóxido como el peróxido de hidrógeno inducen apoptosis en SMC, acción que puede ser inhibida por antioxidantes (223). Una de las acciones que producen las ROS es la disminución de los niveles de Bcl-X_L, con lo cual ésta podría ser otra ruta de actuación apoptótica (224,225).

Así se establece una relación entre la cantidad de ROS, el estado redox que adquiere la célula y la cantidad de oxLDL. Además, la inhibición de las lipooxigenasas también disminuye la producción de ROS en SMC; por tanto, la acción apoptótica de las oxLDL también involucra esta ruta (226).

Respecto a cuál es la fuente de ROS en SMC, se ha visto que las células tratadas con Rotenona (inhibición de la cadena respiratoria) inhiben la generación de ROS, a pesar de estar en presencia de oxLDL. Esto indica que la mitocondria estaría involucrada en la generación de ROS por oxLDL (226).

De cualquier manera, la generación de ROS a partir de la mitocondria puede ser más bien un acontecimiento tardío, una vez que la célula ha comenzado el proceso apoptótico, puesto que como hemos dicho antes, la liberación por parte de la mitocondria de ROS es debida a una pérdida total de la membrana externa, y hemos de recordar que para el proceso apoptótico se necesita ATP.

C.4.5.- Acumulación de ceramidas por oxLDL

Se ha comprobado que tanto las oxLDL como los oxisteroles producen una acumulación de ceramida a través de la activación de las denominadas esfingomielinasas ácidas (endosomales). El mecanismo de acción no se conoce, pero al quedar éstas inhibidas, se inhibe la apoptosis generada por oxLDL. Las ceramidas ejercen su acción proapoptótica principalmente activando o inhibiendo distintas moléculas como: PKCs, PLD, PLA2, PC-PLC, óxido nítrico sintasa, y las cascadas de señales de ERK, SAPK/JNK (66). Además, pueden activar o inhibir factores de transcripción, modular la homeostasis del Ca^{2+} , e interaccionar con proteínas reguladoras del ciclo celular como la proteína Rb. Pero su principal acción apoptótica es la activación de MAP-quinasas que van a regular moléculas apoptóticas.

C.4.6.- Aumento de los niveles de Ca^{2+} por oxLDL

Además del papel del Ca^+ como mediador de los estímulos mitóticos, la elevación de los niveles citosólicos de Ca^+ se asocian también a la muerte por apoptosis (227). La primera evidencia de esto se mostró con el estudio de las endonucleasas que producen la rotura internucleosómica del DNA. Al incubar núcleos aislados de una gran variedad de células con Ca^{2+} y Mg^{2+} se produce el corte del DNA y esto da lugar al patrón en escalera típico de la apoptosis. Asociado a esto también se ha visto que otras proteínas que activan estas endonucleasas, como la calpaína, se activan al aumentar los niveles de Ca^{2+} (227).

Otra evidencia de que el Ca^{2+} juega un papel crucial es el hecho de que bcl-2 ejerce su acción antiapoptótica en parte alterando la compartimentación celular del Ca^{2+} , especialmente en el núcleo celular. En contraposición, el Ca^{2+} , también puede inhibir la apoptosis. Este efecto contrario parece que responde a concentraciones y tiempos de exposición a Ca^{2+} . De esta forma, una elevación rápida durante un periodo corto del nivel de Ca^{2+} llevaría a una inhibición de la apoptosis y un aumento de la proliferación, mientras que un aumento continuo y duradero condenaría a la célula a una muerte por apoptosis (4).

Respecto a las SMC, se ha demostrado que tanto las oxLDL, como el 25-hidroxicolesterol, alteran los niveles de Ca^{2+} citosólicos y que esto induce la apoptosis. Así la inhibición de los canales de Ca^{2+} produce la inhibición de la apoptosis inducida por el 25-hidroxicolesterol en las SMC (228), este efecto también se consigue si se elimina el Ca^{2+} del medio. Estos descubrimientos apoyan, de una manera muy importante, la hipótesis de que el Ca^{2+} es un mediador intracelular muy importante en la apoptosis mediada por oxiesteroles.

C.4.7.- Inhibición de la síntesis de colesterol por oxLDL

Se ha descrito que el efecto apoptótico de la oxLDL, y en particular del 25-hidroxicolesterol, se debe en parte a su capacidad para inhibir la ruta del colesterol (229). A este respecto se sabe que:

- La inhibición de la ruta biosintética del colesterol, mediante inhibidores de la HMG-CoA reductasa y de la síntesis de isoprenoides (lovastatin), induce apoptosis aun en presencia de aporte de colesterol por parte de las LDL. Así parece que para que no se produzca la apoptosis, lo necesario, más que el colesterol, serían los derivados no esteroideos del mevalonato, ya que éste es el producto de la HMG-CoA reductasa. Esto incluye proteínas preniladas como Ras, laminina nuclear, dolicol y ubiquinona entre otros (230).
- La apoptosis inducida por oxiesteroles, especialmente por 25-hidroxycolesterol en células en cultivo, se inhibe en presencia de colesterol (CPP32) (221).
- Además, el colesterol inhibe la apoptosis al inhibir la degradación de esfingomielinasas, las cuales producirían ceramidas.

Antes de analizar estos hechos es necesario saber para qué necesita una célula colesterol en el proceso apoptótico. Es un hecho que la caspasa-3 activa proteolíticamente a los SREBP, de manera que éstos se vuelven insensibles a la represión por esteroides, permaneciendo siempre activados (231). Estos SREBP activan la transcripción de genes, tanto de la ruta biosintética del colesterol, como de los genes para el receptor LDL. Por tanto, están proporcionando un aporte de colesterol a la célula durante la apoptosis. Durante el proceso apoptótico, en contraposición a lo que ocurre en la necrosis, las membranas permanecen intactas. Es posible que el papel del colesterol esté manteniendo la integridad de las membranas, y por esto se activarían los SREBP.

Por tanto, existe una contradicción entre el papel apoptótico que juegan los oxiesteroles inhibiendo la ruta biosintética del colesterol y el hecho de que el colesterol sea necesario para la integridad de la membrana celular y que se activen los SREBP en el proceso apoptótico, junto con el hecho también de que en la apoptosis por oxiesteroles se inhibe en presencia de colesterol (221,231). Esta relación no se conoce, pero existen determinadas hipótesis una de ellas explica que la activación de SREBP puede ser un control *feedback* para prevenir en el último momento la apoptosis.

C.4.8.- Inducción por oxLDL de la degradación o el bloqueo de supervivencia Akt

Las Akt son proteínas quinasas de supervivencia (proteína quinasa B), las cuales quedan inhibidas tras la inducción apoptótica del 25-hidroxicolesterol. Esta inhibición es un evento temprano en la apoptosis, ya que se produce antes de cualquier activación de caspasas (216).

La activación de muchos de los genes de la familia bcl-2 por los oxisteroles viene desencadenada por esta inhibición de Akt. Akt actúa fosforilando e inhibiendo a Bad, también es capaz de inducir la expresión de Bcl-X_L a través de la ruta NF- κ B y son capaces de inhibir proteínas de dominio único BH3 como Bim (219,220).

C.4.9.- Otros efectos de las oxLDL sobre el proceso apoptótico

Se ha descrito que las oxLDL, y los oxisteroles tienen efectos sobre los siguientes factores y mediadores apoptóticos.

- Activación de MAPK (MAP quinasas), mediada por la transducción de señal desde los receptores basurero (232).
- Activación de rutas PKC (proteína quinasa C) (233).
- Las oxLDL producen la inducción de p53 (222). En concreto el 25-hidroxicolesterol aumenta los niveles de P53, pero esta acción no se encuentra con otros oxisteroles como el 7- β hidroxicolesterol. Estudios con 7-cetocolesterol tampoco muestran elevación en los niveles de P53, pero sí para P21 como mediador apoptótico (234).
- Sobreexpresión de c-myc (235) el cual se expresa en células que proliferan activamente y es capaz de inducir apoptosis en ausencia de factores de crecimiento, a través de P53. Esta apoptosis inducida por c-Myc puede ser suprimida por Bcl-2 a través de una vía independiente de P53.

C.5.- Apoptosis en SMC regulada por óxido nítrico

El endotelio vascular produce un gran número de agentes, los cuales pueden regular la apoptosis de las SMC. El más interesante es el NO, el cual parece actuar vía peroxinitritos los cuales se forman gracias a que el NO es altamente reactivo, puede reaccionar con el oxígeno y producir ONOO^- (236).

. El óxido nítrico es hidrofóbico y con una alta capacidad de difusión como radical libre, es generado por la oxidación de L-arginina mediante la oxido nítrico sintasa (NOS) dependiente de NADPH. En el endotelio se expresa de forma constitutiva (cNOS) y de forma inducible (iNOS), mientras que en las SMC se encuentra solo la NOS inducible.

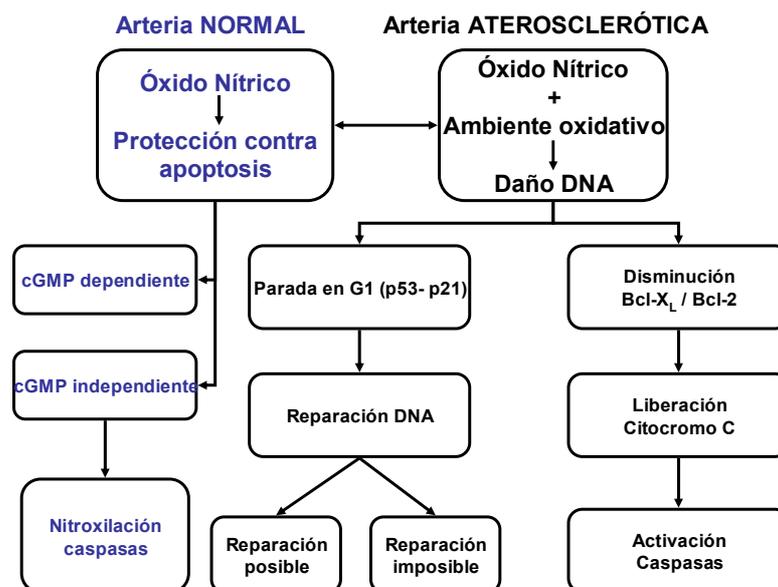


Figura C.2.- Acción proapoptótica/antiapoptótica del óxido nítrico en una arteria normal y en una arteria con aterosclerosis.

El NO se ha comprobado que puede tanto inhibir la apoptosis en determinados tipos celulares, mientras que en otros puede inducir la apoptosis, entre los que se encuentran las SMC (237). El mecanismo concreto de esta doble acción no se conoce

con claridad, pero las diferencias en el estado redox de la célula parece ser el factor determinante (238,164). Incluso se ha descrito que esta dualidad parece responder a diferentes concentraciones de NO, las cuales pueden aumentar o disminuir la afinidad con la que P53 se une al DNA, con lo cual alteraría todo el patrón de genes que activa o reprime transcripcionalmente p53 (239).

Varios estudios han demostrado mediante tratamientos con donadores de NO (240), o con la sobreexpresión de NOS que el NO induce la apoptosis en las SMC. De cualquier manera las rutas de acción del NO en el proceso apoptótico de la aterosclerosis no están definidas en absoluto. Además los métodos que se emplean para la generación de NO, como es el caso del nitroprusiato sódico (SNP), tienen efectos *per se* en la apoptosis.

En la pared arterial normal las células endoteliales sintetizarían pequeñas cantidades de NO mediante la NOS_e, que protegerían tanto a ellas como a las SMC de la apoptosis. Esta protección estaría mediada por mecanismos tanto dependientes como independientes de cGMP. Aunque en muchos tipos celulares la acción antiapoptótica del NO esta asociada a la producción de cGMP, el cual suprime la liberación de citocromo c, la producción de ceramidas y la activación de caspasas entre otros. Sin embargo en la aterosclerosis la situación es radicalmente distinta, ya que está activada la iNOS y las células se encuentran en una situación de estrés oxidativo, en el que se incluye una situación de hipercolesterolemia. En esta situación el NO se combina con el anión superóxido para dar peroxinitritos (ONOO⁻), y tanto estos como el NO inducen apoptosis (236).

Como ya hemos dicho, tanto IL-1- β , IL-4 INF- γ y TNF- α pueden inducir apoptosis al inducir la producción de NO en las SMC, las cuales poseen la forma inducible de la óxido nítrico sintasa (iNOS). Esta se ha detectado especialmente activa en las proximidades de los núcleos necróticos de la placa aterosclerótica (241,242).

Otros estudios muestran que la acción del NO es radicalmente distinto dependiendo del fenotipo que expresen las SMC, de forma que las SMC contráctiles, a las que denominan SMC de fenotipo arremolinado es relativamente resistente a la apoptosis inducida por NO, lo cual es consecuente con su papel estructural dentro del

vaso, mientras que las de fenotipo sintético o SMC de fenotipo epiteloide muestran una respuesta apoptótica al NO muy superior (243).

C.5.1.- Acciones pro-apopticas del NO en SMC

Las moléculas que actúan después del NO no se conocen bien, pero dentro de ellas están:

1.- P53

El NO induce la acumulación de P53. Esta acumulación de P53 produce parada del ciclo celular mediada por P21, o bien induce apoptosis. Son varios los caminos por los que P53 se acumula en células tratadas con NO, en primer lugar el NO o sus derivados pueden producir daños en el DNA, lo cual provoca la activación de p53. Pero diversos estudios muestran que esta no debe de ser la principal causa ya que el NO no es muy efectivo en la producción de daños en el DNA (244).

Existen evidencias de que p53 se activa transcripcionalmente, ya que se necesita la acción de P53 para inducir la expresión de determinados genes por NO, como son p21 o bax (245, 246), además se ha visto que la sobreexpresión de AKT, la cual inhibe a P53, impide la apoptosis mediada por P53 (247).

La proteína P53 acumulada está fosforilada en la serina 15, lo cual es necesario para su actividad y se encuentra localizada en el núcleo (248), pero se encuentra unida a su regulador negativo Mdm2. El NO produce una disminución en los niveles de Mdm2, lo cual lleva a una acumulación inicial de P53, después Mdm2 se restablece aunque P53 sigue estabilizada y activa (249), en este momento el NO puede actuar impidiendo el paso núcleo-citoplasma de P53.

Sin embargo en estudios de inducción apoptótica en SMC tratados con NO no se ha observado acumulación de P53 (250). Lo cual indica que el NO activa una ruta apoptótica independiente de P53. Por el contrario otros estudios en los que se hace una transfección de iNOS en SMC si se ve acumulación de P53 antes del desarrollo morfológico de apoptosis (240).

2.- Activación de JNK/SAPK y p38 quinasas.

El NO activa tanto JNK (c-Jun N-terminal quinasas) como a SAPK quinasas las cuales pertenecen al grupo quinasas activadas por mitógenos (MAPK), con lo cual median la acción apoptótica del NO. En concreto estas quinasas junto a P38 quinasa median la activación de caspasa-3 producida por el NO, y la inhibición de estas impide también la activación de caspasa-3 (251). Estas quinasas pueden contribuir a la acción apoptótica del NO estabilizando P53 (252-257).

3.- Fas

NO induce la expresión de Fas (258, 259). En las SMC (260) el bloqueo en la unión Fas-Fas-L inhibe completamente la acción apoptótica de donadores de NO. La manera en que aumenta la expresión de Fas puede deberse a un mecanismo dependiente de GMPc.

4.- Inhibición de PKC (proteín quinasa C), y activación de PKG.

Una de las rutas que median la acción apoptótica del NO implica la inhibición de la actividad PKC, mediante un mecanismo de S-nitrosilación (261). Sin embargo el papel de la PKC en la apoptosis está en controversia, ya que existen estudios en los que es necesaria su inhibición (262, 66), o su activación (263,264). Un ejemplo de este último es el hecho de que en SMC tratadas con donadores de NO, se ha visto que es fundamental la activación de PKC en la acción apoptótica del NO (250).

5.- NF-kB

El NO actúa disminuyendo la capacidad de unión del NF-kB al DNA en las SMC (250, 251). En SMC con donadores de NO a concentraciones apoptóticas se ha visto como disminuye esta capacidad de unión (250, 265, 266). La inhibición de NF-kB hace que se pierda la transcripción de genes de supervivencia y se desencadene la apoptosis.

6.- Generación de ceramidas

Los donadores de NO incrementan los niveles de ceramidas, mediante el aumento de actividad de la esfingomielinasa neutra (N-SMasa) (267, 268). Las ceramidas activan diversas rutas apoptóticas, entre las que se incluyen la liberación del citocromo c, activación de caspasa-3, activación de JNK/SAPK, inhibición de protein quinasa B/Akt, y la supresión de bcl-2.

7.- Activación de la ruta apoptótica mitocondrial

NO es capaz de unirse a la citocromo c oxidasa de la cadena de transporte mitocondrial. Esto produce la inhibición de la cadena de transporte electrónico, con lo cual se produce una caída del potencial de membrana, la apertura de los PTPE y la liberación del citocromo c (269, 270). Además en estas circunstancias el superóxido producido puede combinarse con el NO y formar peroxinitrilos (271), los cuales también inducen la disfunción mitocondrial y la liberación del citocromo c. Por tanto esta acción depende del estado redox de la célula.

Respecto a la acción sobre la familia Bcl-2, NO modula el balance de expresión bcl-2/bax en las SMC (237), lo que hace es disminuir la expresión de bcl-2 y aumentar la expresión de bax, lo cual indica una situación proapoptótica. El p53 produce ambos efectos, con lo cual esta acción del NO puede estar mediada por p53. Además puede inhibir la expresión de bcl-X_L (265)

Existen estudios en los cuales la acción del NO es únicamente disminuir Bcl-2 y no tiene ninguna acción sobre Bax, aunque evidentemente tiene el mismo efecto sobre el proporción bcl-2/bax. Además esta acción proapoptótica está limitada a SMC con un determinado fenotipo, el que ellos denominan SMC de fenotipo epiteloide, el cual sería compatible con las SMC sintéticas, mientras que las SMC de fenotipo contráctil normales serían resistentes a la acción del NO (243).

C.5.2.- Acciones anti-apoptóticas del NO en SMC

En contraste a esta acción proapoptótica está descrito que el NO a concentraciones fisiológicas producidas por la NOSc del endotelio, protege de la apoptosis mediante distintos mecanismos, los cuales son:

a).- Inhibición de la actividad caspasa por S-Nitrosilación

Esta inhibición la realiza el NO mediante un mecanismo de nitrosilación de los restos Cys de las caspasas (272, 69), los cuales son necesarios tanto para su activación proteolítica como para su acción también proteolítica (273). Esta actividad de nitrosilación se contrarresta por la acción de los antioxidantes como el glutathion. Lo cual sugiere de nuevo que la acción del NO está sujeta al estado redox de la célula. Además este mecanismo implica que NO puede inhibir cualquier estímulo apoptótico ya que las caspasas son los mediadores finales de apoptosis.

Esta nitrosilación es reversible y es muy interesante el hecho de que caspasa-3 pierde la nitrosilación una vez que se ha activado la ruta de Fas. Por tanto, los mecanismos de nitrosilación/desnitrosilación sirven como mecanismos de regulación, análogo a la fosforilación/desfosforilación (98).

También puede actuar a nivel de los poros transitorios de permeabilidad de la membrana mitocondrial (274), ya que puede disminuir su formación impidiendo por tanto la liberación del citocromo c y la consecuente activación de caspasa-3.

b).- Regulación de genes antiapoptóticos

Algunos autores han demostrado que el óxido nítrico incrementa la expresión de bcl-2 y bcl-X_L, lo cual les confiere una protección a la apoptosis frente a otros estímulos proapoptóticos como el TNF- α (275,276). Además inducen la expresión de HSP 70 y HSP 32, los cuales van a impedir la formación del apoptosoma, ya que impiden la oligomerización de Apaf-1, al interaccionar con los dominios CARD de Apaf-1.

D. CONTROL NUTRICIONAL Y REGULACIÓN GÉNICA POR NUTRIENTES EN LA ATEROSCLEROSIS Y LA APOPTOSIS

A continuación se va a analizar el efecto de dos tipos de dietas en el control de genes que afectan al proceso aterosclerótico y a la apoptosis relacionada con la aterosclerosis.

D.1.- Papel del colesterol en la aterosclerosis y la apoptosis

La relación entre altas concentraciones de colesterol en el suero y la aterosclerosis es algo que está establecido desde hace más de 50 años (209). Por tanto la hipercolesterolemia, que se caracteriza por altos niveles en plasma de colesterol/lipoproteínas (LDL principalmente), ha sido amplia e intensamente relacionada con la aterosclerosis (277).

El colesterol no es sólo un componente esencial de la membrana plasmática, también es precursor de ácidos biliares, hormonas esteroideas y vitaminas. La proporción colesterol/fosfolípidos determina la fluidez de la membrana plasmática, además la composición lipídica de la membrana es característica de cada tipo celular y de cada orgánulo celular. El contenido en colesterol de las membranas es necesario para que se desarrollen las características de esta y para las funciones celulares, ya que alteraciones en el contenido de colesterol provocan cambios en actividades enzimáticas asociadas a membranas y de canales catiónicos (278, 279). Todas estas observaciones hacen suponer que el colesterol provoca alteraciones en las membranas celulares mucho antes de que se desarrolle la aterosclerosis, de hecho un incremento de los niveles de colesterol en la dieta provoca disfunción endotelial, observable en los estados iniciales antes del desarrollo visible de la aterosclerosis (280).

La principal relación entre el colesterol y el desarrollo de la aterosclerosis no es directa y está mediada por los productos de oxidación de este, los cuales se encuentran fundamentalmente en las oxLDL de sujetos hipercolesterolémicos (281) y cuyo papel se ha explicado extensamente en el capítulo anterior.

En contraste con estas afirmaciones no hay que olvidar que el acúmulo de colesterol y de ésteres de colesterol en la pared arterial, lleva a la formación de células espumosas atribuidas fundamentalmente a macrófagos que se han llenado de colesterol, la formación de estas células son una marca inconfundible de aterosclerosis. Las SMC también pueden convertirse en células espumosas y esto ha sido demostrado *in vivo* (282-285). La adquisición de la capacidad de las SMC para acumular colesterol responde a cambios fenotípicos ya que hace que pierdan rápidamente los marcadores de fenotipo SMC (286).

Como ya hemos hablado, la alteración en el estado de diferenciación, que lleva a perder el fenotipo contráctil de las SMC, es el principal cambio para el desarrollo de la aterosclerosis (123). Estudios *in vitro* en los que se cargan a las células con colesterol muestran una pérdida de marcadores de fenotipo contráctil tan importantes como α -actina, MHC (cadena pesada de miosina) y sin embargo adquieren características de macrófagos. Por tanto el colesterol puede provocar una modulación fenotípica de las SMC asociado con la aterosclerosis (123).

Pero los mecanismos moleculares que provocan estos cambios por el colesterol no están definidos, aunque si se conoce que se producen a nivel transcripcional en respuesta a este acumulo de colesterol libre. En macrófagos esta descrito que el efecto del colesterol implica a las rutas de estrés del retículo endoplásmico (287), es posible que esta relación sea también para las SMC. Dos factores de transcripción que regulan el contenido en colesterol son las proteínas de unión a elementos de respuesta a esteroides (SREBP) y el receptor X de hígado (LXR). En los estudios en los que las SMC se cargan de colesterol *in vitro*, los SREBP, no parece que sean los reguladores de los cambios en las SMC, ya que la ruta SREBP esta inhibida, sin embargo LXR, dado que su ligando natural son los oxisteroides, si se encontraría implicado (286). Otro candidato son los PPAR γ (receptor peroxisomales de activación de proliferación), se ha visto que se activan con el acúmulo de colesterol (288).

Una de las consecuencias del acúmulo de lípidos en las SMC es el hecho de que las células susceptibles de apoptosis (que sobreexpresan bax) sean aquéllas que están cargadas de lípidos (células espumosas), lo cual indica la relación entre la acumulación de lípidos en el citoplasma de las SMC y cambios en la relación de Bax/Bcl-2. Así está

demostrado que los lípidos peroxidados y en especial los oxisteroles inducen apoptosis en SMC por una ruta dependiente de caspasa-3 y de la disminución de Bcl-2. Además se ha comprobado que hay una regulación positiva de bax también en animales con placas ateroscleróticas experimentales, revirtiéndose el proceso si se les elimina la dieta de lípidos.

La razón por la cual aumenta la expresión de bax, parece que es porque produce una regulación positiva dependiente de p53. Se sabe que p53 se sobreexpresa en la placa, aunque las causas no son claras. Sí se conoce que las especies reactivas del oxígeno, las cuales crean un estrés oxidativo, pueden dañar el DNA. Esto activaría determinadas quinasas, denominadas quinasas dependientes de DNA (DNA-PK), las cuales fosforilarían a P53 provocando su activación.

Existen varios estudios en los que se muestra que el colesterol libre acumulado en los macrófagos, lo que conocemos estrictamente como células espumosas, lleva a la activación de rutas apoptóticas dependientes de caspasas, y lo hace mediante dos mecanismos posibles: 1.- Incrementando la cantidad de Fas-L en membrana externa, lo cual llevaría a una activación de la ruta de fas; y 2.- activando la ruta apoptótica mitocondrial (289). Esto último se ha comprobado al observar que se produce una disfunción mitocondrial en estas células cargadas de lípidos, lo cual puede deberse a la elevación de los niveles de Bax ya señalados, o incluso el propio enriquecimiento en colesterol de la membrana mitocondrial, puede llevar a una alteración estructural y la caída del potencial de membrana, ya que entre otras cosas se conoce que los altos niveles de colesterol afecta a la acción de la ATPasa mitocondrial. En este mismo sistema además se ha observado que existe apoptosis independiente de caspasas, lo cual revela otros efectos apoptóticos del colesterol (290).

Otra importante observación es el hecho de que inhibidores de la HMG-CoA-reductasa por estatinas inducen apoptosis (291,292 ,230). La HMG-CoA reductasa es una enzima clave en el control de varias rutas metabólicas que culminan, por una parte, en la síntesis de colesterol y sus derivados (ácidos biliares y hormonas esteroideas), y por otra, en derivados isoprenilados y farnesilados que formaran parte de importantes proteínas reguladoras (entre ellas la proteína G y la tirosin quinasa). Además, se expresa (con diferente intensidad) en casi todos los tejidos del organismo.

Esta inhibición hace que disminuyan los metabolitos derivados del mevalonato y produce descenso en los niveles de Bcl-2 y ningún efecto sobre Bax, además se produce una activación de caspasa-9, lo cual indica, que este descenso en la proporción Bcl-2/Bax induce la ruta mitocondrial del proceso apoptótico (230, 293). Sin embargo tres componentes de la ruta del mevalonato restauran los niveles de Bcl-2 e inhiben la apoptosis causada por la inhibición de la HMG-CoA-reductasa, estos son, mevalonato, farnesil pirofosfato (F-PP) y geranyl geranyl pirofosfato (GG-PP). Por tanto el efecto apoptótico que parece tener la inhibición de la HMG-CoA reductasa sobre las SMC está mediado por la inhibición en la prenilación de proteínas (293), ya que F-PP y GG-PP se usan para la prenilación de proteínas, ejemplos concretos de esta acción sería la proteína P21 Rho A, la cual se prenila por GG-PP, ésta puede mediar en la supervivencia celular ya que induce la expresión de bcl-2 (294). La expresión constitutiva de rho A activa revierte los efectos de la inhibición de la HMG-CoA reductasa.

Otro dato a destacar trata de la relación entre la síntesis y acúmulo de colesterol y el control del ciclo celular. Una de las proteínas implicadas en el transporte del colesterol tanto dentro como hacia fuera de la célula es la caveolina, la expresión del gen que codifica esta proteína está regulada por la cantidad de colesterol y a su vez controlada por SREBP-1. La expresión de caveolina está ausente en muchos tumores, y en células normales disminuye en la fase S. La inhibición de la expresión de caveolina hace que las células acumulen colesterol (295). La caveolina está regulada además por P53 por la formación de un complejo P53-E2F-Sp1. Por tanto una respuesta efectiva de la caveolina tanto a nivel de ciclo celular como del contenido celular de colesterol necesita de niveles adecuados de E2F y P53. Como hemos expuesto ampliamente E2F y P53 están implicados tanto en la proliferación como en la apoptosis y gracias a la caveolina también están implicados con el contenido en colesterol (296).

D.2.-Papel de los ácidos grasos polinsaturados en la aterosclerosis y apoptosis

Se ha comprobado en animales de experimentación que el aceite de pescado (FO) tiene eficiencia como agente antiaterogénico (297-301). Esta protección a nivel general se basa en su capacidad para bajar el nivel de triglicéridos y aumentar los

niveles de HDL (302). Muchos experimentos se han basado principalmente en el efecto de los ácidos grasos polinsaturados (PUFA), los cuales son los principales componentes del aceite de pescado y en concreto el DHA (ácido decosahecanoico) y el EPA (ácido eicosapentanoico).

El efecto de la suplementación con aceite de pescado se ha comprobado que es evidentemente más eficaz en los estados iniciales de la aterosclerosis, con lo cual su efecto debe ir dirigido a las células que se activan de forma temprana en el proceso aterosclerótico: las SMC y células de la capa adventicia. Así el aceite de pescado parece capaz de actuar en los cambios que las SMC sufren en la media, ligados a una alteración de su fenotipo y a los procesos de proliferación, migración y apoptosis (303).

Una de las principales acciones del aceite de pescado parece consistir en la interferencia de este con los niveles de LDL-colesterol (304), ya que la acumulación de lípidos precede a la proliferación de las SMC en la íntima y que alteran el fenotipo de las SMC.

Esta acción parece estar restringida a la cantidad de colesterol y oxLDL presentes en el suero, así el aceite de pescado reduce significativamente la lesión aterosclerótica sólo si las concentraciones de colesterol no son muy altas (303, 304, 299).

El cambio fenotípico que produce el aceite de pescado en las SMC va en el sentido de aumentar la diferenciación a fenotipo similar al contráctil de las SMC que están manifestando un fenotipo sintético, este efecto es más evidente en la media. Esta modificación afecta a los índices de proliferación en la adventicia y en la media que disminuyen, pero no parece afectar a la distribución en la apoptosis. Es decir el número de SMC disminuye no por muerte sino porque dejan de proliferar (303).

Para intentar comprender estos efectos hay que analizar el efecto de los PUFA sobre los diferentes procesos celulares. Los PUFA, tienen muchos efectos a nivel metabólico y de expresión de genes, lo cual lo realizan al menos a través de cuatro familias de factores de transcripción (305): los receptores activadores de proliferación peroxisomales (PPAR), receptor X hepático (LXR), el factor nuclear-4 hepático, y las

proteínas de unión a elementos regulados por esteroides (SREBP). Entre las acciones que desencadenan podemos destacar:

- Regulación del metabolismo lipídico: los PUFA n-3 tienen un papel fundamental en la regulación del metabolismo lipídico a distintos niveles como oxidación de ácidos grasos, síntesis de triglicéridos, desaturasas de ácidos grasos, gluconeogénesis, citocromo p450, transporte de ácidos grasos, metabolismo y transporte del colesterol, cetogénesis.

Tanto los n-6 y los n-3 disminuyen la expresión de genes de enzimas lipogénicas (306). De hecho el aceite de pescado es uno de los más potentes inhibidores de la lipogénesis en hígado y un gran activador de la oxidación mitocondrial de ácidos grasos lo cual explica su acción antiaterogénica al bajar el nivel de triglicéridos y aumentar los niveles de HDL (302).

- Efecto sobre la capacidad antioxidante: la acción de los PUFA sobre el estrés oxidativo y la actividad de enzimas antioxidantes, esta mediado, al menos en parte, por cambios en la expresión génica. Existen grandes evidencias de que el aceite de pescado tiene una gran influencia sobre la expresión de genes antioxidantes y la producción de ROS. De hecho genes con actividad antioxidante aumentan su expresión unas cuatro veces con el aceite de pescado, mientras que la producción de ROS disminuye (307). Uno de los mecanismos de esta acción es evitar la activación del NF- κ B, que es un gen de respuesta a estrés como hemos visto.
- Efecto en la proliferación y la apoptosis: existen estudios en los que se muestra como DHA y otros PUFA n-3 son capaces de disminuir la expresión de genes reguladores del ciclo celular (306-308), y de aumentar la transcripción de caspasas, de p21 y p27 así como otros inhibidores de cdk (309).

Además los PUFA son capaces de disminuir la expresión de la óxido nítrico sintasa, INF, cGMP, y NF- κ β . DHA en cerebro es capaz de inhibir la apoptosis generada por staurosporina (310), aunque estos efectos parecen específicos para DHA, y no se han hecho estudios sobre el efecto global del aceite de pescado

OBJETIVOS

OBJETIVOS:

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, han dado lugar al desarrollo de un modelo celular de aterogénesis temprana. Dicho modelo está basado en el estudio a nivel molecular de los cambios experimentados en las células de músculo liso arteriales (SMC) tras una dieta rica en colesterol. El modelo *in vivo* / *in vitro* implica la alimentación de un grupo de pollos con una dieta control, (de los que se obtienen células SMC-C) y de otro grupo alimentados con una dieta enriquecida en colesterol, (de los que se obtienen células SMC-Ch). Las células SMC-C y SMC-Ch se cultivan en las mismas condiciones, de forma que los cambios debidos al mantenimiento de las células en cultivo quedan obviados al comparar los resultados de los experimentos entre los obtenidos en cultivos SMC-C y en SMC-Ch.

El objetivo global de la presente memoria de tesis doctoral fue investigar los cambios que produce una dieta de colesterol en el modelo celular SMC-C/SMC-Ch sobre diferentes parámetros de proliferación y apoptosis, y comprobar si estos cambios son reversibles al sustituir la dieta de colesterol por una dieta enriquecida en aceite de pescado (SMC-Ch-FO). Para ello nos propusimos los siguientes objetivos concretos:

- Estudios *in vivo*

Investigar los cambios que provoca una dieta de colesterol en las SMC sobre:

- 1.- Los índices de proliferación y apoptosis.
- 2.- La expresión de proteínas apoptóticas: Bcl-X_L, Bax y Bcl-2.
- 3.- La expresión génica de bcl-2, bcl-X_L, c-myc, p53 y caspasa-3.
- 4.- Conocer si estos cambios revierten al suprimir la dieta de colesterol y sustituirla por una dieta rica en aceite de pescado

- Estudios *in vitro*

Investigar los cambios que provocan sustancias presentes en una aterosclerosis temprana, como son el 25-hidroxicolesterol y óxido nítrico sobre:

- 5.- Los índices de apoptosis.
- 6.- La expresión de proteínas apoptóticas: Bcl-X_L, Bax y Bcl-2.
- 7.- La expresión génica de bcl-2, bcl-X_L, c-myc, p53 y caspasa-3.

MATERIAL Y MÉTODOS

E.- MATERIAL y MÉTODOS

E.1.- Material

E.1.1.- Material biológico

Se trabajó con animales machos de la especie *Gallus domesticus* raza *White Leghorn*. Los animales se alimentaron *ab libitum*, desde su nacimiento con un pienso compuesto A.00 de Sanders, con la siguiente composición:

Proteína bruta.....	20-25 %
Grasa bruta.....	5 %
Ceniza bruta.....	6 %
Celulosa bruta.....	4 %
Almidón.....	38 %
Calcio.....	1 %
Sodio.....	0,7 %
Lisina.....	1,25 %
Vitamina A.....	100000 UI / Kg
Vitamina D ₃	2000 UI / Kg
Vitamina E.....	20 mg / Kg

Se hicieron tres grupos de pollos, uno alimentado con dieta control, otro con dieta control suplementada con un 5 % de colesterol y otro alimentado con dieta de colesterol durante diez días y después sustituida por dieta suplementada con 10% de aceite de pescado durante diez días.

El aceite de pescado utilizado fue aceite de arenque (*menhaden oil*) suministrado por ICN Biomedical.

Las células de músculo liso, utilizadas en los experimentos, se extrajeron de las aortas de dichos animales, a los diez días del nacimiento. A los cultivos de SMC procedentes de animales alimentados con pienso control, se les denominó SMC-C, a los procedentes de animales alimentados con pienso suplementado con colesterol, se les

denominó SMC-Ch, y a los procedentes de animales alimentados primero con pienso suplementado con colesterol y luego suplementado con aceite de pescado, se les denominó SMC-Ch-FO. Los tres tipos de cultivo se mantuvieron de forma idéntica.

E.1.2.- Instrumentación

Centrifugación. Durante el desarrollo de los distintos métodos, se realizaron centrifugaciones en una Microfuga E de Beckman, una centrífuga Meditronic de Selecta.

Espectroscopía. Todas las determinaciones espectrofotométricas, tanto en el espectro visible como en el ultravioleta, se realizaron en un espectrofotómetro DU-70 de Beckman. Para la lectura de placas multipocillos de los experimentos de citotoxicidad y incorporación de BrdU, se usó un lector de placas ELx800 Universal Microplate Reader de Bio-Tek instruments.

Electroforesis y transferencias. Para la realización de electroforesis de ácidos nucleicos, se utilizó una fuente de alimentación P500B de Sigma y cubetas de electroforesis suministradas por Bio-Rad y para la electroforesis de proteínas se utilizó la cubeta del sistema de BioRad MiniProtean, para la transferencia de las proteínas se utilizó el mismo sistema de BioRad con la cubeta Transblot.

Termostatación. Los experimentos de RT se realizaron en un termociclador Progene de Techne. Para los experimentos de PCR a tiempo real se utilizó el termociclador *lightcycler* de Roche. Durante el desarrollo de los diversos métodos, para conseguir las distintas temperaturas (37-90 °C), se utilizó un bloque térmico de Selecta. La estufa utilizada en el mantenimiento de los cultivos fue una CO₂-Auto-Zero Heraeus, acoplada a una bombona de CO₂, suministrada por Air Liquid.

Agitación. Para la mezcla de los productos se utilizó un agitador automático de Selecta.

Esterilización. La esterilización del material sólido y de las soluciones se realizó en un autoclave de Selecta. Para aquellas soluciones no susceptibles de ser esterilizadas mediante calor (medio de cultivo y solución de tripsina), utilizamos filtros

de acetato de celulosa (0,2 μm de tamaño de poro), suministrados por Gelman y acoplados sobre un soporte de filtros Nalgene de capacidades de 250 y 500 ml.

Aparatos de medida auxiliar. Las pesadas de precisión se realizaron en una balanza Metler A6245. Los valores de pH requeridos en las diferentes disoluciones utilizadas, se ajustaron con un *phmetro* Crison Microph 2002. Para las medidas de pequeños volúmenes se utilizaron pipetas automáticas de Crison.

Microscopía. La observación de las células en cultivo, se realizó mediante un microscopio óptico invertido de contraste de fases, tipo Olympus CK2.

Análisis informático. Para la densitometría de imágenes digitalizadas, se utilizó el programa QuantisScan de Biosoft. Para el análisis matemático del contenido celular de DNA mediante citometría de flujo, se utilizó el programa LISYS II de Becton Dickinson.

Otros. El material de plástico estéril utilizado en el mantenimiento de los cultivos (pipetas, placas de petri, frascos de cultivo, etc.) se obtuvo de las casas comerciales Nunc y Sterilin.

La conservación de los diferentes reactivos y muestras biológicas se desarrolló en un frigorífico congelador Miele, en un ultracongelador (de $-89\text{ }^{\circ}\text{C}$) de Revco y en contenedores de nitrógeno líquido tipo MVE SC 20 / 20.

Los geles teñidos con bromuro de etidio se visualizaron mediante un transiluminador con una longitud de onda de 312 nm. Dichos geles se fotografiaron mediante un sistema Polaroid DS-34. Las fotografías se digitalizaron mediante un scanner Hewlett Packard 51000 C.

Para los estudios de medida del contenido celular de DNA, se utilizó un citómetro de flujo tipo Becton Dickinson FACS Vantage.

E.1.3.- Productos químicos

Las enzimas utilizadas en la elaboración de las soluciones enzimáticas para la disgregación de tisular fueron adquiridas de Sigma. Elastasa tipo II.A y colagenasa tipo II.A. La tripsina utilizada en el mantenimiento de los cultivos, fue suministrada por Sigma . El suero bovino fetal, usado en la preparación de los medios de cultivo, fue suministrado por Laboratorios FontLab. El medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modification of Eage'l's Medium), con glutamina y sin bicarbonato sódico, así como los antibióticos que formaron parte del medio de cultivo, fueron suministrados por Sigma.

Los diferentes disolventes orgánicos, sales utilizadas en la elaboración de las distintas soluciones, 25-hidroxicolesterol, nitroprusiato sódico, MTT, IP, RNAsa y los reactivos utilizados para la extracción de proteínas fueron suministrados por Sigma y Merck.

La cuantificación de proteínas se uso el kit de Bio-Rad DC "Protein assay".

Los anticuerpos usados en la inmunodetección fueron suministrados por Cell signalling, Santacruz y Transduction Laboratorios y el revelador quimioluminiscente fue proporcionado por Amersham Pharmacia.

El reactivo para la extracción del RNA fue TRIZOL suministrado por Gibco.

Para la retrotranscripción se usó la enzima PowerScript y los Oligo(dT) de Clontech. Y para la PCR a tiempo real se utilizó el Kit de Roche Fast Star DNA Master SYBR Green I.

Los kit de anexina fue suministrado por oncogene y el de incorporación de BrdU por Roche.

E.2.- Métodos

E.2.1.- Animales y dietas

Se utilizaron pollos machos de la especie *Gallus domesticus* raza White Leghorn. Los animales se alimentaron *ab libitum*, desde su nacimiento y se mantuvieron en una habitación con un periodo de luz de 9:00-21:00 y a una temperatura de 29-31°C.

Dependiendo del experimento se utilizaron hasta tres grupos de pollos, el grupo C (control) alimentado con una dieta estándar (A-00), el grupo Ch (colesterol) alimentado con dieta estándar suplementada con un 5% w/w de colesterol y el grupo Ch-FO (colesterol-aceite de pescado) alimentado durante 10 días con dieta estándar suplementada con un 5% w/w de colesterol y los siguientes 10 días con dieta estándar suplementada con un 10% v/w de aceite de pescado.

E.2.2.- Obtención de los cultivos de células de músculo liso

Las células de músculo liso (SMC) se obtuvieron a partir de explantes de aorta de pollo. A los diez o veinte días del nacimiento, dependiendo del experimento, los animales se sacrificaron mediante decapitación a primera hora de la mañana, e inmediatamente se extrajeron las aortas y se colocaron en una placa de petri con PBS (135 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10,2 mM Na₂HPO₄ y 1,7 mM KH₂PO₄ a pH 7,4), donde se abrieron y limpiaron de restos de sangre y tejido graso.

A continuación, las aortas se sometieron a un tratamiento con antibióticos (ampicilina 100 µ/ml y gentamicina 40 µg/ml en PBS), incubándolas 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavaron tres veces con PBS, se sometieron a una digestión con colagenasa (1 mg/ml en PBS) durante 20 minutos a 37 °C, se lavaron nuevamente con PBS, se cortaron en fragmentos de $\approx 1 \text{ mm}^2$ y se distribuyeron sobre en las placas de petri. Se dejaron 15 minutos para que los explantes se adhirieran a la placa,

se añadió 4 ml de medio de cultivo y se incubaron en una estufa humidificada, a 37 °C y con un atmósfera enriquecida en CO₂ (5 %).

A las 24 horas de incubación aparecen las primeras células de músculo liso procedentes de los explantes, que proliferan rápidamente y alcanzan la confluencia en las 96-120 horas posteriores. (311).

E.2.3.- Mantenimiento de los cultivos de células de músculo liso

Los cultivos se mantuvieron en placas de 60mm con 4 ml de medio de cultivo (DMEM, 10% FBS) cambiándose este antes de que su color se tornara amarillento (el rojo de bromofenol, incluido en el medio, cambia de color ante una acidificación del pH). Dicho viraje ocurría cada 24-72 horas, dependiendo de la confluencia y edad del cultivo.

Cuando las células del cultivo alcanzaron una confluencia del 80-90 %, se despegaron mediante tripsinización y se sembraron diluidas en nuevas placas. Para ello los cultivos se incubaron con 1 ml de solución de tripsina (0,02 % de EDTA y 0,05 % de tripsina en PBS) durante tres minutos a 37 °C. A continuación se golpeó suavemente la parte inferior de la placa (para ayudar a despegar las células), se añadió 8 ml de medio de cultivo para diluir la tripsina y la mezcla resultante se distribuyó en dos placas de petri nuevas, que se incubaron en la estufa a 37 °C. Aproximadamente una hora más tarde, las células viables se adhirieron a la superficie de la nueva placa, quedando las células muertas en suspensión, se eliminó la mezcla de medio de cultivo y tripsina, y se añadió 4 ml de medio de cultivo fresco.

Cada tripsinización o *pase* se realizó con una frecuencia que dependía de la capacidad proliferativa del cultivo, y varió entre dos (en los primeros cinco pases) y cinco días (en los últimos). Debido al proceso de senescencia acelerado que sufren las células en cultivo (312), su capacidad proliferativa disminuía progresivamente con el número de pases y con el sistema de cultivo utilizado, llegando a ser nula (alrededor de los quince pases).

E.2.4.- Tratamientos *in vitro*

Los tratamientos *in vitro* se realizaron por incubación de los cultivos SMC con 25-hidroxicolesterol o con nitroprusiato sódico:

1.- Tratamiento con 25-Hidroxicolesterol.

Este oxiesterol fue disuelto en etanol absoluto y diluido con el medio de cultivo para conseguir las concentraciones de trabajo (5-40µg/ml). La concentración final de etanol en el medio de cultivo nunca excedió el 0,8%, concentración a la cual el cultivo no se ve afectado.

2.- Nitroprusiato Sódico (SNP)

Este compuesto es un donador de óxido nítrico (NO). Se usó directamente diluido en medio de cultivo (0.1-1mM).

Tanto las incubaciones con 25-hidroxicolesterol como de SNP se realizaron con medio completo (10% FBS).

E.2.5.- Análisis de la proliferación celular en cultivos SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO

E.2.5.1.- Análisis del contenido celular de DNA, mediante citometría de flujo

El contenido celular de DNA se analizó con Ioduro de propidio siguiendo el método descrito por Hanon (313).

Las células se despegaron de la superficie de la placa mediante tripsinización y se sometieron a dos fijaciones sucesivas:

- 1- Con formaldehído al 0,1 % en PBS, durante 15 minutos a 4 °C.
- 2- Con etanol al 75 % en PBS, durante 12 horas a -20 °C.

La primera fijación con formaldehído tiene como misión la unión del DNA con el entorno, y la segunda fijación con etanol se encarga de preservar la integridad celular y de permitir la entrada del yoduro de propidio. La digestión con ribonucleasa durante la tinción evita el error provocado por la unión del yoduro de propidio al RNA.

A continuación las células fijadas se centrifugaron y el sedimento se resuspendió en una solución de tinción, compuesta por yoduro de propidio (5 µg/ml) y ribonucleasa (200 µg/ml) en PBS, durante 30 minutos a temperatura ambiente. La fluorescencia celular se midió en un citómetro de flujo. Las moléculas de yoduro de propidio emiten una fluorescencia con un máximo a 610 nm, cuando son excitadas a una longitud de onda de 540 nm. De esta forma se puede cuantificar la fluorescencia emitida por cada célula (Becton Dickinson FACS Vantage). Para el análisis matemático se utilizó el programa Lysis II, de la misma casa comercial. Esto nos permite clasificar las células en sus distintas fases (G_0/G_1 , S y G_2/M) del ciclo celular.

Los resultados finales se expresan en porcentajes de células con tres contenidos distintos de DNA:

- 1) Con un contenido $2n$ de DNA. Fase G_0/G_1 .
- 2) Con un contenido de DNA entre $2n$ y $4n$. Fase S.
- 3) Con un contenido $4n$ de DNA. Fase G_2/M .

E.2.5.2.- Medida de la Síntesis de DNA: incorporación de BrdU

La asociación entre la síntesis de DNA y la división celular hace que la medida de la síntesis de DNA sea una manera eficaz de medir la proliferación celular. Si se añaden precursores de DNA marcados 5-Bromo-2'-deoxiuridina al medio de cultivo, las células que se van a dividir van a incorporar este precursor en su DNA.

El 5-Bromo-2' deoxiuridina es un análogo de la timidina y se incorpora al DNA como lo haría la timidina. La detección de esta incorporación se realiza por inmunoensayo, usando anticuerpos monoclonales directamente sobre la BrdU.

E.2.5.2.1.- Incorporación de BrdU

Las células SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 25000 células/pocillo. Las células no se sincronizaron y por tanto se trabajó con cultivos asincrónicos cíclicos. La BrdU se incorporó utilizando el Kit Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimétrico) de Roche.

Las células mantuvieron durante 12h para que se adhirieran a la placa, después se procedió al ensayo de incorporación de BrdU. Para esto se hizo un marcaje continuo de la siguiente forma: se retiró el medio de cultivo y se lavaron las células con PBS, se añadió medio nuevo conteniendo la BrdU (10 μ M). Después de esto las células se recogieron para su procesamiento a las 2, 4, 6, 8, 10 h.

Además se colocó en un pocillo de la placa un blanco que no lleva células para darnos información sobre la unión inespecífica del anticuerpo a la placa. Este valor debe ser sustraído a los valores obtenidos para las muestras. Además, se realizó un control de ruido de fondo el cual no llevaba BrdU para darnos información de la unión inespecífica del anticuerpo a las células.

E.2.5.2.2.- Inmunoensayo

Las placas multipocillos se lavaron tres veces con PBS, a continuación se añadió una solución con una doble función: la fijación de las células y la desnaturalización del DNA con el fin de hacer accesibles los restos incorporados de BrdU, durante 30 min, a T.A. A continuación se incubó con el anticuerpo anti-BrdU-POD (conjugado con peroxidasa), diluido 1:100, durante 90 min. Tras el lavado se procedió al revelado de la placa. Se añadió el substrato de la POD, que en este caso es el ABTS 2,2'-Azino-Di-[3-

ethylbenzthiazoline sulfonate (6)], y tras 10 minutos aparece un color azulado. Para detener la reacción se añadió a cada pocillo H_2SO_4 y se espera un minuto en agitación.

La medida colorimétrica se llevó a cabo en un lector de ELISA a 450nm y con una longitud de onda de referencia de 690nm.

E.2.6. Detección de citotoxicidad y viabilidad celular

Se utilizó el colorante MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, sal de tetrazolio) como índice de la integridad de la membrana mitocondrial interna. Las deshidrogenasas mitocondriales transforman el MTT de color amarillo en un derivado del formazán insoluble de color violeta que absorbe a una longitud de onda de 570nm. La disminución en la formación de formazan se relaciona con la pérdida de viabilidad celular.

Las SMC se sembraron en placas de 96 pocillos a una densidad de 25000 células/pocillo. Se mantuvieron durante 12h para que se adhirieran a la placa, después se incubaron *in vitro* con los tratamientos anteriormente expuestos en las siguientes condiciones:

Para el 25- hidroxicolesterol se utilizaron concentraciones de 5, 10, 20, 40, 80 $\mu\text{g/ml}$, y el tiempo de incubación fue de 24 y 48h.

Para el SNP se utilizaron concentraciones de 0,3, 0,6, 1,2, 2,5 y 5 mM durante 8 y 24h.

El MTT se disolvió en medio completo a una concentración de 5mg/ml y se añadió a las células diluido 1/10. Tras 2h de incubación a 37°C con el compuesto, se retiró el medio de cultivo, se lavaron las células con PBS y los cristales de formazan se solubilizaron añadiendo 200 μl de isopropanol ácido (HCl 0,05N en isopropanol), tras 5 min. en agitación las placas se leyeron a una longitud de onda de 570nm y 630nm como referencia. La absorbancia total se cuantificó como Absorbancia a 570nm – Absorbancia a 630nm.

E.2.7.- Detección de Apoptosis

E.2.7.1.- Detección morfológica de apoptosis

Mediante microscopía óptica invertida se han realizado fotografías en las que se puede observar los cambios que sufren las células apoptóticas a nivel morfológico. Para ello las células SMC tanto para tratamientos *in vivo* (C, Ch y Ch-FO), como para los tratamientos *in vitro* (25-hidroxicolesterol y nitroprusiato), se cultivaron en placas petri de 60mm y se observaron con el microscopio invertido.

E.2.7.2.- Cuantificación de apoptosis mediante Anexina-V

Un paso crítico en el proceso de apoptosis es la adquisición de cambios en la superficie celular. Estos cambios implican: pérdida de restos de ácido sialico en las cadenas laterales de las glicoproteínas, emergencia de nuevas glicoproteínas como la trombospondina; pérdida de la asimetría de membrana, lo cual altera tanto la hidrofobicidad como la carga de la superficie celular.

En las células normales la distribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática es asimétrica, la membrana interna contiene fosfolípidos aniónicos como fosfatidilserina (PS), y la externa fundamentalmente fosfolípidos neutros. En una célula apoptótica se produce una traslocación de los restos de PS de membrana interna a membrana externa, exponiendo de esta manera los restos PS al exterior. Esto ocurre en las primeras etapas, en la fase de apoptosis temprana, donde se mantiene la integridad de la membrana plasmática.

La Anexina-V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio, la cual tiene una gran afinidad de unión a los restos PS. Por tanto la anexina puede unirse a los restos PS de las células apoptóticas al ser estos accesibles por estar en el exterior. De esta manera se puede discriminar entre células apoptóticas y células normales.

Para detectar la apoptosis hemos usado el Kit de detección de apoptosis (Oncogene), en el cual la anexina-V está conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) pudiendo detectar esta fluorescencia citometría de flujo.

Para el experimento se utilizaron células SMC en tercer pase, tanto procedentes de los tratamientos *in vivo* (SMC-C, Ch y Ch-FO), como las tratadas *in vitro* (25-Hidroxicolesterol, y nitroprusiato sódico), tal y como se ha descrito anteriormente. Realizándose duplicados para cada tipo de cultivo.

Se recogió en un tubo el medio de cultivo de cada placa (este medio contiene células que se han despegado de la placa durante el proceso de muerte celular). Las células adheridas se lavaron con PBS y se tripsinizaron. En este momento se juntaron con las del medio de cultivo y se resuspendieron en tampón de unión (10mM Hepes, pH 7.4, 150mM NaCl, 2.5 CaCl₂, 1mM MgCl₂, 4%BSA) hasta una densidad celular de 1x10⁶ células /ml. A continuación se añadió la anexina-V-FITC (0.5 µg/ml), se incubó durante 15 min. en oscuridad. Tras sedimentar las células se resuspendieron de nuevo en tampón de unión y se añadió el IP (0.6 µg/ml) a 4°C.

Dado que la membrana de las células necróticas se permeabiliza, estas pueden unir también anexina, para distinguir las de las apoptóticas se utiliza un colorante de unión a DNA, el Ioduro de propidio (IP). Sólo las células con la membrana permeabilizada (necróticas) podrán tomar este fluorocromo. Hay que hacer notar en este punto que cuando las células en cultivo sufren apoptosis, al no poder ser fagocitadas, sufren una necrosis secundaria al proceso apoptótico, por lo tanto pueden incrementar el número de células que dan positivo en IP.

De esta manera distinguimos:

- Células viables: no unen anexina y excluyen IP
- Células en apoptosis temprana: unen anexina y excluyen IP
- Células en apoptosis tardía: unen anexina e incorporan IP
- Células necróticas: unen anexina e incorporan IP, o sólo incorporan IP.

E.2.7.2.1.- Análisis de las muestras mediante citometría de flujo

La emisión de luz de excitación se realizó a 488nm con un láser de argón. La señal del FITC (fluorescencia verde) se detectó a 518nm y el log de esta fluorescencia se representó en el eje X. La señal del IP (fluorescencia roja) se detectó a 620nm y el log de esta se representó en el eje Y.

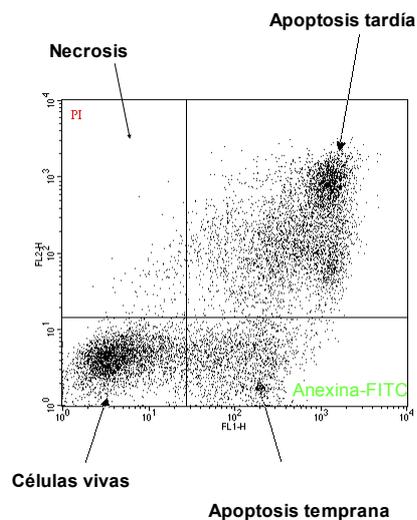


Figura 1.- representación de un análisis por citometría de flujo con células marcadas con yoduro de propidio (IP) y anexina-FITC

De esta forma el histograma que se obtiene se puede dividir en cuatro cuadrantes: En el cuadrante inferior izquierdo aparecen las células viables, en el inferior derecho aparecen las células en apoptosis temprana, en el superior derecho apoptosis tardía y en el superior izquierdo necrosis.

E.2.8.- Análisis de proteínas mediante Western-Blot

E.2.8.1.- Extracción de proteínas

Para la extracción de proteínas las células se despegaron con un rascador de plástico en una solución de PBS. Unas 10^7 células se sedimentaron mediante

centrifugación y se resuspendieron en tampón RIPA para su lisis (1x PBS, 1% Nonidet P-40, 0.5% Deoxicolato sódico, 0.1% SDS) al cual se le adicionó inhibidores de proteasas de forma extemporánea (PMSF 0.1mg/ml, Aprotinin, Ortovanadato sódico 0.18mg/ml), se incubaron en hielo durante 30 min y se pasaron unas 5-10 veces por jeringas con agujas de 21g, para conseguir una ruptura total de la célula. Se incubaron 30 min más en frío, tiempo tras el cual se centrifugaron durante 15 min. a 13000 g. a 4°C en microfuga para sedimentar los restos celulares. El sobrenadante se recogió en dos tubos uno para cuantificar la concentración de proteínas y otro para realizar la electroforesis.

La concentración de proteínas se determinó usando el Kit de BioRad DC “Protein Assay”. El cual está indicado para muestras que contienen detergentes.

E.2.8.2.- Electroforesis y transferencia de proteínas

Alícuotas de 70 µg de proteínas fueron desnaturalizadas hirviéndolas en presencia de β-Mercaptoetanol y separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12% en tampón Tris-Glicina. La electroforesis se resolvió a 200V durante 45min con el sistema “mini-protean” de BioRad.

Finalizada la electroforesis, los geles se equilibraron para su posterior transferencia a una membrana de PVDF, mediante transferencia húmeda con el sistema mini-transblot de BioRad en tampón de transferencia Tris-Glicina-Metanol (48mM Tris, 30mM glicina, 20% metanol, pH 9.2). La transferencia se realizó a 30V toda la noche en cámara fría y con agitación.

E.2.8.3.- Inmunodetección

Para la inmunodetección se bloquearon las membranas en bloto (5% leche en polvo, 0.05% Tween-20 en TBS o PBS pH 7.4) y se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios: anti-Bcl-X_L (Cell signalling) en una dilución 1:1000, anti-Bax 1:100 (Santacruz), anti-Bcl2 1:500 (Transduction Laboratorios). La detección se realizó mediante el sistema de quimioluminiscencia ECL con el kit de Amersham Pharmacia

“ECLTM Western Blotting Deteccion Reagents” y la impresión se realizó en papel fotográfico de la misma casa comercial.

La película fotográfica, expuesta a quimioluminiscencia, se reveló en una cámara oscura, bañándola durante cinco minutos en líquido revelador (dilución 1/10), durante un minuto en líquido de lavado (ácido acético al 5 %) y finalmente durante cinco minutos en líquido fijador (dilución 1/8).

La imagen resultante se digitalizó y el análisis de los resultados se realizó mediante densitometría con el programa *quantiscan* (suministrado por Biosoft).

E.2.9.- Extracción y cuantificación de RNA

El aislamiento de RNA total, se realizó con TRIZOL (Gibco), según el método de aislamiento de RNA en un solo paso desarrollado por Chomczynski, el cual utiliza la mezcla de isotiocianato de guanidina: fenol (314). El Trizol produce la ruptura de las células al disolver lípidos y precipitar proteínas preservando la integridad del RNA. La adición de cloroformo seguida de una centrifugación permite separar una fase acuosa y otra orgánica. El RNA permanece en la fase acuosa, el cual es precipitado con isopropanol.

Para la extracción de RNA se usaron unas 6×10^6 células que se lisaron en la misma placa y se procedió a la extracción como se ha descrito.

El RNA se cuantificó midiendo la absorbancia a 260 nm y suponiendo un coeficiente de extinción molar de $0,022 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. La pureza de la muestra se estimó por la relación A_{260}/A_{280} . Considerando que una solución pura de RNA tiene una relación A_{260}/A_{280} de 2 ± 0.05 (315).

E.2.9.1.- Electroforesis de RNA

Para comprobar la integridad del RNA se realizó una separación mediante electroforesis desnaturalizante en gel de agarosa. Debido a las fuertes estructuras

secundarias que poseen las moléculas de RNA, es necesario realizar una desnaturalización del RNA, para separar las moléculas únicamente por tamaño.

Antes de la electroforesis, el RNA se desnaturalizó añadiendo, a una cantidad de RNA entre 10 y 15 µg, 10 µl de formamida y 2,5 µl de formaldehído al 37 % llevándolo a un volumen final de 20 µl y calentando a 55 °C durante 15 minutos (316).

La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1 % en tampón MOPS 0,5x con un 3,5 % de formaldehído.

E.2.10.- Síntesis de cDNA

La retrotranscripción del mRNA se realizó con la retrotranscriptasa PowerScript™ (Clontech) en un volumen de 20 µl. En primer lugar se incubaron 4µg de RNA total con un cebador de Oligo(dT)₁₂₋₁₈ (500ng) el cual hibrida con la cola Poli-A del mRNA, a una temperatura de 70°C (tª de hibridación del cebador) durante 10 minutos. Posteriormente se añadieron los reactivos para la retrotranscripción cuyas concentraciones fueron: 1x de tampón de reacción RT (Suministrado por Clontech), dNTPs (1mM), DTT (10mM) PowerScript™-RT (0,125 U/µl). La reacción se realizó en un termociclador durante 90 minutos a 42 °C, tras este tiempo la enzima se inactivo calentando la mezcla de reacción a 70°C durante 15 minutos

E.2.11.- PCR a tiempo-real

La PCR a tiempo real se llevó a cabo mediante el aparato *LightCycler* (Roche), y utilizando el kit Fast Start DNA Master SYBR Green I de Roche.

El SYBR Green es un colorante que se une al DNA de doble cadena por el surco menor del dsDNA incrementando su fluorescencia unas cien veces. En el aparato *lightcycler* esta fluorescencia se monitoriza en el canal F1. La ventaja de usar SYBR Green es que se une a cualquier dsDNA por tanto no necesita optimización como ocurre cuando se usan sondas marcadas. La desventaja se basa también en esa razón ya que se

puede unir tanto a productos específicos, inespecíficos y dímeros de cebadores. La técnica *HotStart* y otras estrategias ayudan a reducir la formación de dímeros. Además el sistema *lightcycler* permite, mediante las curvas de fusión, eliminar el efecto que esta fluorescencia provocaría en la cuantificación. La estrategia consiste en que una vez analizada la T_m del producto específico y de los dímeros de “primer”, el programa nos permite tomar la medida de fluorescencia alrededor de la T_m de los dímeros y siempre por debajo de la T_m del producto.

La mezcla de reacción se preparó de la siguiente forma: 12.6µl de agua, 2.4µl MgCl₂ (4mM), 1µl de cebador sentido (0.5µM), 1µl de cebador antisentido (0.5µM), y 2µl (1x) de la mezcla Fast Start DNA Master SYBR Green I de Roche la cual contiene dNTP, la polimerasa Fast Start y el fluorocromo SYBR Green. Estos 19 µl de mezcla de reacción se pusieron en los capilares del *Lightcycler* y se añadió 1µl de cDNA (la concentración de este cDNA fue distinta según fuese para realizar cálculos de eficiencia de amplificación o bien cuantificación). Se cerraron los capilares, se centrifugaron y se pusieron en el rotor del *LightCycler*. Los cebadores usados son específicos para las secuencias de pollo. La temperatura de hibridación de todos los cebadores usados se ajustó a 55°C con un termociclador clásico, las secuencias se muestran en la siguiente tabla:

Gen	Cebador sentido	Cebador antisentido	Tamaño amplificado
B-actina	GCTCCGGCAATGTGCAA	AGGATCTTCATGAGGTAGT	515
bcl-2	TACCTGCTTACACTTAGGAAGG	ATGACTATGATGCGATGGCACG	307
bcl-X _L	GGAGGAAGAGGATGAGAACAGG	ATCTCCTTGTCCACG	383
c-myc	AGCGAACGAGTCTGAATCCAGC	TTCAACTGTTCTCTCTCCTCCGCC	476
P53	ATGTGCAACAGTTCCTGCAT	AGTTCTCCTCCTCGATCTTG	160
caspasa-3	TTAGATTCTGGTATTGAAGC	GAAATCCTGTGCGAGTGGAGCAGG	269

El programa de amplificación con los tiempos y las temperaturas se exponen en la siguiente tabla:

Programa: Preincubación			Ciclos:1
Segmento	Temperatura °C	Tiempo (sec)	Proporción de calentamiento
1	95	600	20

Programa: Amplificación			Ciclos:40
Segmento	Temperatura °C	Tiempo (sec)	Proporción de calentamiento
1- desnaturalización	94	5	20
2.-hibridación de cebadores	55	8	20
3.- elongación	72	20	20
4. adquisición de fluorescencia	82	3	20

Para determinar la especificidad de los cebadores y el producto amplificado se realizó en primer lugar una curva de fusión con el sistema *lightcycler* con las siguientes características:

Programa: Curva de fusión			Ciclos: 1
Segmento	Temperatura °C	Tiempo (sec)	Proporción de calentamiento
1	95	0	20
2.	45	10	20
3. adquisición de fluorescencia	95	0	0.1

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa. Para esto se abrieron los capilares se pusieron bocabajo en tubos de 2ml y se centrifugaron a bajas revoluciones para que cayera el contenido, una alícuota de 10 µl se separó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2 %. A continuación el gel se tiñó en un baño con 0,75 µg/ml de BrEt durante 5 min. y se visualizaron los productos comprobando su peso molecular.

E.2.11.1.- Curvas de eficiencia y linealidad

En una amplificación ideal, la población de moléculas de DNA se duplica en cada ciclo.

Según:

$$N_n = N_0 \cdot 2^n . \quad (\text{Ecuación 1})$$

Donde:

N_0 , es la cantidad inicial de moléculas a amplificar.

N_n , cantidad de producto en el ciclo n .

n , es el número de ciclos.

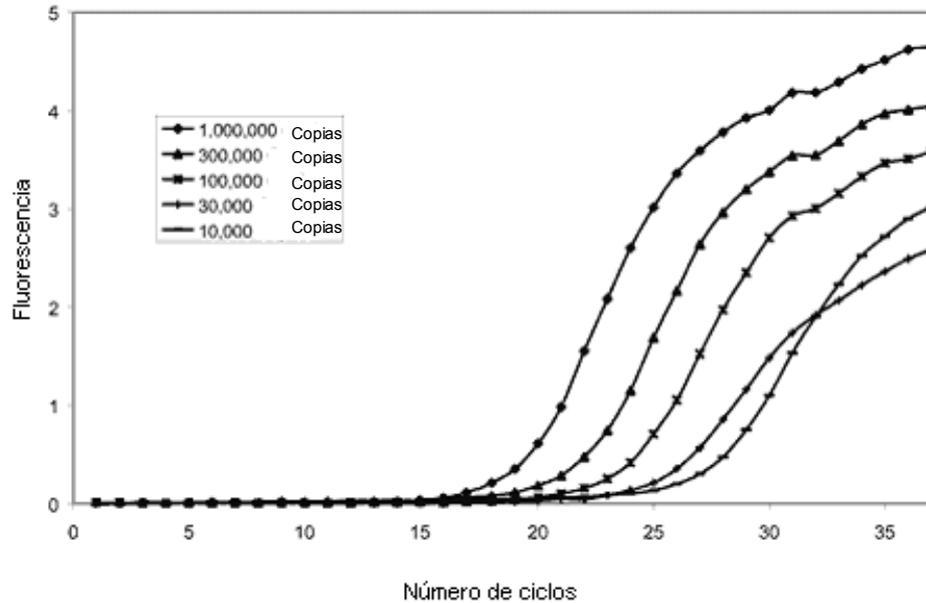
En condiciones reales, la amplificación en cada ciclo no duplica completamente la cantidad previa de DNA. Se introduce el concepto de eficiencia (E), que es la fracción de moléculas de DNA que es duplicada por ciclo (317, 318, 319).

Una cuantificación típica tiene tres fases (fig.2): una fase temprana de ruido de fondo, una fase exponencial (o logarítmica), y una fase de meseta (plateau). La fase de ruido dura hasta que la señal de fluorescencia del producto de PCR es mayor que la fluorescencia propia del sistema. Por tanto la fase exponencial comienza cuando hay suficiente producto acumulado como para ser detectado claramente por encima del ruido, y al final cae la eficiencia de la reacción y se entra en la fase de meseta.

Durante la fase exponencial el curso de la reacción se describe como:

$$N_n = N_0 \cdot E^n \quad (\text{ecuación 2})$$

Donde E oscila entre dos (amplificación ideal) y uno (amplificación nula).



La figura 2 representa una curva típica de PCR (amplificación frente a número de ciclos), que puede dividirse en: **1)** Fase de crecimiento exponencial donde E. en la mayoría de los casos se encuentra entre 1,78 y 1,97 (318, 319). **2)** Fase meseta, donde E es nulo y la amplificación alcanza el máximo.

Según la figura es fácil observar que cada reacción logra subir por encima del ruido dependiendo de la cantidad de moléculas iniciales presentes en la muestra, pero realmente son muy pocos los ciclos durante los cuales la curva es estrictamente exponencial, ya que en los primeros ciclos domina el ruido y en los últimos la fase meseta.

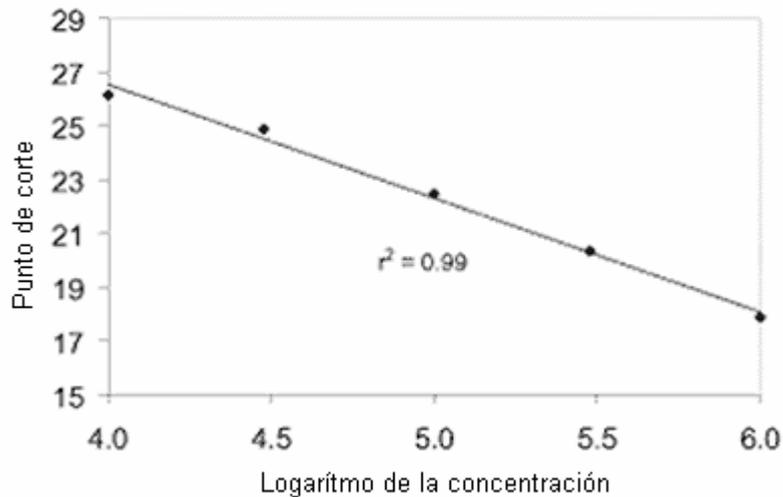


Figura 3: Ejemplo de curva de eficiencia construida con los datos de la fig.1. La pendiente de la recta es $-1/\log$, la eficiencia en este caso es de 1.73. La intersección es el log de la cantidad de DNA en el umbral dividido por el log de la eficiencia.

Por tanto el análisis debe realizarse en la fase lineal durante la cual la E es constante, y monitorizando la PCR a tiempo real nos permite trabajar en esta zona.

Para llevar a cabo la cuantificación es fundamental el cálculo de la eficiencia de amplificación para, esto se realizan curvas de calibrado o curvas de eficiencia (fig.3). El cálculo sigue el siguiente razonamiento matemático:

Por homología la cinética de una reacción a tiempo real en el sistema *lightcycler* se puede describir como:

$$K = N_0 * E^{C_p} \quad (\text{ecuación 3})$$

Donde:

C_p , es el punto en el cual la fluorescencia crece significativamente por encima de la fluorescencia por ruido de fondo, realmente, representa el punto en la curva de amplificación, que siempre presenta la misma cantidad de producto en cada curva que uno represente.

K, Representa la cantidad de producto de PCR presente en el C_p

No, es la concentración inicial de la muestra.

E, es la eficiencia de la reacción

La ecuación 3 se puede linearizar como:

$$\log K = \log N_0 + C_p \cdot \log E \quad (\text{Ecuación 4})$$

El No está bajo el control del operador, por tanto representa la X, y Cp es lo que podemos medir, por tanto será la Y. Es decir:

$$C_p = -(1/\log E) \cdot \log T_0 + (\log K/\log E) \quad (\text{Ecuación 5})$$

Por tanto la pendiente de la recta representa:

$$\begin{aligned} \text{Pendiente} &= -(1/\log E) \\ \mathbf{E} &= \mathbf{10}^{-\mathbf{(1/pendiente)}} \quad (\text{Ecuación 6}) \end{aligned}$$

Para calcular la pendiente de la curva basta con hacer diluciones seriadas del gen en cuestión, las curvas de amplificación deben tener la misma pendiente y el rango en el cual esto se mantiene nos dará la linealidad de la reacción. La concentración actual de cada una es por tanto irrelevante para calcular la pendiente.

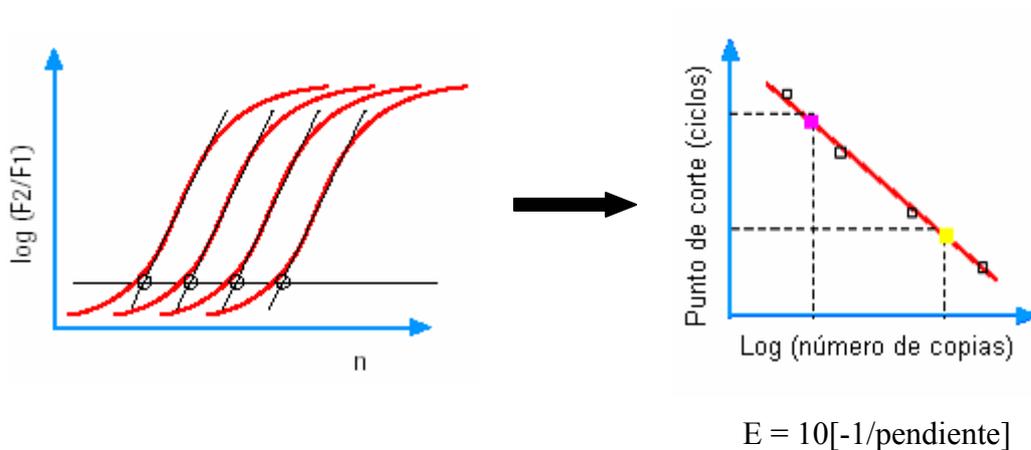


Figura 4.- Transformación para el cálculo de la pendiente definida por la recta que resulta de representar los Cp frente al log del número de copias.

Para realizar las curvas de eficiencia de nuestro experimento de cuantificación se realizaron las siguientes diluciones del cDNA en todos los genes (actina, bcl-2, bcl-X_L, c-myc, p53, caspasa-3): 1.- $2.5 \cdot 10^{-1}$; 2.- $5.0 \cdot 10^{-2}$; 3.- $1 \cdot 10^{-2}$; 4.- $2 \cdot 10^{-3}$; 5.- $4 \cdot 10^{-4}$; 6.- $8 \cdot 10^{-5}$

Se procedió a la amplificación según el protocolo expuesto anteriormente y se calculó la pendiente de cada gen según el software del *lightcycler*.

Una vez calculada la pendiente se estimó la eficiencia de amplificación mediante la ecuación 6.

E.2.11.2.- Cuantificación

El método de cuantificación que se ha usado se basa en la **cuantificación relativa** de un gen problema **respecto a un gen de referencia**. Para esto se ha empleado el método matemático de análisis de datos descrito por Michael W. Pfaffl (320). Mediante este método se calcula la proporción de expresión relativa basado en las eficiencias de amplificación por PCR y en las variaciones del punto de corte (CP) de los genes problema. No se necesita por tanto adicionar construcciones artificiales de ácidos nucleicos ni curvas de calibrado internas.

El Cp se ha definido anteriormente como el punto en el cual la fluorescencia crece significativamente por encima de la fluorescencia por ruido de fondo. Existe una relación lineal entre el CP y el log del número inicial de moléculas en la muestra (Ecuación 5). La cuantificación debe de llevarse a cabo siempre durante la fase exponencial de amplificación, durante la cual la reacción no está afectada por ningún factor limitante.

Este Cp será dado por el programa asociado al *Lightcycler*. Este punto puede ser calculado mediante dos ajustes, que son por maximización de la segunda derivada y el del punto de ajuste (fit point), que es el aconsejable en este modelo.

La razón por la cual el método de punto de ajuste es más adecuado se debe a que en este la fluorescencia en la línea umbral y por tanto la cantidad de DNA, es igual para

todas las muestras mientras que lo que varía es en qué ciclo la adquieren, mientras que en el método de la maximización de la segunda derivada la cuantificación se realiza en el punto de cada curva en el cual la eficiencia es mayor, es decir donde la segunda derivada de la curva tiene un máximo.

Según la definición de C_p el problema evidente que se presenta es definir el ruido de fondo, ya que varía de muestra a muestra. El método de punto de ajuste permite al operador definir una banda de ruido común para las muestras, por debajo de esta todo es ruido, y además excluye los valores de la fase de meseta calculando los puntos lineales de la fase exponencial y trazando por extrapolación una recta definida por estos puntos lineales (puntos de ajuste). Además se define la línea umbral, la cual estará en la zona lineal común para todas las curvas. El sistema *Lightcycler* la estima y optimiza de forma automática. La intersección entre la línea extrapolada de la fase exponencial y la línea umbral nos dará el C_p .

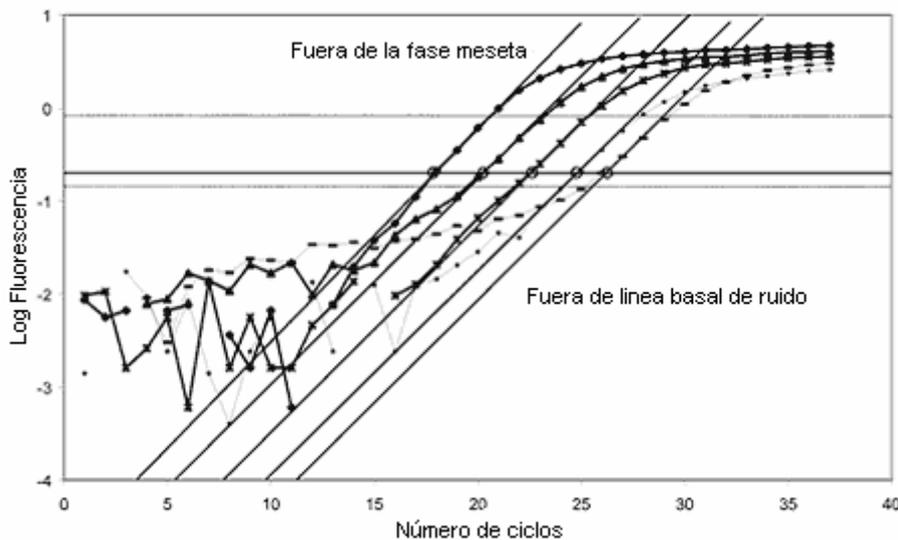


Figura 5.- Representación del método de punto de ajuste. Aparecen definidos la banda de ruido, por debajo de esta todo es ruido, la fase de meseta, el calculando de puntos lineales de la fase exponencial y la recta definida por los puntos lineales (puntos de ajuste).

El número de puntos ajustes (fit), es decir el número de puntos en la recta lineal-logarítmica, varía de curva a curva, lo normal es de dos a cuatro, pero es conveniente elegir el menor número ya que coger un solo punto de la fase meseta tiene consecuencias negativas, mientras que excluirlo no.

Si se observa, la posición de la banda de ruido no importa demasiado ya que no interfiere en la pendiente de la recta lineal-logarítmica, y por tanto en el punto de corte. Lo mismo ocurre con la línea umbral, variará la intersección en Y pero tendrá la misma pendiente.

En los métodos establecidos para el cálculo de expresión relativa el gen problema se normaliza respecto a la expresión de un gen endógeno no regulado (gen de referencia), como puede ser un gen estructural, y por tanto su nivel de expresión será estable. En concreto para estos experimentos se ha elegido la actina. Esto se hace con el fin de compensar las variaciones entre las PCR de distintos tubos y experimentos. En una situación ideal el ΔCP para el gen de referencia sería 0.

Mediante este modelo matemático se añade un nivel más de control ya que la normalización que se propone permite estandarizar la reacción respecto a la integridad del RNA, la eficiencia de la RT o las variaciones en la cantidad de cDNA que se ponen en cada tubo.

De esta forma en este modelo la expresión relativa del gen problema se calcula como:

$$\text{Expresión relativa} = \frac{(E_{\text{problema}})^{\Delta CP_{\text{problema}}(\text{control}-\text{muestra})}}{(E_{\text{actina}})^{\Delta CP_{\text{actina}}(\text{control}-\text{muestra})}} \quad \text{(Ecuación 7)}$$

Para este cálculo debemos conocer por tanto el incremento de los CP, para lo cual se utiliza la media de los valores de CP obtenidos en cada experimento para cada transcrito y los valores de eficiencia de amplificación de cada gen de la forma expuesta anteriormente.

Los cDNA de los genes a estudiar (actina, bcl-2, bcl-X_L, c-myc, p53, caspasa-3), de las distintas muestras: tratados *in vivo* e *in vitro*, se diluyeron previamente 1/100, teniendo en cuenta los datos obtenidos para la linealidad en las curvas de eficiencia. Se

amplificaron según el protocolo expuesto anteriormente, obteniéndose así los resultados de C_p para cada muestra y gen.

E.2.11.3.- Variabilidad y reproducibilidad

Para confirmar la precisión y reproducibilidad de la PCR a tiempo real, las variaciones se determinaron mediante duplicados en el mismo ensayo, y tres repeticiones del mismo ensayo, tanto para las curvas de eficiencia como para la cuantificación en sí. Además, en cada uno de los ensayos de cuantificación se introdujeron muestras de las usadas en las curvas de eficiencia con el fin de comprobar la reproducibilidad en cada caso. De este modo para cada una de las 54 muestras de la cuantificación se obtuvieron 6 valores de C_p . La expresión relativa se calculó para cada ensayo y se hizo una media para los tres resultados obtenidos en cada uno de los experimentos.

RESULTADOS

F.- ANÁLISIS DE LA PROLIFERACIÓN CELULAR EN CULTIVOS SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO

F.1.- Análisis del contenido celular de DNA mediante Citometría de Flujo

Se ha realizado un estudio sobre el contenido celular de DNA en los cultivos de SMC, con el propósito de aportar datos a la caracterización tanto de los cultivos procedentes de animales controles como hipercolesterolémicos, como de los alimentados primero con colesterol y luego con aceite de pescado.

Mediante citometría de flujo puede analizarse la cantidad de DNA de cada una de las células de una población. En aquellas poblaciones celulares en crecimiento, puede establecerse una relación entre el contenido relativo de DNA de cada célula y la fase del ciclo celular en la que se encuentra. De esta forma puede obtenerse información sobre la capacidad proliferativa de una población celular.

Se clasificaron las células en tres grupos:

- 1) Células con una cantidad $2n$ de DNA, que en una población en crecimiento coincidiría con las situadas en las fases G0 y G1 del ciclo celular.
- 2) Células con una cantidad entre $2n$ y $4n$ de DNA, que en una población en crecimiento coincidiría con las situadas en la fase S del ciclo celular, de células que se encuentran replicando el DNA.
- 3) Células con una cantidad $4n$ de DNA, que en una población en crecimiento coincidiría con las situadas en las fases G2 y M del ciclo celular.

Hay que tener en cuenta que, el análisis citométrico del contenido celular de DNA por sí solo no refleja de manera precisa la capacidad proliferativa de una población de células, por lo que sus datos deben de ser contrastados con los de otras metodologías (curvas de crecimiento, síntesis de DNA, expresión de genes, etc.). Previamente en

nuestro laboratorio se realizaron estudios sobre proliferación celular en SMC-C y SMC-Ch, por medio de curvas de crecimiento y síntesis de DNA, estableciendo diferencias entre ambos cultivos.

Se analizaron los cultivos SMC-C, SMC-Ch, y SMC-Ch-FO en tercer pase por citometría de flujo. En las figuras 1, 2 y 3 se representan los histogramas del contenido celular de DNA en los tres tipos de cultivo, mientras que en las figuras y tablas 4, 5, 6, 7, 8 y 9 se representan el contenido celular de DNA en grupos 2n, intermedio y 4n respectivamente, en función al número de horas de cultivo. Todas las medidas se realizaron sobre cultivos con un índice de confluencia del 50-60 % (fase de crecimiento celular).

Debido a la dificultad para sincronizar estas células por métodos clásicos (321), el análisis se realizó con células asincrónicas, las cuales muestran, como es de esperar, un perfil de proliferación cíclico. Para minimizar diferencias entre los tres tipos de cultivos, la primera medida se tomo a las 12h, tiempo para que las células se adhieran a la placa y comiencen su primer ciclo de proliferación.

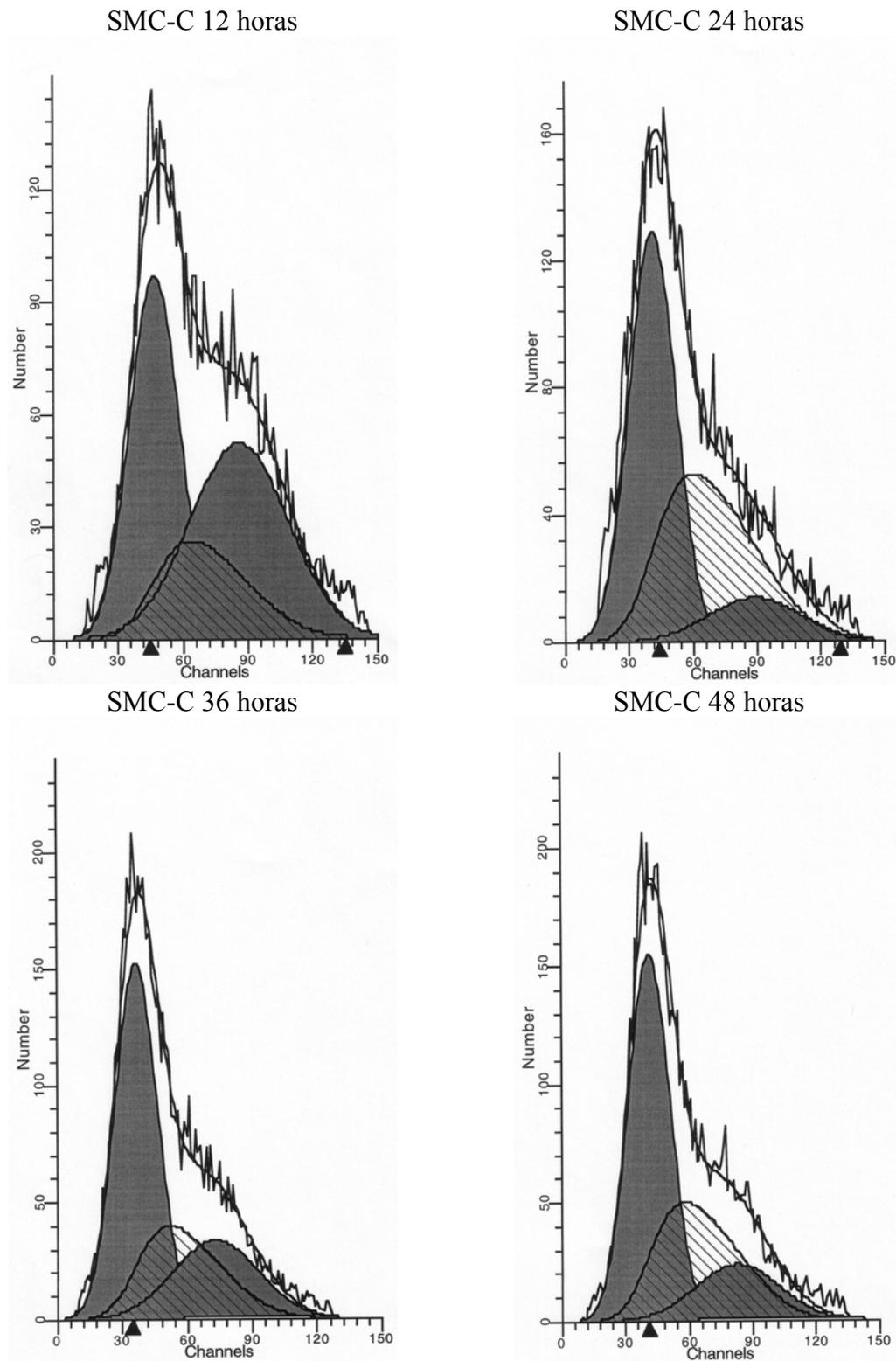


Figura 1. Histogramas de DNA analizado por citometría de flujo para las SMC-C en tercer pase, durante 12, 24, 36 y 48 h. Las células se sembraron y tras esperar 12h se tiñeron con IP y se analizaron por citometría de flujo en los tiempos señalados.

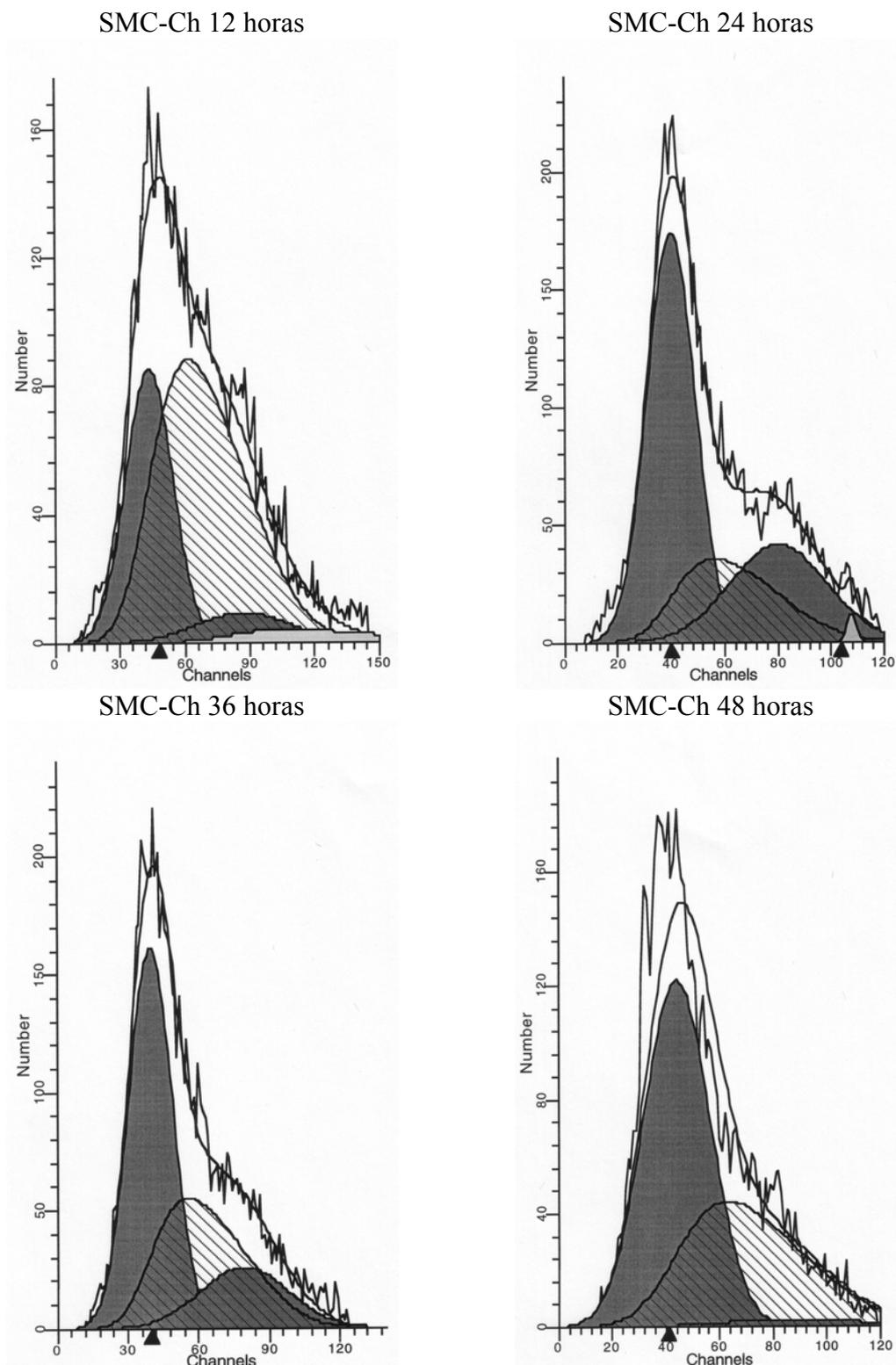


Figura 2. Histogramas de DNA analizado por citometría de flujo para las SMC-Ch en tercer pase, durante 12, 24, 36 y 48 h. Las células se sembraron y tras esperar 12h se tiñeron con IP y se analizaron por citometría de flujo en los tiempos señalados.

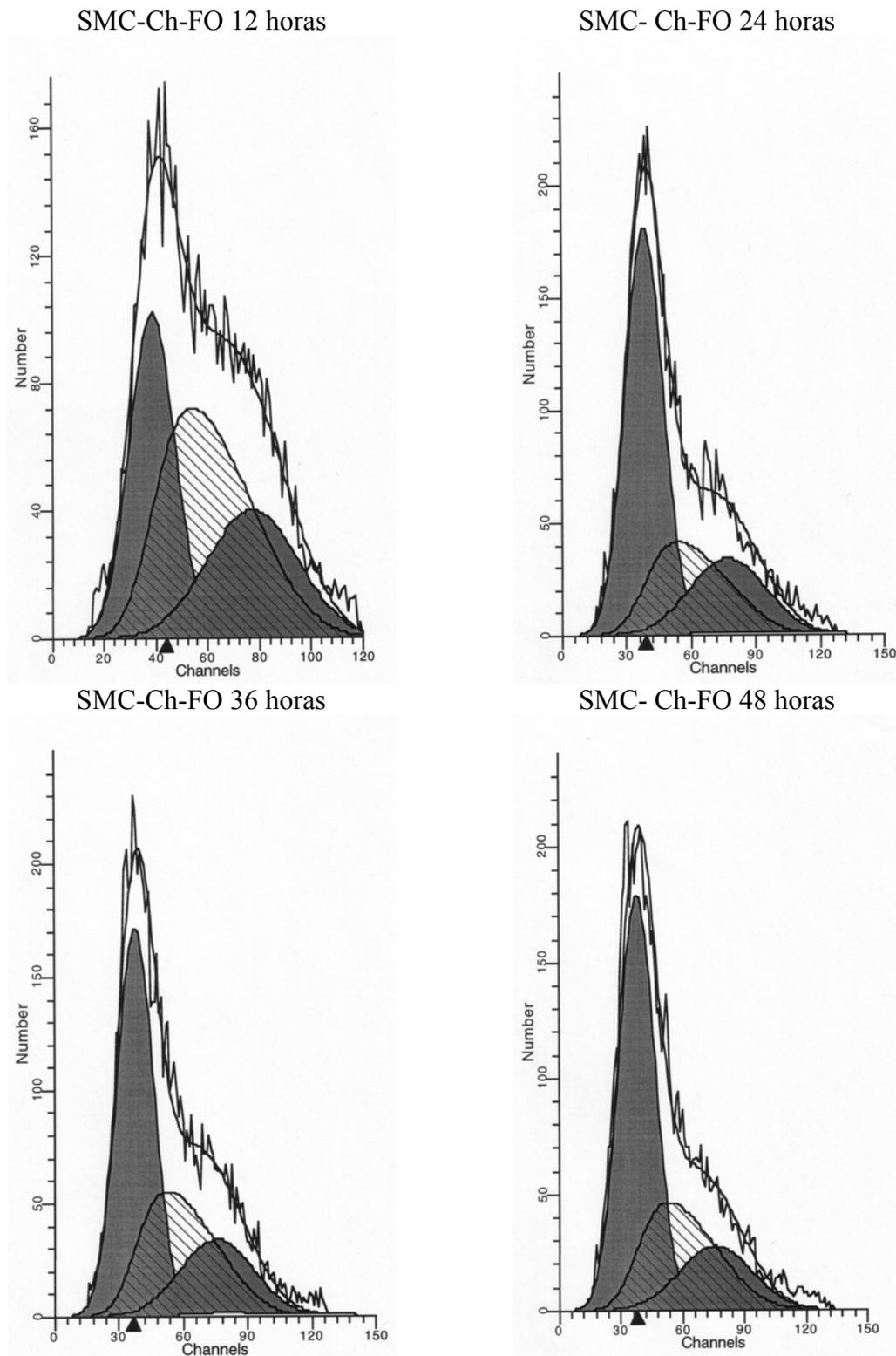


Figura 3. Histogramas de DNA analizado por citometría de flujo para las SMC-Ch-FO en tercer pase, durante 12, 24, 36 y 48 h. Las células se sembraron y tras esperar 12h se tiñeron con IP y se analizaron por citometría de flujo en los tiempos señalados.

F.1.1.- Porcentaje de células SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO en fase G0/G1

El contenido en DNA de 2n, correspondiente a células que se encuentran en fase G0/G1, es decir, de quiescencia o no proliferativa (figura 4, tabla 1), va incrementándose conforme aumentan las horas en cultivo, en especial cuando pasan de 12h a 24h, sin grandes diferencias entre los distintos cultivos.

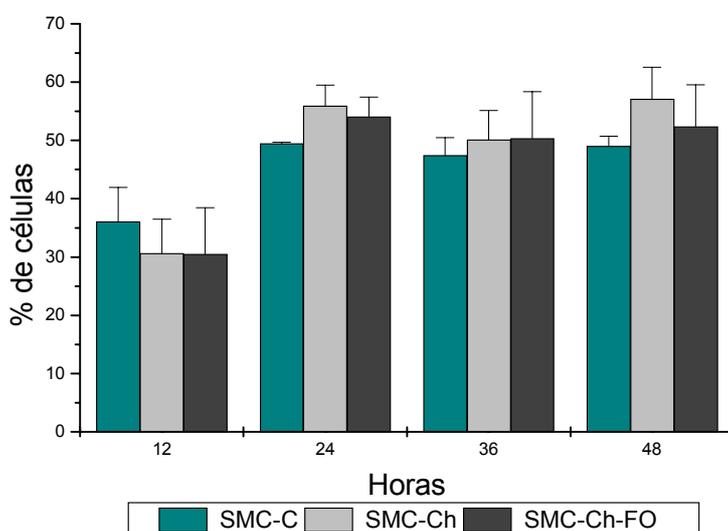


Figura 4. Porcentaje de células con un contenido relativo de DNA de 2n (fase G0-G1), durante 48 horas en cultivo, con células en tercer pase. Datos obtenidos de los histogramas de DNA de las figuras 1, 2 y 3.

Cultivo	HORAS			
	12	24	36	48
SMC-C	36.1	49.51	47.47	49.02
SMC-Ch	30.62	55.96	50.12	57.14
SMC-Ch-FO	30.47	54.1	50.32	52.41

Tabla.1. Porcentaje de células con un contenido relativo de DNA de 2n (fase G0-G1), durante 48 horas en cultivo, con células en tercer pase. Datos representados en la figura 4

F.1.2.- Porcentaje de células SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO en fase G2/M

El contenido en DNA de 4n (figura 5, tabla 2), correspondiente a células que se encuentran en fase G2/M, para las SMC-C alcanza un máximo a las 12h. Esto quiere decir que han comenzado a dividirse antes y que por tanto se debería haber cogido en un tiempo anterior. Respecto a las SMC-Ch, tienen un máximo a las 24h que vuelve a retomarse hacia las 48h con valores superiores al resto de los cultivos. Las SMC-CH-FO alcanzan el máximo a las 12h y va descendiendo progresivamente a lo largo de las horas de análisis.

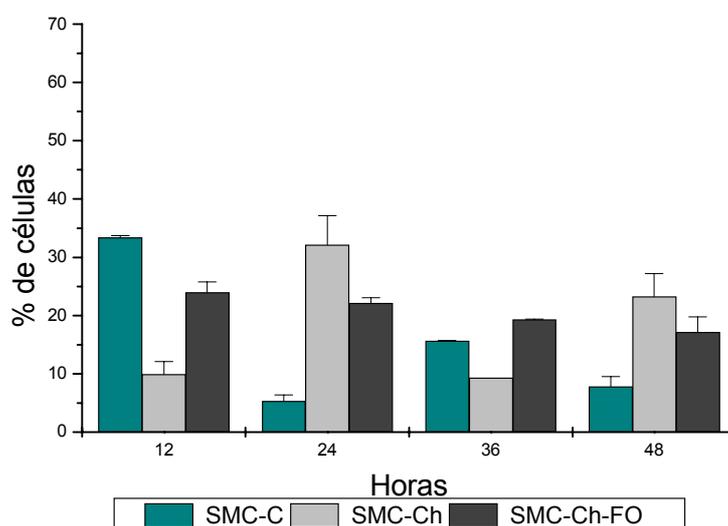


Figura 5 . Porcentaje de células con un contenido relativo de DNA de 4n (fase G2/M), durante 48 horas en cultivo, con células en tercer pase. Datos obtenidos de los histogramas de DNA de las figuras 1, 2 y 3.

Cultivo	HORAS			
	12	24	36	48
SMC-C	33.37	5.31	15.63	7.82
SMC-Ch	9.95	32.12	9.31	23.24
SMC-Ch-FO	23.99	22.14	19.33	17.17

Tabla 2 . Porcentaje de células con un contenido relativo de DNA de 4n (fase G2/M), durante 48 horas en cultivo, con células en tercer pase. Datos representados en la figura 5

F.1.3.- Porcentaje de células SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO en fase S.

La principal diferencia entre los tres tipos de cultivo reside en el porcentaje de células con un contenido intermedio de DNA (fase S del ciclo celular). Como se puede observar en la figura 6, la fase S que presentan las SMC Ch-FO a las 12h es significativamente superior al resto, mientras que las SMC-Ch-FO se encontrarían en una situación intermedia.

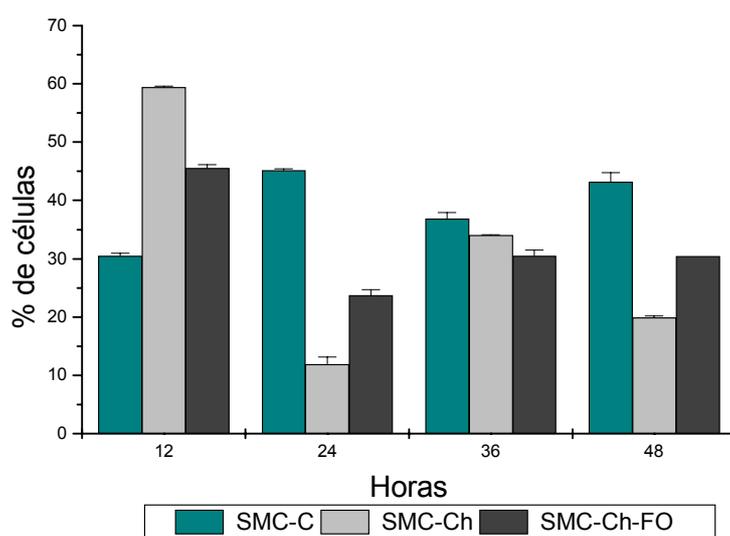


Figura 6 . Porcentaje de células con un contenido relativo de DNA intermedio (fase S), durante 48 horas en cultivo, con células en tercer pase. Datos obtenidos de los histogramas de DNA de las figuras 1, 2 y 3.

Cultivo	HORAS			
	12	24	36	48
SMC-C	30.52	45.17	36.90	43.16
SMC-Ch	59.43	11.91	34.05	19.93
SMC-Ch-FO	45.54	23.75	30.49	30.42

Tabla.3. Porcentaje de células con un contenido relativo de DNA intermedio (fase S), durante 48 horas en cultivo, con células en tercer pase. Datos representados en la figura 6.

F.2.- Medida de la Síntesis de DNA por medio de la incorporación de BrdU

La incorporación de BrdU se usa para marcar las células que están proliferando tanto *in vivo* como *in vitro*. Es la alternativa no radiactiva al ampliamente utilizado marcaje del DNA con [³H]-TdR. 5-Bromo-2´deoxiuridina es un análogo de la timidita y se incorpora al DNA como lo haría la timidita. La detección de esta incorporación se realiza por inmunoensayo, usando anticuerpos monoclonales directamente sobre la BrdU.

El periodo de marcaje puede ser corto, lo que permite cuantificar el porcentaje de células en fase S dentro de una población celular, o bien un marcaje continuo (por ejemplo durante un periodo completo de ciclo celular). Esto se usa fundamentalmente para determinar en que grado se está replicando una población celular.

En este experimento se han realizado los dos tipos de marcaje. En el marcaje por pulsos, como se muestra en la figura 7, se marcaron por periodos de dos horas y se fueron procesando las muestras a las 2, 4, 6 y 8 horas. En el marcaje continuo representado en las figuras 8.y 9 se añadió la BrdU en el tiempo 0, es decir desde que se plantaron las células (gráfica 8) o bien 12 horas después de ser plantadas (gráfica 9). En los dos casos se fueron procesando las muestras también a las 2, 4, 6 y 8 horas.

En condiciones normales, los cultivos celulares se encuentran desincronizados y cada célula de la población se encuentra en su fase particular del ciclo celular. Aunque habitualmente se emplean técnicas de sincronización dada la dificultad de estas células para sincronizarse por los métodos clásicos (219), hemos realizado el estudio con células asincrónicas con el fin de no alterar el ciclo normal del cultivo.

Para minimizar las diferencias respecto al estado proliferativo entre los cultivos SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO, las células se plantaron y se comenzó el experimento 12 horas después, tiempo en el cual las células únicamente se habrán adherido a las placas y no habrá comenzado la proliferación del cultivo.

Como se puede observar en la figura 7 alrededor de las 8 horas se encuentra un máximo, el cual corresponde al punto en el que la división celular es máxima. Las SMC-Ch en el tiempo de estudio y especialmente en ese punto de 8 horas presentan una mayor incorporación de BrdU, mientras que las SMC-Ch-FO mostrarían una situación intermedia. Aunque las diferencias no son excesivamente fuertes.

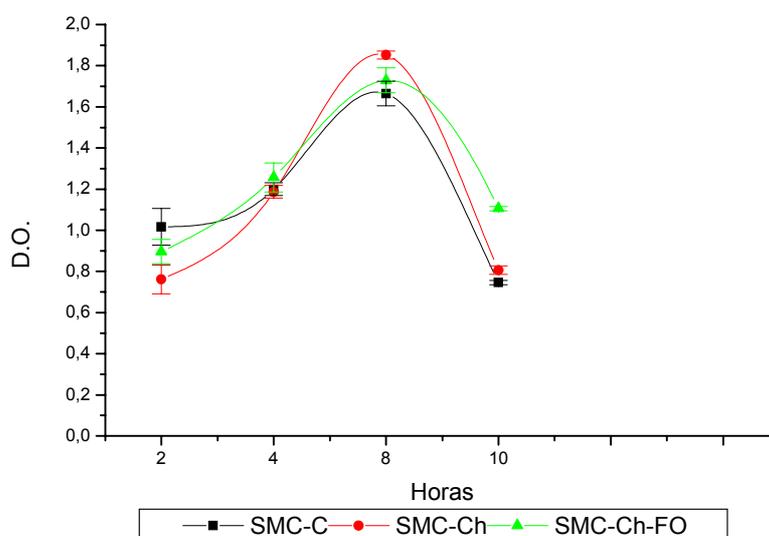


Figura 7 . Actividad de la fase S por incorporación de BrdU, en cultivo de células SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO asincrónicas de tercer pase. Las células se marcaron cada dos horas con BrdU y se realizó la detección por inmunohistoquímica a las 2, 4, 6 y 8 horas.

Horas	SMC-C	SMC-Ch	SMC-Ch-FO
2	1,017	0,761	0,896
4	1,200	1,187	1,257
8	1,665	1,852	1,729
10	0,746	0,806	1,106

Tabla 4. Porcentaje de células positivas en Anexina-V. Datos representados en la figura 7

Como se puede observar en las figuras 8 y 9 encontramos de nuevo una mayor proliferación de las células SMC-Ch, en todo el tiempo de estudio, incluso a las 8 horas donde de nuevo se encuentra un máximo. En estas dos gráficas las células SMC-Ch-FO muestran un perfil de proliferación muy similar a las SMC-Ch.

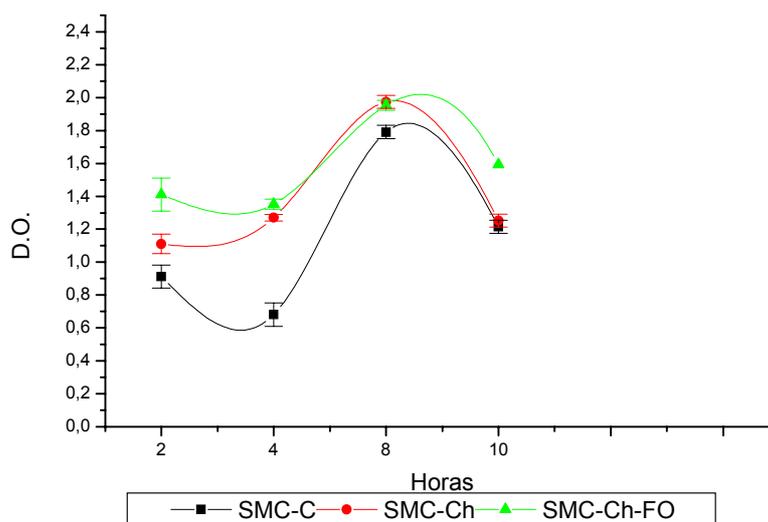


Figura 8 . Actividad de la fase S por incorporación de BrdU, en cultivo de células SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO asincrónicas de tercer pase. Las células se expusieron a un marcaje continuo con BrdU desde el momento en que se plantaron las células y se realizó la detección por inmunohistoquímica a las 2, 4, 6 y 8 horas.

Horas	SMC-C	SMC-Ch	SMC-Ch-FO
2	0,912	1,111	1,411
4	0,681	1,270	1,353
6	1,790	1,973	1,952
8	1,214	1,252	1,593

Tabla.5 Valores de D.O. por incorporación de BrdU. Datos representados en la figura 8

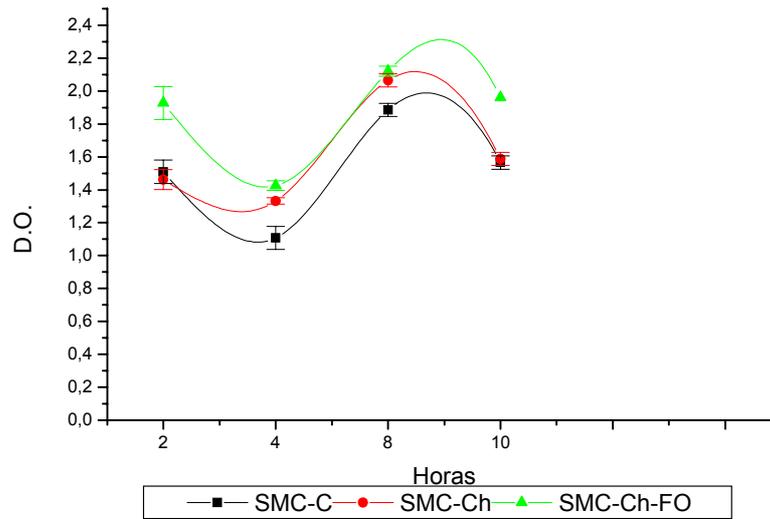


Figura 9 . Actividad de la fase S por incorporación de BrdU, en cultivo de células SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO asincrónicas de tercer pase. Las células se expusieron a un marcaje continuo con BrdU 12 horas después de ser plantadas y se realizó la detección por inmunohistoquímica a las 2, 4, 6 y 8 horas.

Horas	SMC-C	SMC-Ch	SMC-Ch-FO
2	1,5095	1,462	1,92725
4	1,108	1,3325	1,4255
8	1,8855	2,06475	2,121
10	1,56575	1,588	1,959

Tabla.6 . Porcentaje de células positivas en Anexina-V. Datos representados en la figura 9

G.- CITOTOXICIDAD Y VIABILIDAD CELULAR

Hemos realizado los estudios de citotoxicidad del 25-hidroxicolesterol y del nitroprusiato sódico en células SMC en cultivo procedentes de pollos alimentados con dieta estándar (SMC-C) y dieta suplementada con colesterol (SMC-Ch) durante 10 y 20 días, así como de pollos alimentados con dieta suplementada con colesterol durante 10 días y posteriormente con 10 días de dieta suplementada con aceite de pescado (SMC-Ch-FO).

Esto nos permitirá por un lado determinar a que concentraciones óptimas hemos de utilizar los tratamientos *in vitro* para conseguir muerte celular, y determinar si existe alguna diferencia en la respuesta citotóxica de las distintos tipos de cultivos de SMC, así como establecer las diferencias entre 10 y 20 días de tratamiento.

Los estudios de citotoxicidad los hemos llevado a cabo por medio de ensayos con MTT. Este es uno de los métodos más empleados en los estudios de citotoxicidad y proporcionan una medida de la actividad metabólica, la cual se correlaciona con el número de células vivas.

G.1 Citotoxicidad del 25-Hidroxicolesterol en SMC procedentes de pollos de 10 días

Para evaluar la citotoxicidad del 25-hidroxicolesterol en cultivos SMC-C y SMC-Ch procedentes de pollos de 10 días se utilizaron células en tercer pase. Se incubaron con 25-hidroxicolesterol a concentraciones de 0, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/ml en dos tiempos distintos: 24h (figura 10) y 48h (figura 11).

El 25-hidroxicolesterol fue disuelto previamente en etanol absoluto y se diluyó en medio de cultivo para obtener las concentraciones de trabajo anteriores. La concentración de etanol en el medio de cultivo nunca excedió el 0.8%, la cual se había comprobada previamente en nuestro laboratorio que no era tóxica para el cultivo (dato no presentado).

Según la figura 10 la citotoxicidad del 25-hidroxicolesterol para las células SMC-C y SMC-Ch durante 24h es muy similar aunque las SMC-Ch muestran ligeramente una mayor viabilidad. Se observa que a una concentración de 10 μ g/ml se alcanza una viabilidad alrededor del 50%, lo cual se mantiene aunque sigamos aumentando la concentración de 25-hidroxicolesterol.

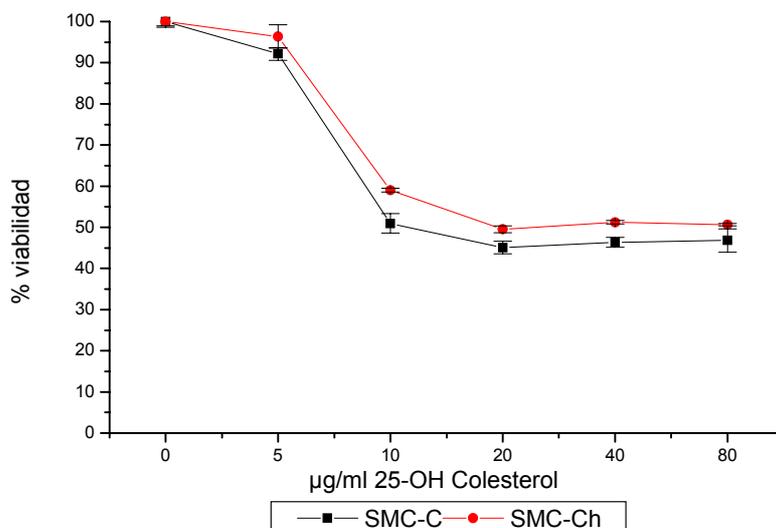


Figura.10.- Efecto de la incubación de 25-hidroxicolesterol sobre la viabilidad celular de los cultivos SMC procedentes de pollos de 10 días alimentados con dieta estándar (SMC-C) y dieta de colesterol (SMC-Ch). Las células se incubaron durante 24h con 25-Hidroxicolesterol disuelto en etanol (la concentración final de etanol en el medio no superó el 0,8%).

	µg/ml 25-Hidroxicolesterol					
	0	5	10	20	40	80
SMC-C	100	92,14	50,95	45,1	46,38	46,81
SMC-Ch	100	96,4	59,06	49,54	51,24	50,66

Tabla 7. Porcentajes de viabilidad celular. Datos representados en la figura 10

Según la figura 11 la citotoxicidad del 25-hidroxicolesterol para las células SMC-C y SMC-Ch durante 48 horas muestra una mayor citotoxicidad como era de esperar que durante 24h. Sin embargo en este caso, sobretodo a concentraciones bajas (5 y 10 $\mu\text{g/ml}$), parece tener un mayor efecto sobre las SMC-Ch. El 50% de viabilidad se alcanza a concentraciones entre 10-20 $\mu\text{g/ml}$

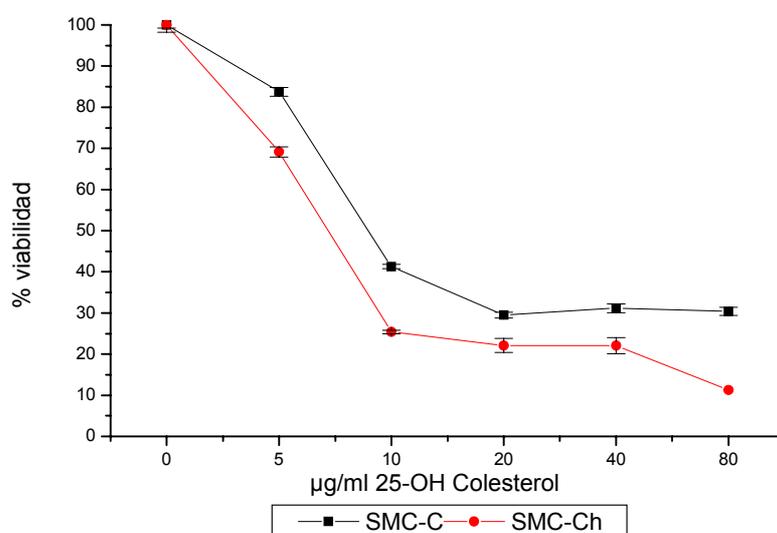


Figura 11.- Efecto de la incubación de 25-hidroxicolesterol sobre la viabilidad celular de los cultivos SMC procedentes de pollos de 10 días alimentados con dieta estándar (SMC-C) y dieta de colesterol (SMC-Ch). Las células se incubaron durante 48h con 25-Hidroxicolesterol disuelto en etanol (la concentración final de etanol en el medio no superó el 0,8%).

	$\mu\text{g/ml}$ 25-Hidroxicolesterol					
	0	5	10	20	40	80
SMC-C	100	83,77	41,27	29,48	31,17	30,38
SMC-Ch	100	69,15	25,39	22,07	22,07	11,31

Tabla 8. Porcentajes de viabilidad celular. Datos representados en la figura 11

G.2 Citotoxicidad del 25-Hidroxicolesterol en SMC procedentes de pollos de 20 días

Para evaluar la citotoxicidad del 25-hidroxicolesterol en cultivos SMC-C, SMC-Ch, SMC-Ch-FO procedentes de pollos alimentados durante 20 días, se realizó el mismo procedimiento que en el apartado anterior. Así se utilizaron células en tercer pase, que se incubaron con 25-hidroxicolesterol a concentraciones de 0, 5, 10, 20, 40 y 80 µg/ml en dos tiempos distintos: 24h (figura 3) y 48h (figura 4).

El 25-hidroxicolesterol fue disuelto previamente en etanol absoluto y se diluyó en medio de cultivo para obtener las concentraciones de trabajo anteriores. Al igual que en los experimentos del apartado anterior, las concentraciones de etanol en el medio de cultivo nunca excedieron el 0.8%, ya que se había comprobado previamente en nuestro laboratorio que no era tóxica para el cultivo (dato no presentado).

Según la figura 12, la citotoxicidad del 25-hidroxicolesterol para las células SMC-C y SMC-Ch y SMC-CH-FO durante 24 horas es similar en los tres tipos de cultivo. Aún así, hay una viabilidad ligeramente superior para las SMC-Ch-FO, especialmente a concentraciones de hasta 20 µg/ml. Las SMC-Ch estarían en una situación intermedia. El 50% de viabilidad se alcanza alrededor de 20 µg/ml.

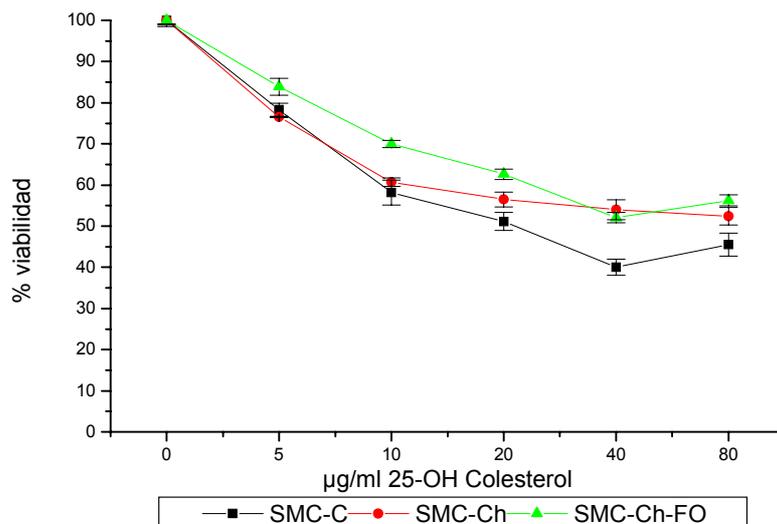


Figura.12.- Efecto de la incubación de 25-hidroxicolesterol sobre la viabilidad celular de los cultivos SMC procedentes de pollos de 20 días alimentados con dieta estándar (SMC-C), dieta de colesterol (SMC-Ch) y dieta de aceite de pescado (SMC-Ch-FO). Las células se incubaron durante 24h con 25-Hidroxicolesterol disuelto en etanol (la concentración final de etanol en el medio no superó el 0,8%).

	µg/ml 25-Hidroxicolesterol					
	0	5	10	20	40	80
SMC-C	100	78,27	58,18	51,16	40,06	45,53
SMC-Ch	100	76,52	60,73	56,49	54	52,43
SMC-Ch-FO	100	83,9	70	62,62	52,07	56,28

Tabla 9. Porcentajes de viabilidad celular. Datos representados en la figura 12

Según la figura 13 la citotoxicidad del 25-hidroxicolesterol para las células SMC-C y SMC-Ch y SMC-CH-FO durante 48 horas, se encuentra un perfil similar a las de 24h. A concentraciones altas aumenta más la citotoxicidad. Nuevamente, el 50% de viabilidad se alcanza alrededor de 20µg/ml.

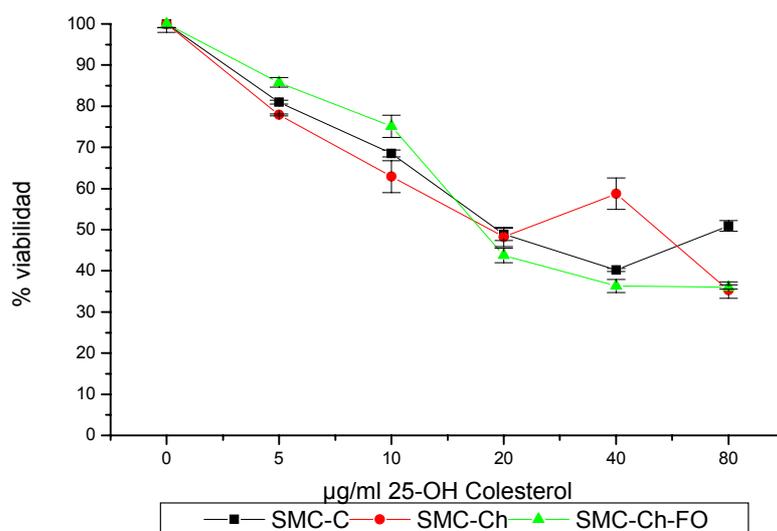


Figura.13.- Efecto de la incubación de 25-hidroxicolesterol sobre la viabilidad celular de los cultivos SMC procedentes de pollos de 20 días alimentados con dieta estándar (SMC-C), dieta de colesterol (SMC-Ch) y dieta de aceite de pescado (SMC-Ch-FO). Las células se incubaron durante 48h con 25-Hidroxicolesterol disuelto en etanol (la concentración final de etanol en el medio no superó el 0,8%).

	µg/ml 25-Hidroxicolesterol					
	0	5	10	20	40	80
SMC-C	100	81,03	68,55	48,88	40,23	50,93
SMC-Ch	100	77,9	62,92	48,23	58,76	35,31
SMC-Ch-FO	100	85,78	75,14	43,75	36,29	36,08

Tabla 10. Porcentajes de viabilidad celular. Datos representados en la figura 4.

A la vista de estos resultados para experimentos posteriores con el 25-hidroxicolesterol se escogió la concentración de 20 µg/ml

G.3 Citotoxicidad del NO en SMC procedentes de pollos de 10 días

Para evaluar la citotoxicidad del Nitroprusiato como donador de óxido nítrico (NO) en SMC-C, SMC-Ch, de pollos de 10 días, se utilizaron cultivos en tercer pase. Se incubaron con nitroprusiato sódico a concentraciones de 0, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5 y 5 mM durante 8h (figura 5).

El nitroprusiato fue disuelto directamente en medio de cultivo para obtener las concentraciones de trabajo anteriores.

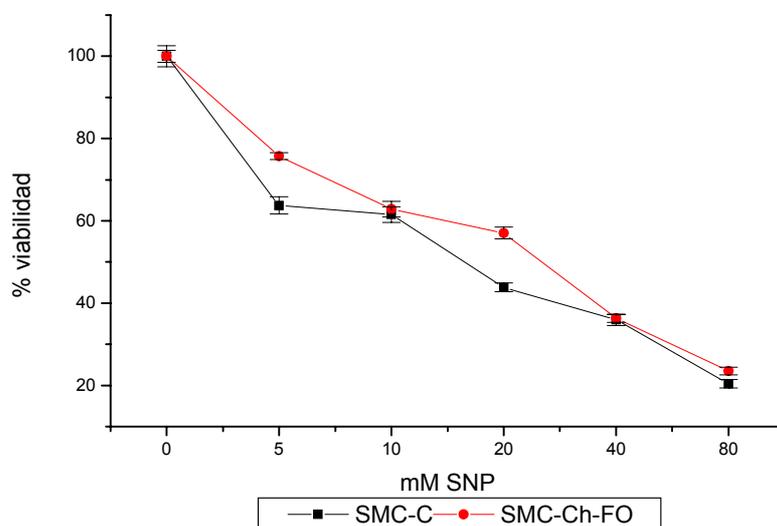


Figura.14.- Efecto de la incubación con distintas concentraciones de Nitroprusiato sódico sobre la viabilidad celular de las SMC procedentes de pollos de 10 días alimentados con dieta estándar (SMC-C) y dieta de colesterol (SMC-Ch). Las células se incubaron con Nitroprusiato sódico durante 8h.

	mM Nitroprusiato					
	0	0,3	0,6	1,25	2,5	5
SMC-C	100	63,77	61,55	43,81	35,95	20,44
SMC-Ch	100	75,75	62,85	57,05	36,33	23,51

Tabla 11. Porcentajes de viabilidad celular. Datos representados en la figura 5

Como puede observarse en la figura 14 la citotoxicidad del NO para las células SMC-C y SMC-Ch durante 8 horas es muy similar para los dos tipos de cultivo. La viabilidad celular va disminuyendo de forma gradual conforme se aumenta la concentración de nitroprusiato. Se alcanza una viabilidad del 50% alrededor de 0.6 mM

G.4 Citotoxicidad del NO en pollos de 20 días

Para evaluar la citotoxicidad del nitroprusiato como donador de óxido nítrico (NO) en cultivos SMC-C, SMC-Ch, SMC-Ch-FO de pollos de 20 días, se utilizaron células en tercer pase. Se incubaron los cultivos con nitroprusiato sódico a concentraciones de 0, 0.31, 0.62, 1.25, 2.5 y 5 mM durante 8h (figura 15).

Al igual que en el caso del estudio de la citotoxicidad del NO en pollos de 10 días, en este caso, el nitroprusiato fue disuelto directamente en medio de cultivo para obtener las concentraciones de trabajo anteriores.

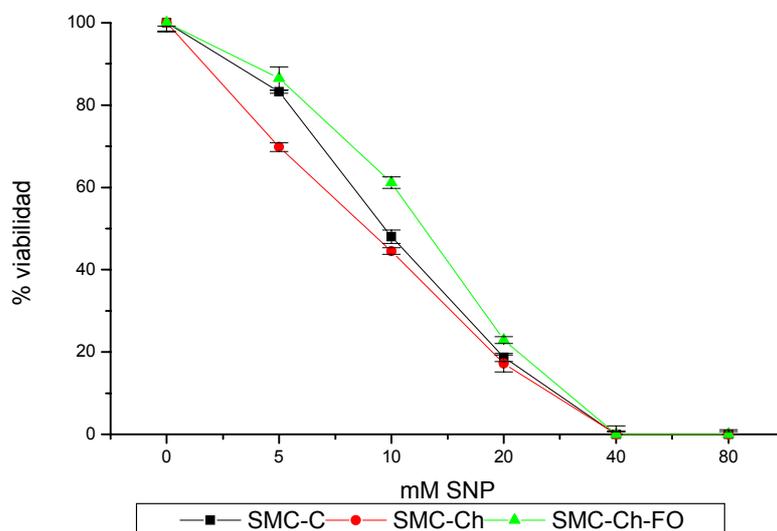


Figura.15.- Efecto de la incubación de Nitroprusiato sódico sobre la viabilidad celular de los cultivos SMC procedentes de pollos de 20 días alimentados con dieta estándar (SMC-C) y dieta de colesterol (SMC-Ch) y dieta de aceite de pescado (SMC-Ch-FO). Las células se incubaron con Nitroprusiato sódico durante 8h.

	mM Nitroprusiato					
	0	0,3	0,6	1,25	2,5	5
SMC-C	100	83,24	48	18,67	0	0
SMC-Ch	100	69,8	44,54	17,24	0	0
SMC-Ch-FO	100	86,47	61,19	22,92	0	0

Tabla 12. Porcentajes de viabilidad celular. Datos representados en la figura 15

Según la figura 15 la citotoxicidad del NO para las células SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO durante 8 horas es muy similar para los dos tipos de cultivo, aunque ligeramente menor para las SMC-Ch-FO. En este caso las células de 20 días muestran una mayor citotoxicidad a las mismas concentraciones que las de 10 días, especialmente a partir de 0.6mM, a la cual muestran una viabilidad de alrededor del 50%

A la vista de estos resultados para experimentos posteriores con el nitroprusiato como donador de NO se escogió la concentración de 0.6mM.

H.- DETECCIÓN DE APOPTOSIS EN CULTIVOS SMC

H.1.- Detección morfológica de apoptosis

Cuando una célula recibe señales de muerte apoptótica (4), se producen una serie de cambios como son:

- Encogimiento celular y pérdida del contacto con células vecinas. Se han descrito reducciones en el volumen celular de incluso el 30%.
- Exposición al exterior de la membrana plasmática de fosfatidilserina, la cual, en condiciones normales, se encuentra en la cara interna de la membrana.
- La membrana plasmática comienza a tener circunvoluciones y adquiere la apariencia vesicular característica.
- Condensación de la cromatina y su acumulación en la periferia del núcleo.
- Desintegración del nucleolo en partículas osmiófilas.
- Fragmentación nuclear por parte de endonucleasas endógenas, las cuales rompen el DNA en fragmentos oligonucleosomales de entre 180-200pb. Esto produce el característico patrón de DNA en escalera.

- Como resultado de las grandes invaginaciones se producen los llamados cuerpos apoptóticos. Si son células en cultivo, suelen hincharse y destruirse. A esto se le conoce como apoptosis secundaria o falsa necrosis.

Para comprobar los cambios morfológicos que se pueden observar al microscopio óptico, se prepararon cultivos SMC, así como cultivos tratados con 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de 25-hidroxicolesterol durante 24 horas y con nitroprusiato 0.6mM durante 8 horas.

Como ejemplo de lo observado se muestran a continuación 3 fotografías (figuras 16, 17, 18) correspondientes a SMC-C, SMC-Ch tratada con 25-hidroxicolesterol, y SMC-Ch tratadas con nitroprusiato:

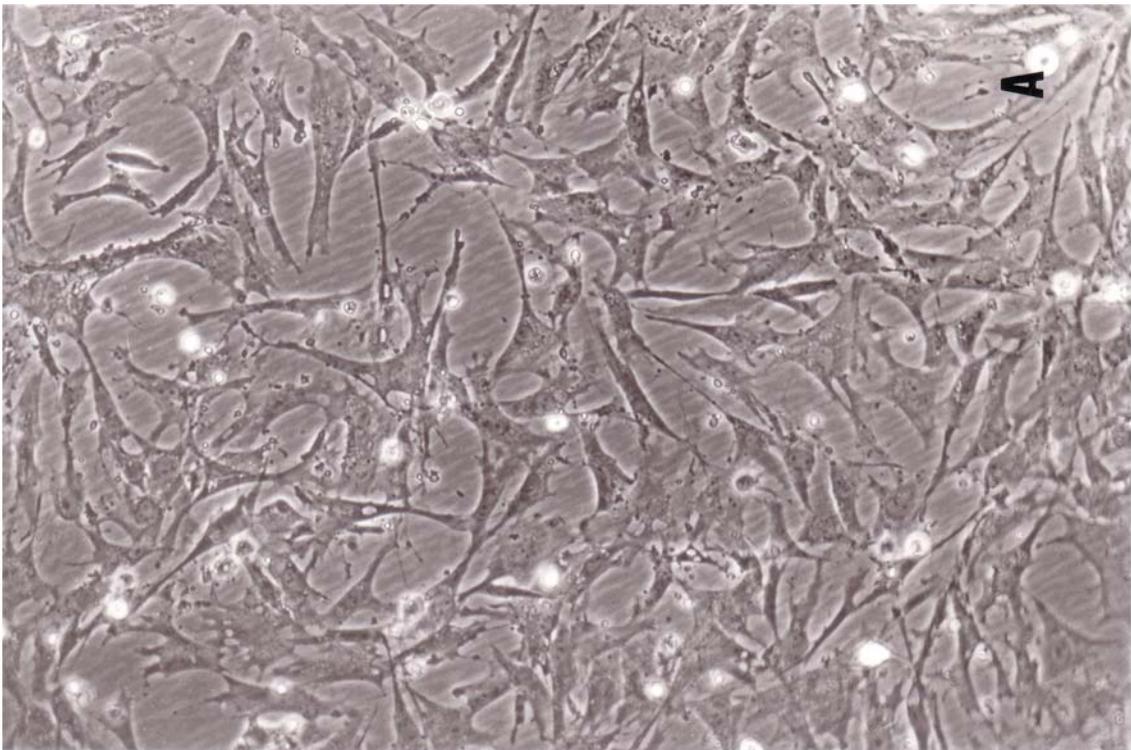


Figura 17. Fotografía con microscopio óptico invertido de SMC-Ch, cultivadas en DMEM y con un 10% de FBS.

La figura 17 muestra las SMC que se observan normalmente en cultivo la mayoría de ellas presentan forma estrellada, y escasamente aparecen SMC con forma de uso



Figura 17. Fotografía con microscopio óptico invertido de SMC-Ch cultivadas en DMEM con un 10% de FBS y tratadas con 20 μ g/ml de 25-Hidroxicolesterol durante 24 horas.

Como se puede observar en la fotografía de la figura 17 se observan muchas células que están sufriendo un encogimiento celular, es decir una reducción en el tamaño de la célula. Además se ve que la membrana plasmática de las células está adquiriendo una apariencia vesiculosa y que incluso culmina con varias células totalmente vesiculadas, rodeadas de los llamados cuerpos apoptóticos. Además en la parte superior se puede observar una división celular a punto de culminarse.



Figura18. Fotografía con microscopio óptico invertido de SMC-Ch cultivadas en DMEM, con un 10% de FBS y tratadas con 0,6 mM de nitroprusiato durante 8 horas.

En la fotografía de la figura 18 se observan numerosas células en las que el tamaño celular se está encogiendo, y como adquieren la apariencia vesiculada en distintos grados, incluso se aprecian dos células en las que se pueden ver los cuerpos apoptóticos como bolas mas o menos grandes y refringentes a punto de soltarse.

H.2.- Detección de Apoptosis en cultivos SMC por medio de Anexina-V

La pérdida de la asimetría de membrana es un fenómeno que parece ser universal en el proceso apoptótico. Por tanto, las células que están sufriendo apoptosis se pueden detectar marcando las células con Anexina V-FITC. Esta se une a los restos de fosfatidilserina expuestos al exterior por la pérdida de asimetría de su membrana. Para distinguir las células de una situación necrótica se tiñen también con IP, el cual entrará en las células que hayan perdido la integridad de la membrana tal y como ocurre con las células necróticas. A su vez, hay que destacar que también quedan marcadas con

IP las células con necrosis secundarias. Esto es, puesto que se trata de un monocultivo, una vez que las células en cultivo han sufrido apoptosis y dado que no existen macrófagos capaces de fagocitar estas células apoptóticas o los cuerpos apoptóticos que queden de ellas, éstas van a sufrir una necrosis que se conoce como necrosis secundaria al proceso apoptótico, aunque no haya sido un proceso de necrosis la primera causa para morir.

Hemos cuantificado el porcentaje de apoptosis en los tres tipos de cultivos de SMC (C, Ch y Ch-FO), tanto a niveles basales como tras la adición de los tratamientos *in vitro*. Las concentraciones y tiempos de incubación para el 25-hidroxicolesterol (25-OH-Ch) y el nitroprusiato sódico (SNP) fueron de 20 µg/ml durante 24h y de 0,6mM 8h respectivamente.

Los resultados obtenidos por citometría de flujo representados en las figuras 19, 20 y 21 están divididos en cuatro cuadrantes en los cuales aparece una distribución de células. En el eje X aparece la fluorescencia de la anexina-FITC Y en el eje y aparece la fluorescencia correspondiente al IP, según en el cuadrante en el que estemos tendremos:

- Cuadrante inferior izquierdo: células viables; no unen anexina y excluyen IP.
- Cuadrante inferior derecho: células en apoptosis temprana; unen anexina y excluyen IP.
- Cuadrante superior derecho: células en apoptosis tardía; unen anexina e incorporan IP.
- Cuadrante superior izquierdo: células necróticas o en necrosis secundaria; unen anexina e incorporan IP, o sólo incorporan IP.

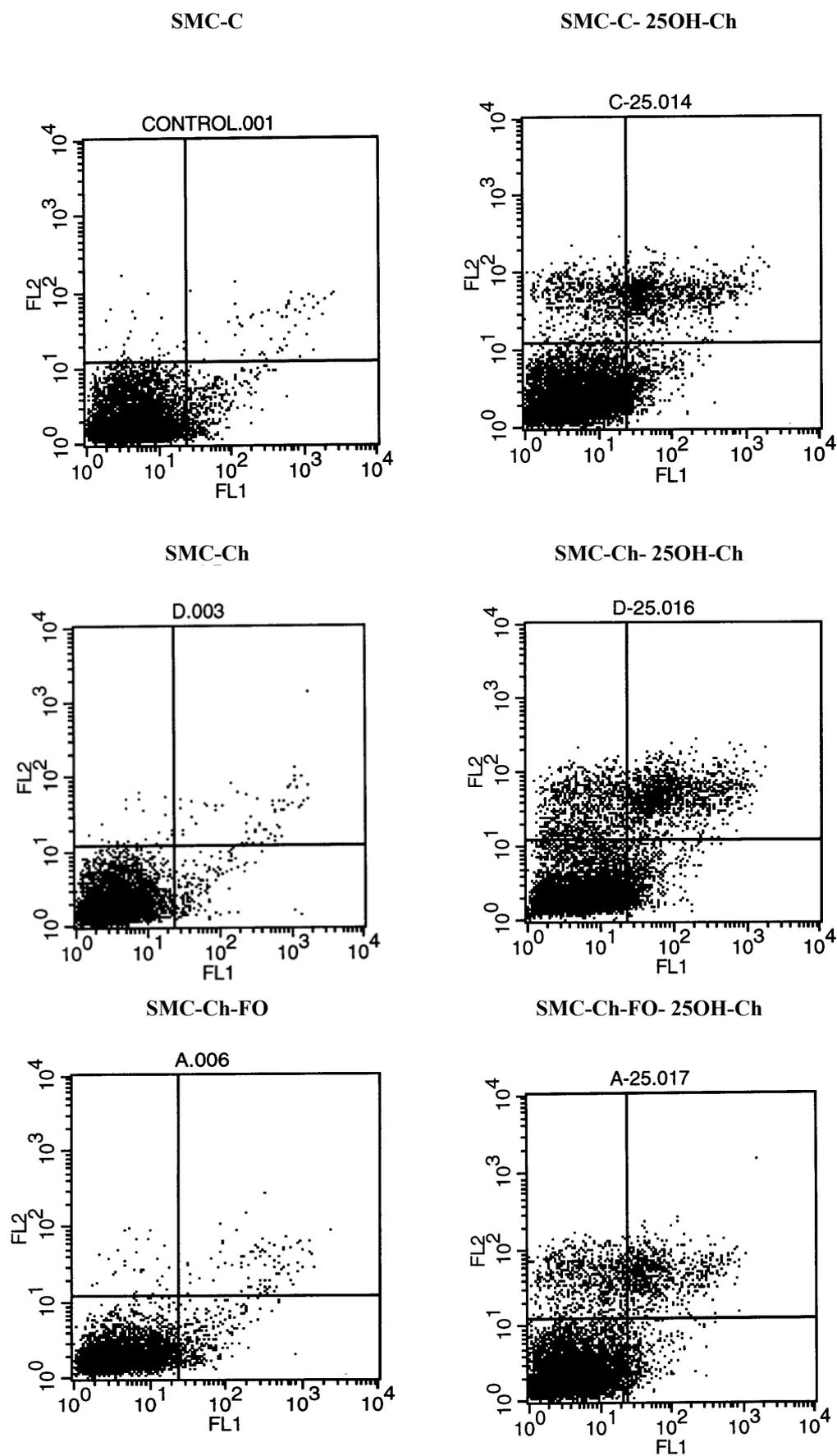


Figura 19. Citometrias de flujo en cultivos de células SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO marcadas con Anexina/IP.

Figura 20. Citometrias de flujo en cultivos de células SMC-C, SMC-Ch y SMC-ch-FO tratadas con 25-hidroxicolesterol y marcadas con Anexina/IP.

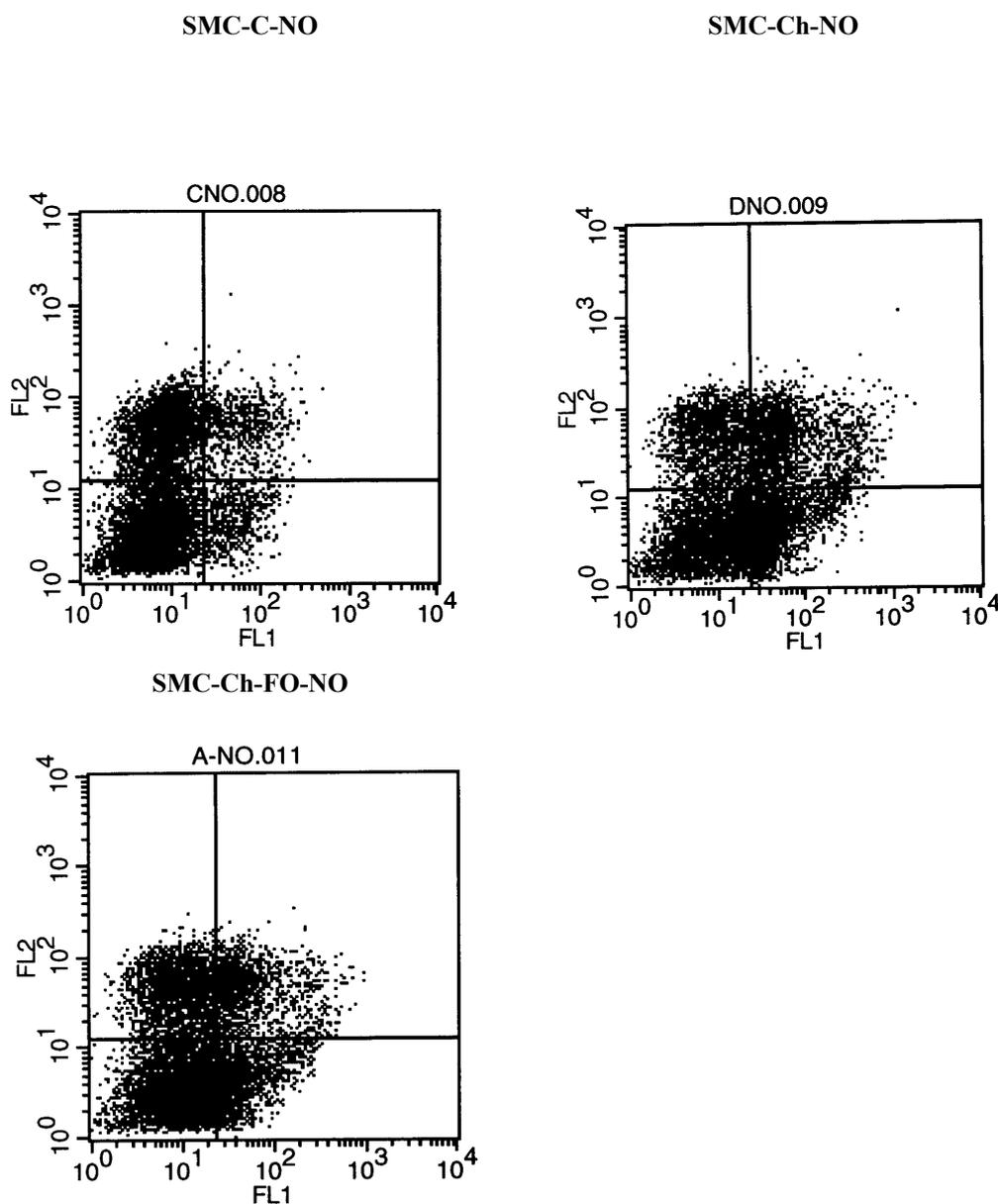


Figura 21. Citometrias de flujo en cultivo de células SMC-C, SMC-Ch y SMC-ch-FO tratadas con Nitroprusiato y marcadas con Anexina/IP.

En la figura 22 y tabla 13 se exponen el porcentaje de células positivas en anexinaV-FITC. Es decir los porcentajes correspondientes a los cuadrantes superior derecho, e inferior izquierdo de los gráficos anteriores, o lo que es lo mismo las células SMC que se encuentran en situación de apoptosis temprana y apoptosis tardía, tanto a niveles basales como tras la adición de 25-hidroxicolesterol durante 24 horas.

Como se puede ver a nivel basal existe un pequeño porcentaje de células apoptóticas que corresponde a la muerte que las células sufren normalmente en cultivo y que no excede de un 4%.

Tras la adición de 25-hidroxicolesterol las células sufren una considerable apoptosis, especialmente para las SMC-Ch, mientras que es bastante menor para las SMC.Ch-FO.

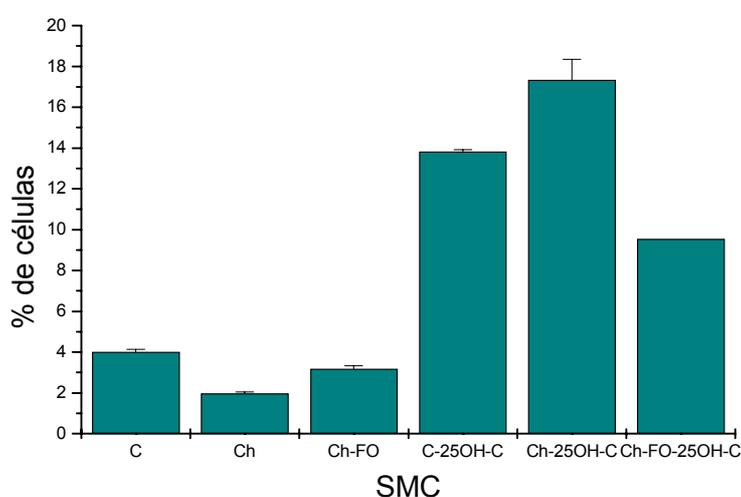


Figura 22. Porcentaje de células positivas en Anexina-V, correspondiente tanto a una apoptosis temprana como a una apoptosis tardía en células SMC-C, Ch, Ch-FO y en estas tratadas con 25-hidroxicolesterol durante 24h (C-25, Ch-25, Ch-FO-25).

	SMC-C	SMC-Ch	SMC-Ch-FO	SMC-C 25Hidroxicolesterol	SMC-Ch 25Hidroxicolesterol	SMC-Ch-FO 25Hidroxicolesterol
%apoptosis	4.0	1.97	3.17	13.83	17.34	9.54

Tabla 13. Porcentaje de células positivas en Anexina-V. Datos representados en la figura 4

En la figura 23 y tabla 14 se exponen el porcentaje de células positivas en anexinaV-FITC. Es decir los porcentajes correspondientes a los cuadrantes superior derecho e inferior izquierdo de los gráficos anteriores, o lo que es lo mismo las células SMC que se encuentran en situación de apoptosis temprana y apoptosis tardía, tanto a niveles basales como tras la adición de nitroprusiato durante 8 horas.

Como se puede ver, a nivel basal existe un pequeño porcentaje de células apoptóticas que corresponde a la muerte que las células sufren normalmente en cultivo y que no excede de un 4%.

Tras la adición de nitroprusiato las células sufren una fuerte apoptosis bastante mayor incluso que la inducida por el 25-hidroxicolesterol. Las SMC-Ch, son las que presentan los valores más altos, y con bastante diferencia con las SMC-C, las cuales muestran el menor porcentaje mientras que SMC.Ch-FO se encuentran en una situación intermedia.

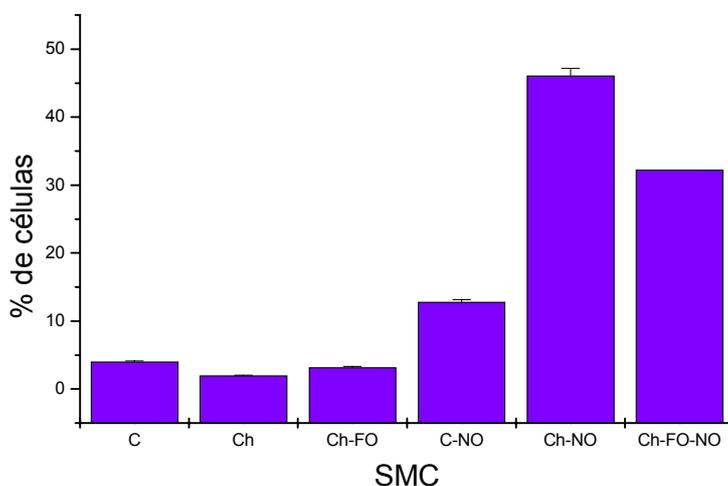


Figura 23. Porcentaje de células positivas en Anexina-V, correspondiente tanto a una apoptosis temprana como a una apoptosis tardía en células SMC-C, Ch, Ch-FO y en estas tratadas con Nitroprusiato durante 24h (C-NO, Ch-NO, Ch-FO-NO).

	SMC-C	SMC-Ch	SMC-Ch-FO	SMC-C Nitroprusiato	SMC-Ch Nitroprusiato	SMC-Ch-FO Nitroprusiato
%apoptosis	4.0	1.97	3.17	12.82	46.09	32.25

Tabla 14, Porcentaje de células positivas en Anexina-V. Datos representados en la figura 23

I.- ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN-BLOT

Hemos investigado la expresión de proteínas de la familia de oncogenes Bcl-2. En concreto para Bax, Bcl-X_L y Bcl-2. Los análisis se han realizado en los tres tipos de cultivos de SMC (C, Ch y Ch-FO), tanto a niveles basales como tras la adición de sustancias *in vitro* expuestas anteriormente. Las concentraciones y tiempos de incubación para el 25-hidroxicolesterol (25-OH-Ch) y el nitroprusiato sódico (SNP) fueron de 20 µg/ml durante 24h y de 0,6mM 8h respectivamente. Los resultados se muestran normalizados respecto a los niveles controles (nivel basal de SMC-C) para cada gen.

Dado la capacidad de homodimerización y de heterodimerización de Bax, Bcl-X_L y Bcl-2, la relación en los niveles de expresión entre Bcl-2/Bax y Bcl-X_L/Bax determina si la célula va a sufrir apoptosis o no tras un estímulo apoptótico. Por esta razón, se exponen también la proporción para estas relaciones antiapoptótico/proapoptótico tanto a nivel basal (tratamientos *in vivo*), como con los tratamientos *in vitro*.

I.1.-Expresión a niveles basales de Bax, Bcl-X_L y Bcl-2 en cultivos de células SMC procedentes de pollos alimentados durante 20 días

En nuestro modelo experimental celular, podemos observar que los cultivos de SMC procedentes de pollos hipercolesterolemicos alimentados durante 20 días (figura 24) muestran una disminución en la expresión de Bcl-2, mientras que Bax tiene un nivel ligeramente superior en las SMC-Ch. Por tanto la relación Bcl-2/Bax disminuye. Sin embargo, la relación Bcl-X_L/Bax es igual para ambos (tabla 15). Respecto a las células SMC-Ch-FO, estas muestran los niveles más altos para Bcl-2 y Bcl-X_L. Esto hace que la proporción Bcl-2/Bax aumente respecto al control.

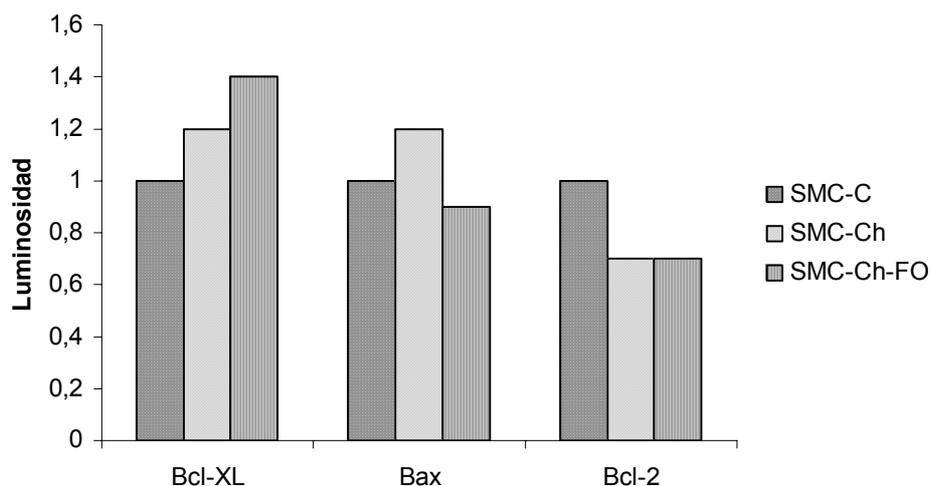


Figura 24: Niveles de expresión de Bcl-2, Bcl-X_L y Bax en cultivos de SMC procedentes de pollos alimentados durante 20 días. Los datos de luminosidad (D.O) de cada banda de proteínas se encuentran normalizados respecto al control.

	Bcl-X _L /Bax	Bcl-2/Bax
SMC-C	1	1
SMC-Ch	1	0.58
SMC-Ch-FO	1.5	0.77

Tabla 15: Relación de Bcl-2, Bcl-X_L y Bax en SMC procedentes de pollos alimentados durante 20 días

I.2.- Efecto del 25-hidrosicolesterol y del nitroprusiato sobre los niveles de expresión de Bax

Bax es un miembro de la familia Bcl-2 con acción proapoptótica. Tiene la capacidad de formar homodímeros y heterodímeros con Bcl-2 y Bcl-X_L. Bax heterodimeriza con otros miembros proapoptóticos lo cual promueven la muerte celular, sin embargo esta puede ser bloqueada por la heterodimerización con Bcl-2 y Bcl-X_L.

I.2.1.- Expresión de Bax en SMC procedentes de pollos alimentados durante 10 días

En la figura 25 se muestra la expresión de Bax a nivel basal, tras la adición de 25-hidroxicolesterol y de nitroprusiato en cultivos SMC. A nivel basal los cultivos SMC-C, SMC-Ch procedentes de pollos alimentados durante 10 días muestran una expresión de Bax muy baja, prácticamente indetectable.

La acción del 25-HO-Ch sobre las SMC provoca un gran aumento de la proteína Bax, tanto a 24 como a 48 horas, siendo especialmente significativo para los cultivos SMC-Ch respecto a los de SMC-C a las 24h. Sin embargo el SNP no parece tener ningún efecto en los niveles de Bax

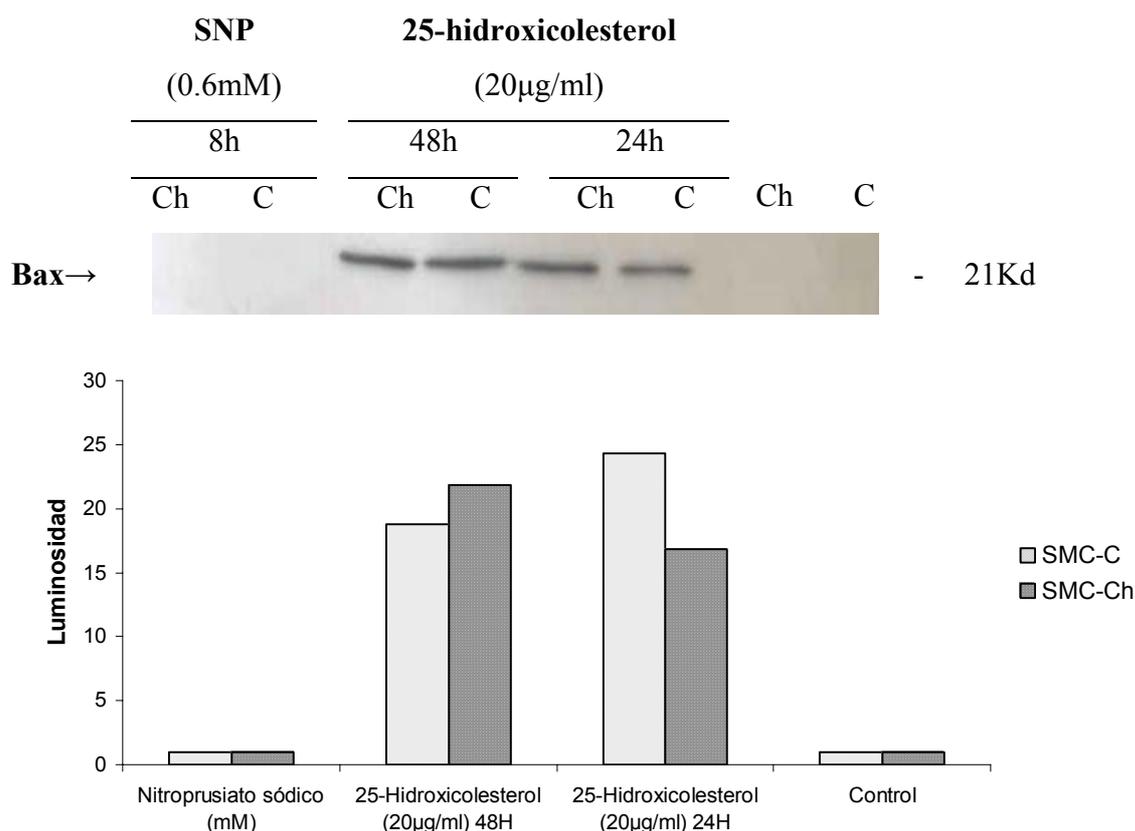


Figura 25. Efecto del 25-hidroxicolesterol y del nitroprusiato sobre los niveles de expresión de Bax en células SMC provenientes de pollos de 10 días. Las células se cultivaron en DMEM al 5% de suero y se expusieron al 25-hidroxicolesterol a una concentración final de 20µg/ml durante 24 h. El nitroprusiato fue disuelto en medio a una concentración de 0,6mM durante 8h. Los datos de luminosidad (D.O) de cada banda de proteínas se encuentran normalizados respecto al control.

I.2.2.- Expresión de Bax en SMC procedentes de pollos alimentados durante 20 días

Como se puede observar en la figura 26 la adición de 25-HO-Ch sobre las SMC provenientes de pollos de 20 días, al igual que ocurría en el apartado anterior con los cultivos SMC procedentes de pollos alimentados durante 10 días, provoca un elevado aumento en los niveles de Bax. Esto se produce de una forma muy similar para las SMC-C, Ch y Ch-FO.

En la acción del SNP (figura 27) de nuevo encontramos que no produce variaciones significativas sobre los niveles de Bax en las SMC.

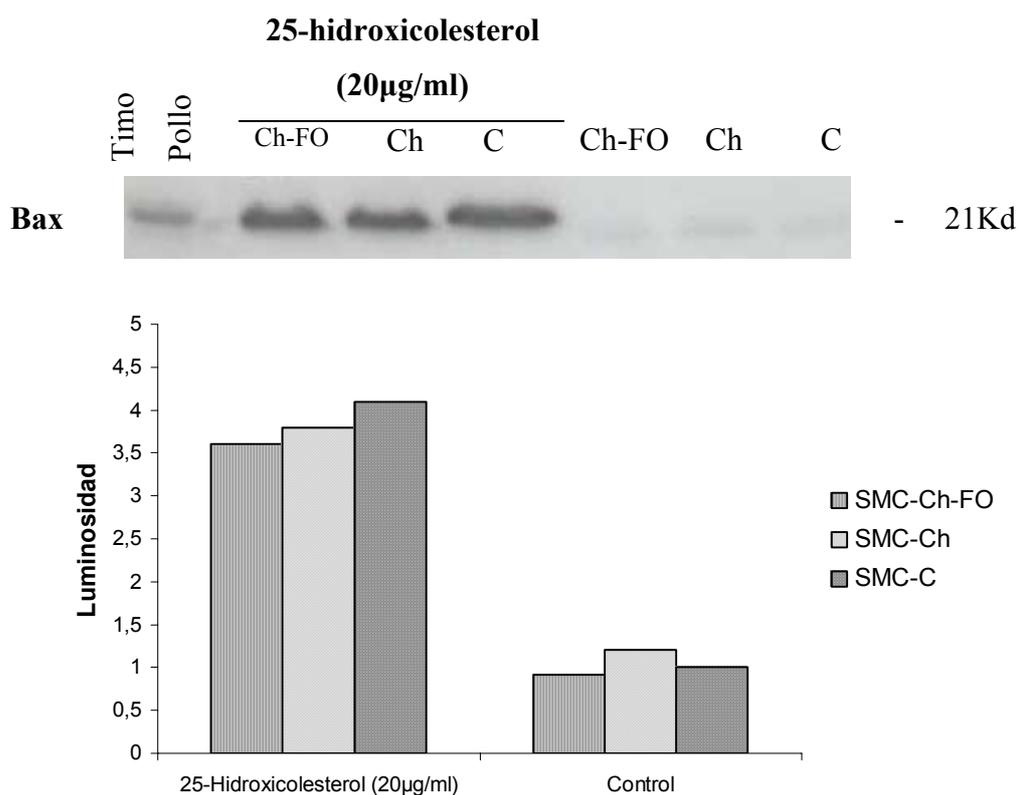


Figura 26. Efecto del 25-hidroxicolesterol sobre los niveles de expresión de Bax en células SMC provenientes de pollos de 20 días. Las células se cultivaron en DMEM al 5% de suero y se expusieron al 25-hidroxicolesterol a una concentración final de 20µg/ml durante 24 h. Los datos de luminosidad (D.O) de cada banda de proteínas se encuentran normalizados respecto al control

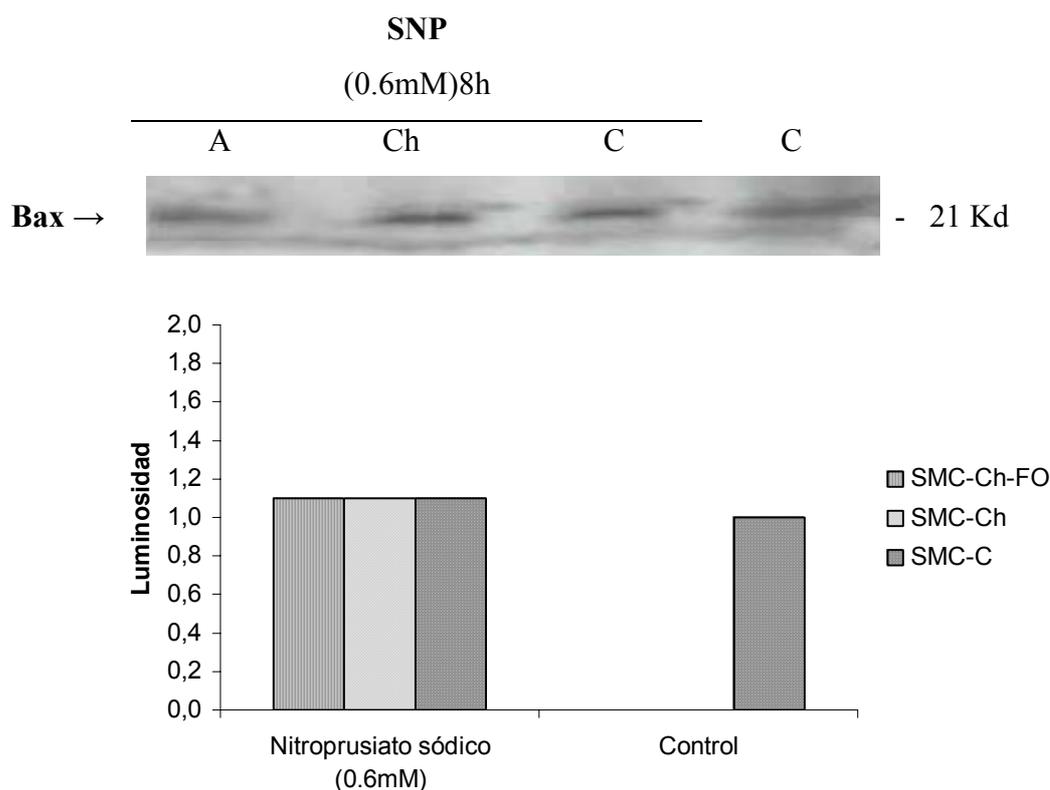


Figura 27. Efecto del nitroprusiato durante 8h sobre los niveles de expresión de Bax en células SMC provenientes de pollos de 20 días a una concentración de 0,6mM durante 8h. Los datos de luminosidad (D.O) de cada banda de proteínas se encuentran normalizados respecto al control

I.3.- Efecto del 25-hidroxicolesterol y del nitroprusiato sobre los niveles de expresión de Bcl-X_L

Bcl-X_L es un miembro de la familia Bcl-2, con capacidad antiapoptótica. Tiene la capacidad de formar homodímeros y heterodímeros con Bcl-2 y Bax, siendo este uno de los niveles de regulación más importantes en la inducción de la apoptosis.

I.3.1.- Expresión de Bcl-X_L en cultivos de SMC procedentes de pollos alimentados durante 10 días

En la figura 28, se muestran los niveles de expresión de Bcl-X_L tanto a nivel basal (cultivos de SMC procedentes de pollos alimentados con las distintas dietas durante 10 días), como la respuesta de estos cultivos tras la adición de 25-hidroxicolesterol y nitroprusiato.

A nivel basal los cultivos SMC-C, SMC-Ch procedentes de pollos alimentados durante 10 días muestran una expresión de Bcl-X_L bastante alta, especialmente las SMC-Ch. Por su parte, la acción del 25-HO-Ch sobre las SMC provoca un aumento de la proteína Bcl-X_L a las 24 horas, sin grandes diferencias entre los dos tipos celulares. Por el contrario, la acción del SNP provoca una marcada disminución en los niveles de Bcl-X_L.

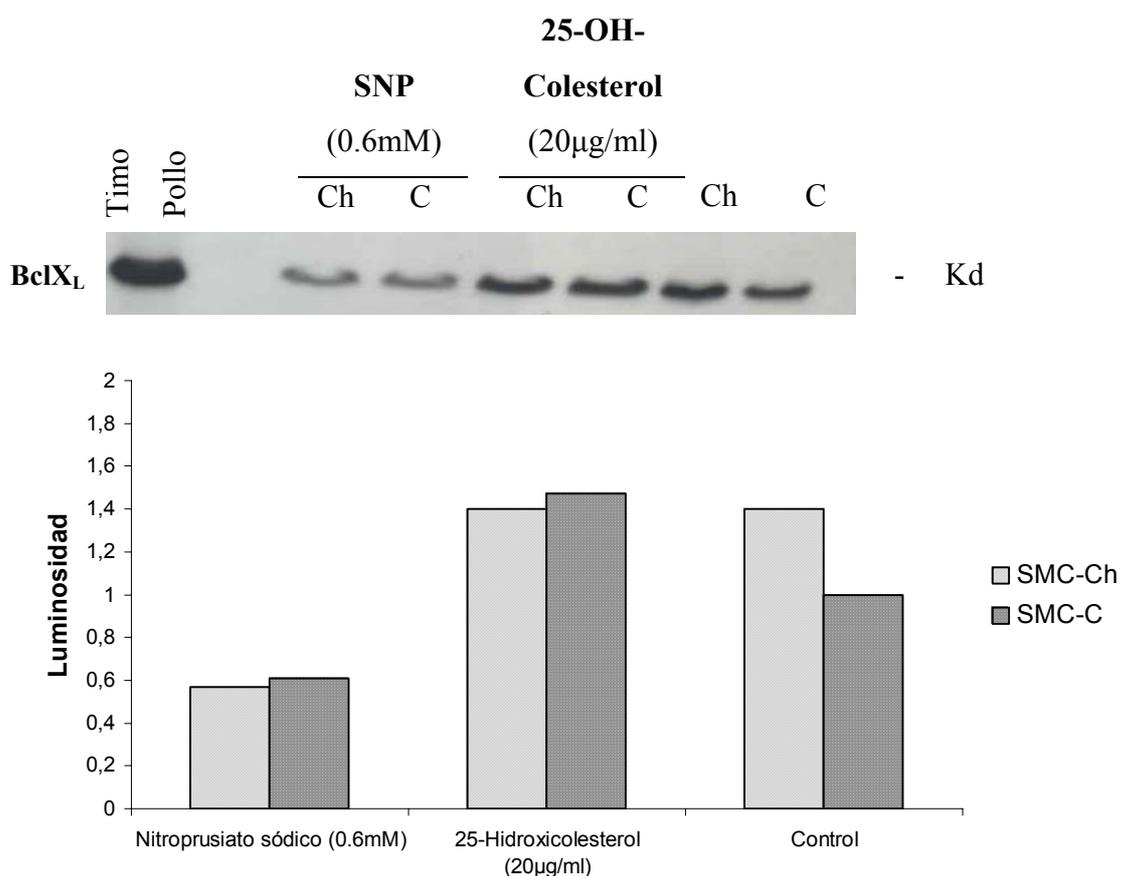


Figura 28. Efecto del 25-hidroxicolesterol y del nitroprusiato sobre los niveles de expresión de Bcl X_L en cultivos de células SMC provenientes de pollos de 10 días. Las células se cultivaron en DMEM al 5% de suero y se expusieron al 25-hidroxicolesterol a una concentración final de 20µg/ml durante 24h. El nitroprusiato fue disuelto en medio a una concentración de 0,6mM durante 8h. Los datos de luminisidad (D.O) de cada banda de proteínas se encuentran normalizados respecto al control.

I.3.2.- Expresión de Bcl-X_L en cultivos de SMC procedentes de pollos alimentados durante 20 días

La adición de 25-HO-Ch a los cultivos SMC (figura 29), de igual modo que ocurre con los cultivos del apartado anterior, provoca un aumento en los niveles de Bcl-X_L. Este aumento es especialmente significativo para los cultivos SMC-C, mientras que para los cultivos SMC-Ch-FO es muy pequeño.

El efecto del SNP sobre los cultivos SMC procedentes de pollos alimentados durante 20 días (figura30), muestra que la acción del SNP no produce variaciones significativas sobre los niveles de Bax en las SMC.

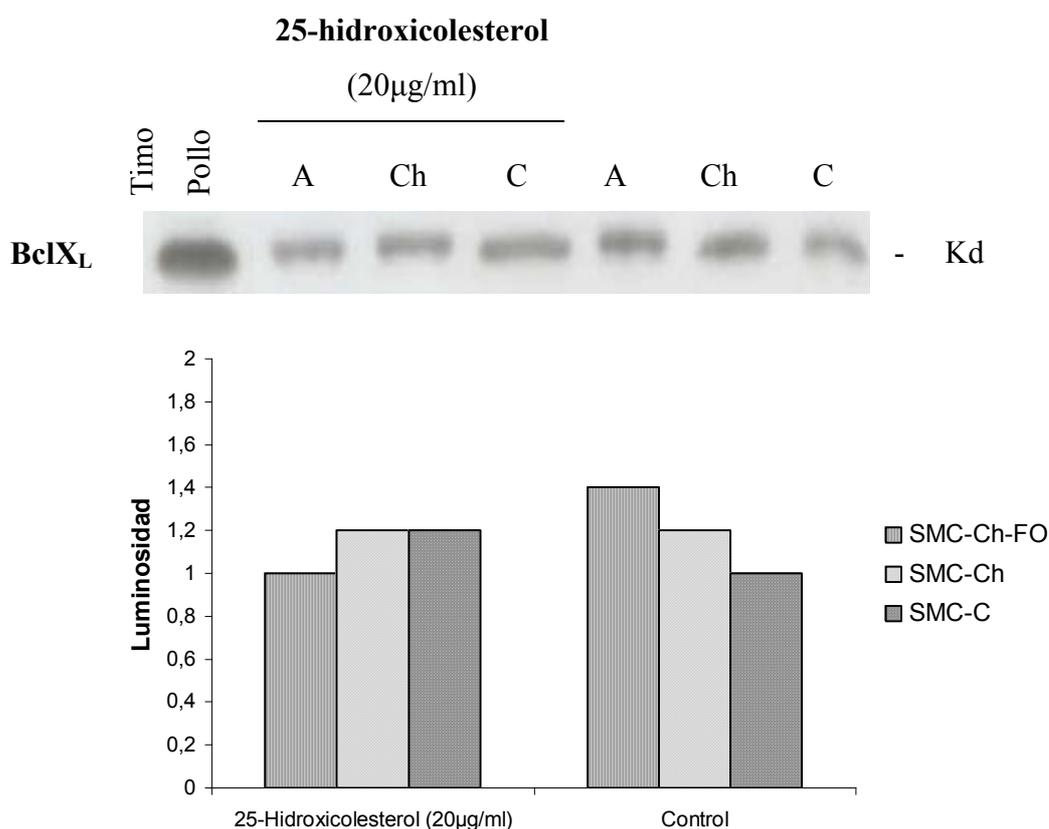


Figura 29. Efecto del 25-hidroxicolesterol sobre los niveles de expresión de Bcl X_L en células SMC provenientes de pollos de 20 días. Las células se cultivaron en DMEM al 5% de suero y se expusieron al 25-hidroxicolesterol a una concentración final de 20µg/ml durante 24 h. Los datos de luminosidad (D.O) de cada banda de proteínas se encuentran normalizados respecto al control

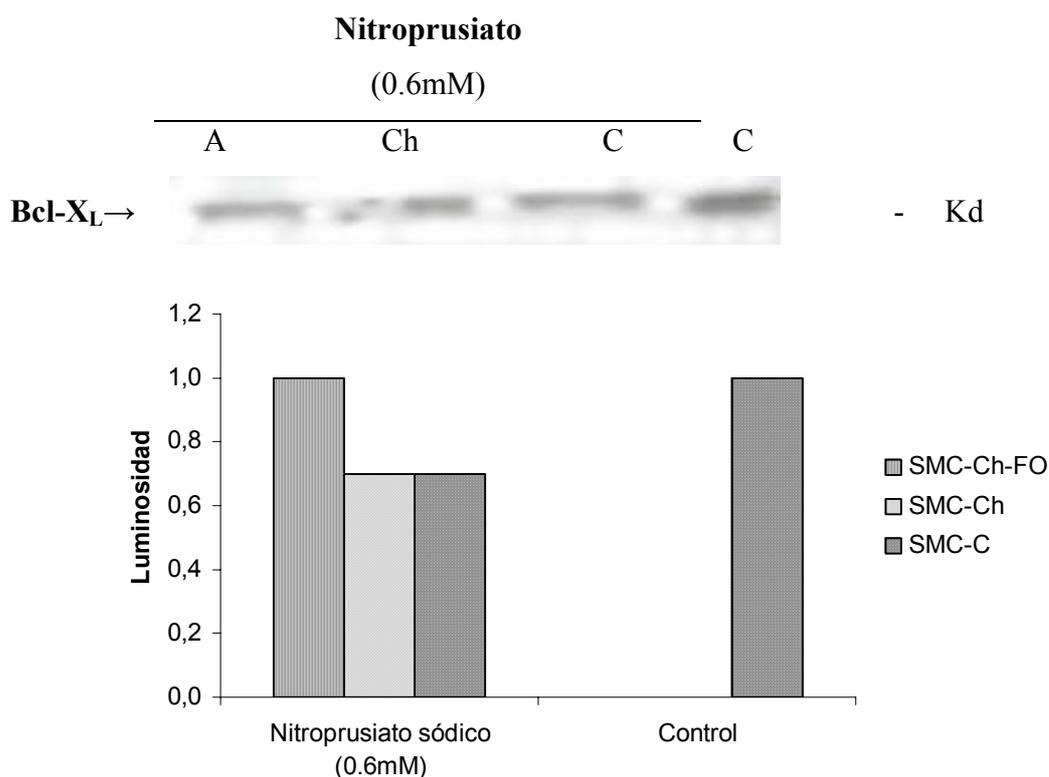


Figura 30 Efecto del nitroprusiato durante 8h sobre los niveles de expresión de Bcl-X_L en cultivo de células SMC provenientes de pollos de 20 días a una concentración de 0,6mM durante 8h. Los datos de luminosidad (D.O) de cada banda de proteínas se encuentran normalizados respecto al control

I.4.- Efecto del 25-hidroxicolesterol y del nitroprusiato sobre los niveles de expresión de Bcl-2 en cultivo de células SMC procedentes de pollos alimentados durante 20 días

Bcl-2 es un miembro de la familia Bcl-2, a la que da nombre. El mismo presenta una capacidad antiapoptótica. La sobreexpresión de Bcl-2 aumenta la supervivencia celular mediante la inhibición de la apoptosis inducida por un amplio rango de agentes inductores de muerte. Al igual que los anteriores, tiene la capacidad de formar homodímeros y heterodímeros con Bcl-X_L y Bax, siendo este uno de los niveles de regulación más importantes en la inducción de la apoptosis.

Como se puede observar en el gráfico 31, la adición de 25-OH-Ch provoca una disminución en los niveles de Bcl-2, especialmente en los cultivos SMC-Ch, mientras que para los cultivos SMC-Ch-FO provoca un ligero aumento.

La acción del SNP (gráfico31) produce una disminución muy significativa de la proteína Bcl-2, tanto para SMC-Ch como SMC-Ch-FO. Por el contrario los niveles para SMC-C aumentan ligeramente.

Por su parte, como se muestra en el gráfico 32, se puede observar una banda alrededor de los 35KD, que además muestra una variación con los tratamientos. Esta banda mantiene una relación casi inversa con nuestra banda de 26KD para Bcl-2. Debido a la especificidad del anticuerpo usado esta relación pudiera ser debida a la capacidad de Bcl-2 para formar homodímeros o heterodímeros. Así, esta banda se correspondería a un hetero/homodímero. Existen estudios en los que se muestra que el uso de detergentes no iónicos como Nonidet P-40 no disrumen los heterodímeros formados por Bax, el cual puede dimerizar con Bcl-2. De hecho, propician un cambio conformacional en Bax que facilita esta formación (322).

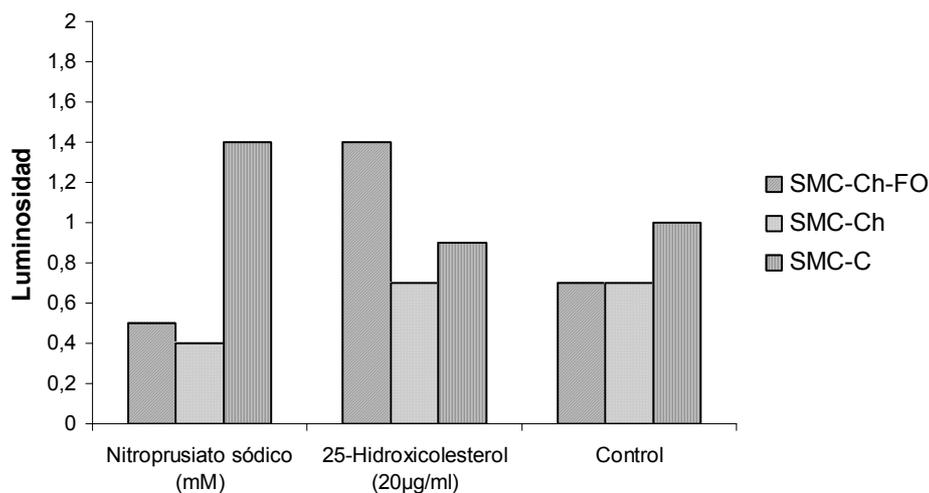
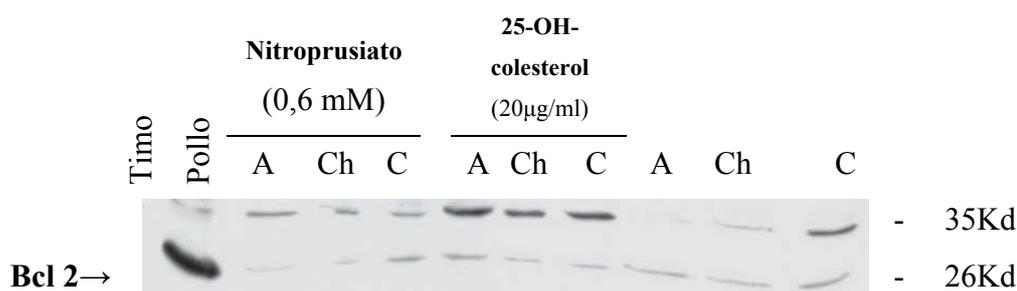


Figura 31. Efecto del 25-hidroxicolesterol y del nitroprusiato sobre los niveles de expresión de Bcl-2 en células SMC provenientes de pollos de 20 días. Las células se cultivaron en DMEM al 5% de suero y se expusieron al 25-hidroxicolesterol a una concentración final de 20µg/ml durante 24h. El nitroprusiato fue disuelto en medio a una concentración de 0,6mM durante 8h. Los datos de luminosidad (D.O) de cada banda de proteínas se encuentran normalizados respecto al control

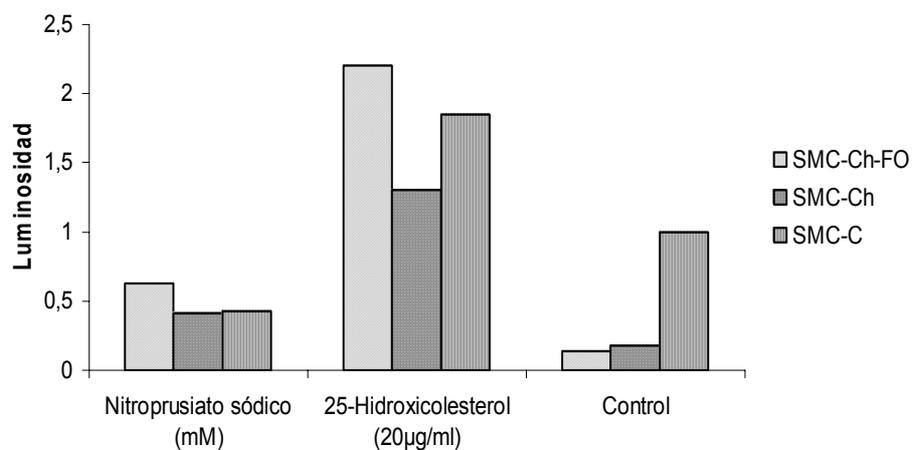


Figura 32. Niveles correspondientes a la banda de 35Kd del western para Bcl-2 mostrado en la figura 31.

I.5.- Proporción de expresión Bcl-2/Bcl-X_L y Bcl-2/Bax en los cultivos SMC

La acción del 25-Hidroxicolesterol sobre la relación antiapoptótico/proapoptótico está representada en la tabla 16. Se observa que tanto la relación Bcl-2/Bcl-X_L como Bcl-2/Bax está claramente disminuida y por tanto todos los valores se encuentran por debajo de 1.

Estas relaciones no varían especialmente entre SMC-C y SMC-Ch. Aún así, aunque la relación no varíe, la respuesta en ambos cultivos, tal y como hemos visto anteriormente, es distinta.

En el caso de las SMC-Ch-FO la relación Bcl-2/Bax aumenta respecto al control. Sin embargo, la relación Bcl-X_L/Bax permanece igual al de las SMC-C tras el tratamiento con 25-hidroxicolesterol.

	Bcl-X_L/Bax	Bcl-2/Bax
SMC-C	0.29	0.21
SMC-Ch	0.31	0.18
SMC-Ch-FO	0.27	0.38

Tabla 16.-Efecto del 25-hidroxicolesterol sobre las proporciones de expresión de Bcl X_L / Bax y Bcl-2 / Bax en cultivo de células SMC provenientes de pollos de 20 días. Las células se cultivaron en DMEM al 5% de suero y se expusieron al 25-hidroxicolesterol a una concentración final de 20µg/ml durante 24 h.

Respecto al nitroprusiato como productor de óxido nítrico, se observa en la tabla 17 que origina una intensa acción sobre las SMC-Ch, produciéndose un descenso muy considerable tanto en la relación Bcl-2/Bax como en la Bcl-X_L/Bax. Hay que destacar que la relación para Bcl-2/Bax no disminuye para las SMC-C.

En el caso de las SMC-Ch-FO, el óxido nítrico da lugar a una relación Bcl-X_L/Bax superior a las SMC-C, mientras que la relación Bcl-2/Bax disminuye aunque en un grado menor que para las SMC-Ch.

	Bcl-X _L /Bax	Bcl-2/Bax
SMC-C	0.63	1.27
SMC-Ch	0.63	0.36
SMC-Ch-FO	0.9	0.5

Tabla 17. Efecto del nitroprusiato sobre las proporciones de expresión de Bcl X_L / Bax y Bcl-2 / Bax en células SMC provenientes de pollos de 20 días. Las células se cultivaron en DMEM al 5% de suero y se expusieron a una concentración de 0,6mM durante 8h.

J.- CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE RT- PCR A TIEMPO-REAL

Con el fin de observar los cambios de expresión génica a nivel de mRNA, se realizó la cuantificación mediante RT-PCR semicuantitativa a tiempo-real usando para ello SYBR Green.

Se han estudiado los cambios de expresión a nivel de mRNA de genes implicados en el proceso apoptótico como son bcl-2, bcl-X_L, c-myc y p53 y caspasa-3 en los tres tipos de cultivo (SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO)

La expresión se ha medido tanto a nivel basal (tratamientos *in vivo*), como tras la adición de 25-hidroxicolesterol (20 µg/ml) durante 24h y tras la incubación con nitroprusiato sódico como dador de óxido nítrico (0.6 mM) durante 8h (tratamientos *in vitro*).

Una vez extraído el RNA total de los distintos cultivos, se procedió a su retrotranscripción. El cDNA obtenido se utilizó para realizar los siguientes experimentos:

- J.1) Cálculo de eficiencias de amplificación y linealidad de la reacción. Esto se realizó con dos fines: por un lado, el de conocer el valor de eficiencia de amplificación para cada gen; por otro, el de conocer la zona lineal de la reacción y, por tanto, la concentración óptima para la posterior cuantificación.
- J.2) Comprobación de la especificidad de producto de PCR. Determinamos la especificidad de nuestro producto amplificado mediante curvas de desnaturalización y electroforesis de los productos obtenidos en gel de agarosa.
- J.3) Cuantificación de la expresión mediante el modelo matemático descrito por Michael W. Pfaffl (318). Realizamos una cuantificación relativa respecto al control (SMC-C) y semicuantitativa respecto a la α -actina con el fin de obtener las proporciones de expresión de cada gen en las células SMC.

J.1.-Cálculo de eficiencias de amplificación

En la cuantificación relativa se determinan los cambios de expresión respecto a un gen, un estándar, el cual se debe expresar en un nivel constante y moderadamente abundante, es decir lo que se conoce como gen estructural o *housekeeping*.

Para nuestro experimento hemos escogido el gen que codifica para la β -actina, la cual es una proteína del citoesqueleto que se expresa en la mayoría de los tipos celulares y es ampliamente utilizada en los experimentos de cuantificación relativa.

Dado que la eficiencia de la reacción de amplificación de cada gen es distinta, para poder comparar el resto de mRNA en estudio (actina, bcl-2, bcl-X_L, c-myc, p53, caspasa-3) con el de la actina, es necesario conocer la eficiencia para cada uno de los genes.

Para realizar las curvas de eficiencia de nuestro experimento de cuantificación se realizaron las siguientes diluciones seriadas del cDNA para cada uno de los genes (actina, bcl-2, bcl-x, c-myc, p53, caspasa-3) y se ensayo cada dilución por duplicado:

1.- $2.5 \cdot 10^{-1}$; 2.- $5.0 \cdot 10^{-2}$; 3.- $1 \cdot 10^{-2}$; 4.- $2 \cdot 10^{-3}$; 5.- $4 \cdot 10^{-4}$; 6.- $8 \cdot 10^{-5}$.

La curva estándar se generó representando los valores obtenidos de C_p para cada dilución, frente al logaritmo del número inicial de copias. Una vez obtenido, se calculó la pendiente de la recta y, según la ecuación 6, explicada en material y métodos, se calculó la eficiencia de amplificación. En todos los casos la eficiencia obtenida estuvo entre 1.81 y 1.91, las cuales se consideran buenas eficiencias de amplificación, ya que éstas suelen estar por encima de 1.78.

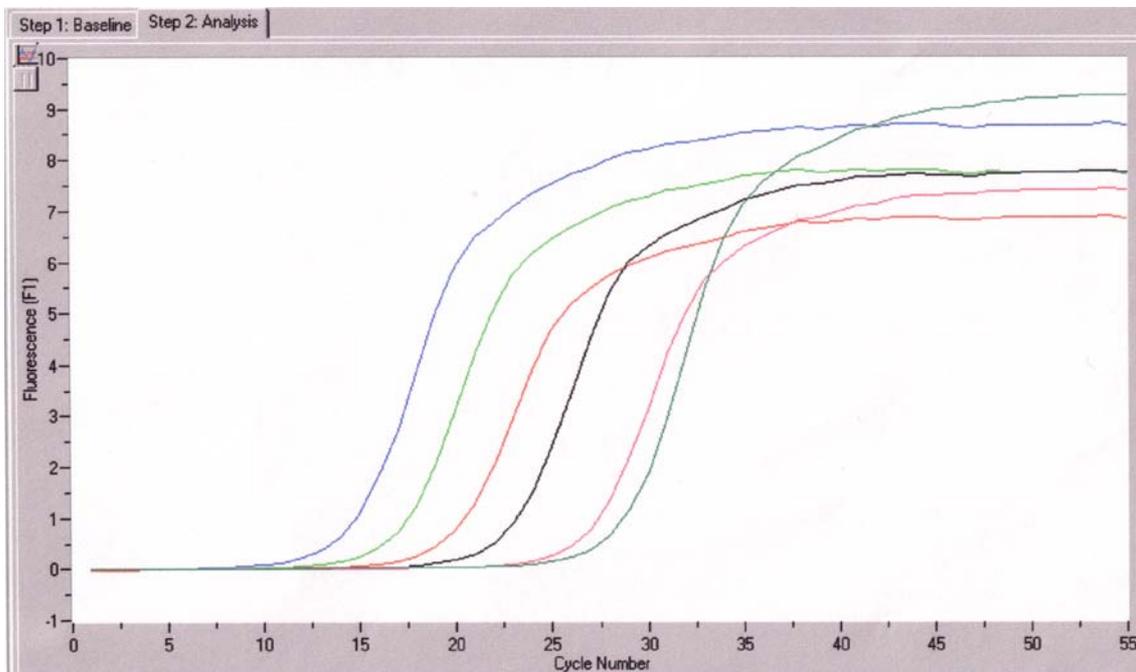
Hay que destacar que dado que lo que nos interesa es la pendiente de la curva y el grado de linealidad de la reacción, las unidades que se empleen son arbitrarias, por

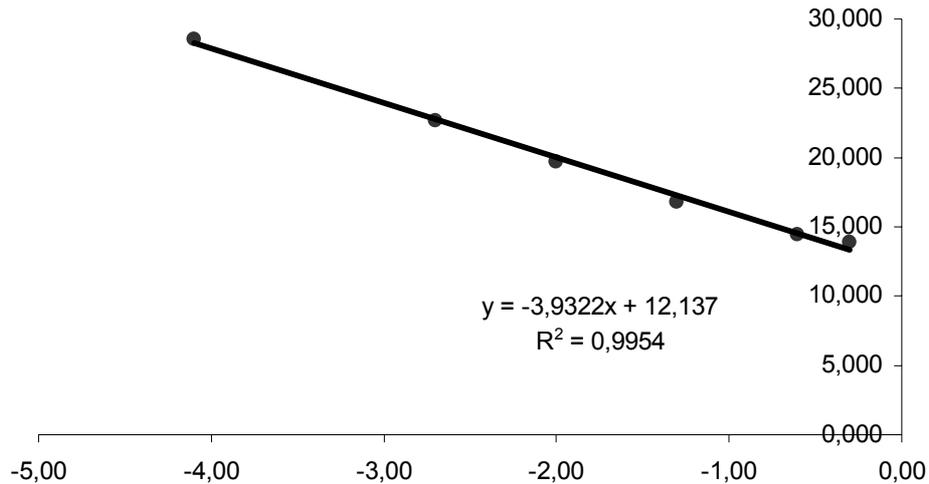
esta razón hemos representado el valor de las diluciones, las cuales son proporcionales al número inicial de copias.

A continuación se expone el cálculo de eficiencias para cada uno de los genes, junto con la linealidad de la reacción:

J.1.1.- Cálculo de eficiencias de amplificación para el gen de la β -actina

En la figura 33 se muestra el cálculo de eficiencia para el cDNA de Actina mediante la construcción de una recta en la que se representa el C_p de cada muestra (diluciones seriadas) respecto al log de la cantidad inicial. La pendiente obtenida es de 1.86, la cual es una buena eficiencia de amplificación. El rango de linealidad se puede observar tanto en los perfiles de amplificación de la reacción (gráfico superior), como por el coeficiente de regresión lineal que en este caso es de 0.995. Esto nos muestra que en todo este rango de diluciones tenemos una linealidad óptima.



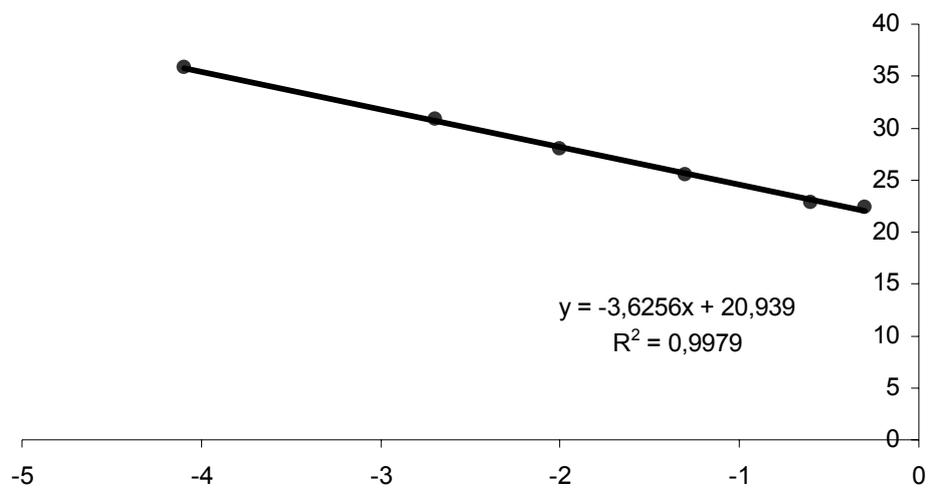
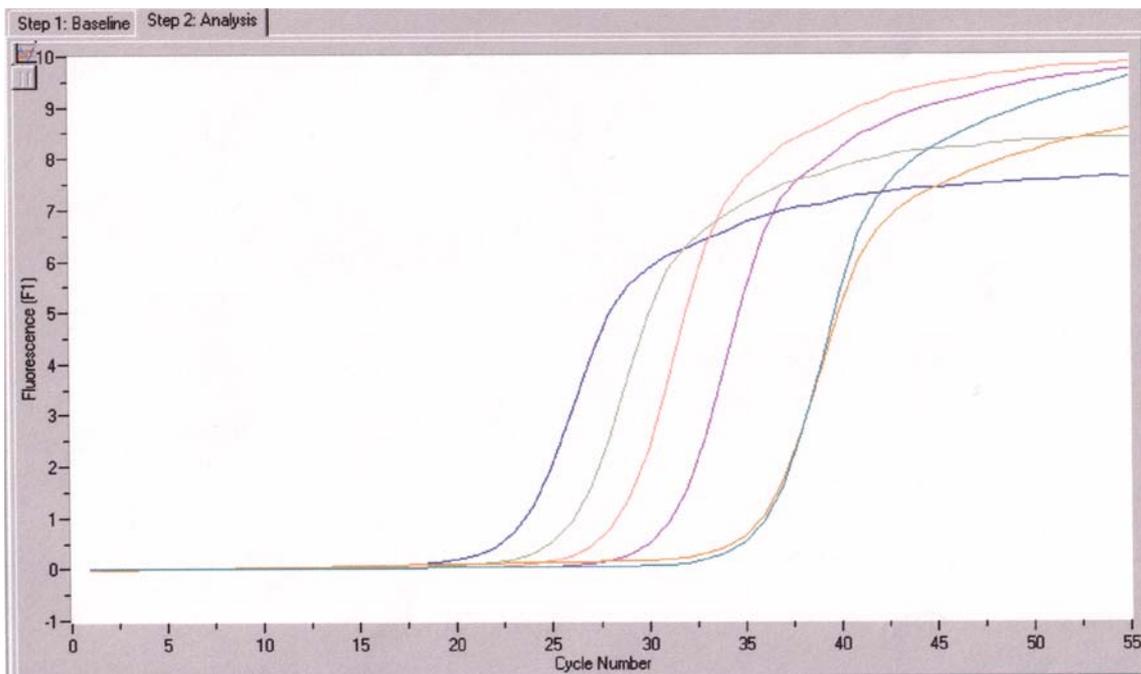


$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})} \rightarrow E = 1.86$$

Figura 33. Curva de amplificación y cálculo de eficiencia para el gen de la β -actina. Para realizar la curva de eficiencia se realizaron diluciones seriadas del cDNA de las SMC y se amplificó por PCR a tiempo-real el gen de la β -actina. Se representaron los valores de Cp obtenidos en cada dilución y se calculó la eficiencia de amplificación.

J.1.2.- Cálculo de eficiencias de amplificación para el gen de Bcl-2

Al igual que en el caso anterior, la figura 34 muestra el cálculo de eficiencia para el cDNA de Bcl-2 mediante la construcción de una recta en la que se representa el Cp de cada muestra (diluciones seriadas) respecto al log de la cantidad inicial. De esta forma, puede comprobarse como la pendiente obtenida (1.89) entra dentro del rango que se considera como eficiencia de amplificación muy buena. Por su parte, el rango de linealidad se puede observar tanto en los perfiles de amplificación de la reacción (gráfico superior), como por el coeficiente de regresión lineal que en este caso es de 0.998. Esto nos muestra que en todo este rango de diluciones tenemos una linealidad óptima.

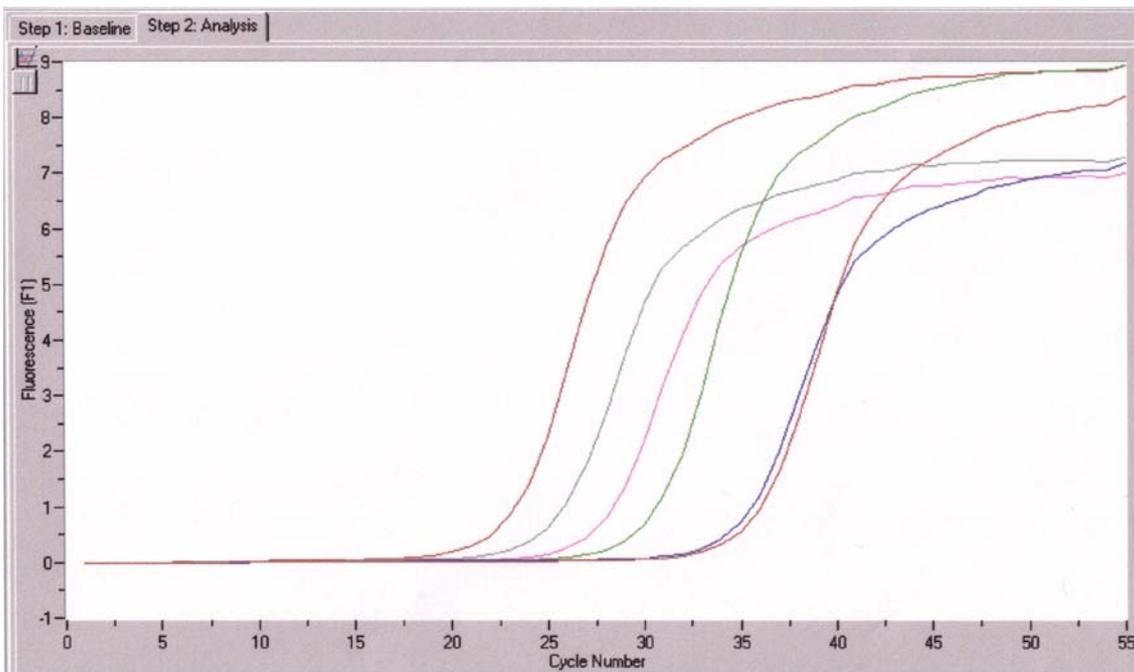


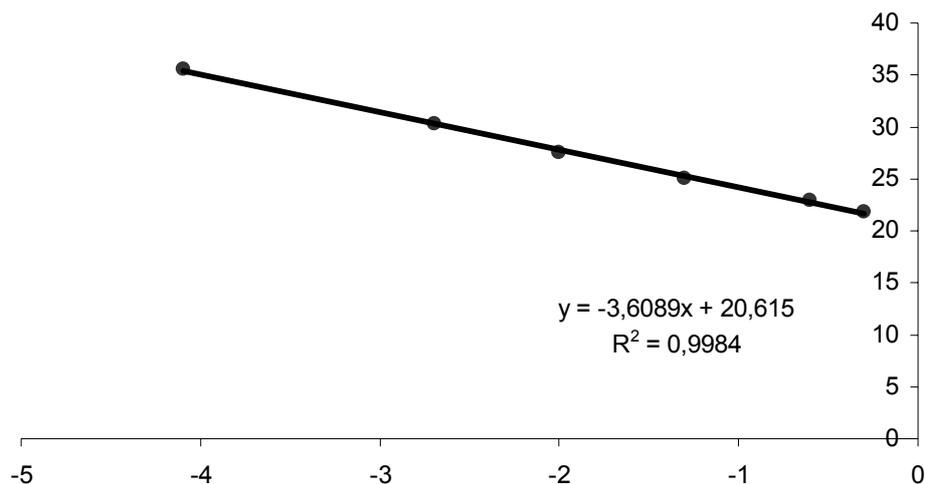
$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})} \rightarrow \mathbf{E = 1.89}$$

Figura 34. Curva de amplificación y cálculo de eficiencia para el gen *bcl-2*. Para realizar la curva de eficiencia se realizaron diluciones seriadas del cDNA de las SMC y se amplificó por PCR a tiempo-real el gen de la *Bcl-2*. Se representaron los valores de C_p obtenidos en cada dilución y se calculó la eficiencia de amplificación.

J.1.3.- Cálculo de eficiencias de amplificación para el gen de *bcl-X_L*

Como se puede observar, en la figura 35 se muestra el cálculo de eficiencia para el cDNA de *bcl-X_L* mediante la construcción de una recta en la que se representa el C_p de cada muestra (diluciones seriadas) respecto al log de la cantidad inicial. La pendiente obtenida es de 1.9, la cual es una eficiencia de amplificación muy buena. El rango de linealidad se puede observar tanto en los perfiles de amplificación de la reacción (gráfico superior), como por el coeficiente de regresión lineal que en este caso es de 0.998. Esto nos muestra que en todo este rango de diluciones tenemos una linealidad óptima.



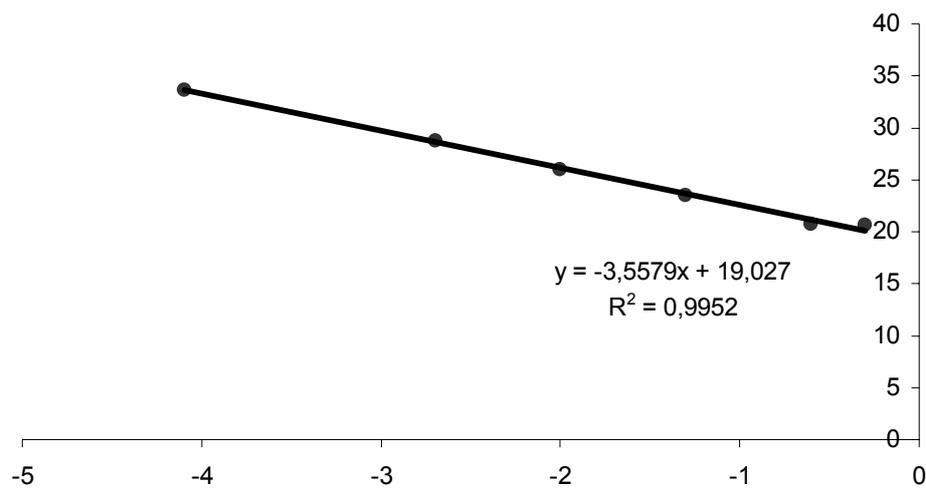
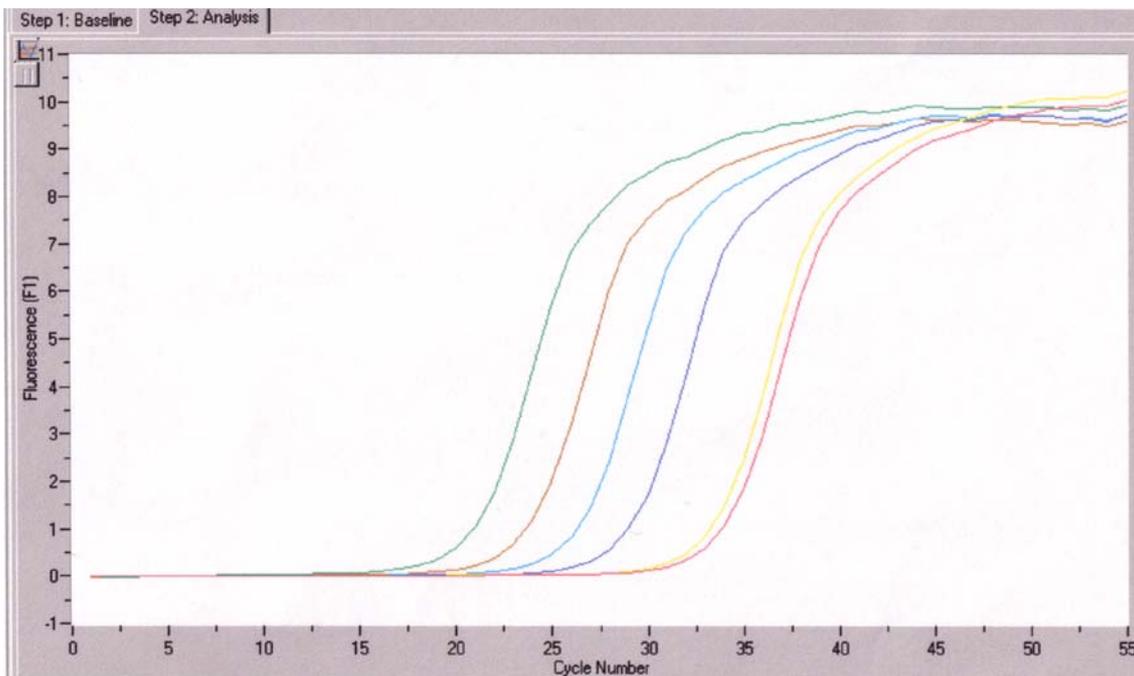


$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})} \rightarrow E = 1,9$$

Figura 35. Curva de amplificación y cálculo de eficiencia para el gen $bcl-X_L$. Para realizar la curva de eficiencia se realizaron diluciones seriadas del cDNA de las SMC y se amplificó por PCR a tiempo-real el gen de la $Bcl-X_L$. Se representaron los valores de C_p obtenidos en cada dilución y se calculó la eficiencia de amplificación.

J.1.4.- Cálculo de eficiencias de amplificación para el gen de c-myc

En la figura 36 se muestra el cálculo de eficiencia para el cDNA de c-myc mediante la construcción de una recta en la que se representa el C_p de cada muestra (diluciones seriadas) respecto al log de la cantidad inicial. Con respecto a la pendiente, ésta ha quedado establecida en 1,91, que, al igual que en los casos anteriores, es considerada como una eficiencia en la amplificación muy buena. Igualmente, el rango de linealidad se puede observar tanto en los perfiles de amplificación de la reacción (gráfico superior), como por el coeficiente de regresión lineal que en este caso es de 0.995. Estos resultados nos confirman que en todo este rango de diluciones tenemos una linealidad óptima.

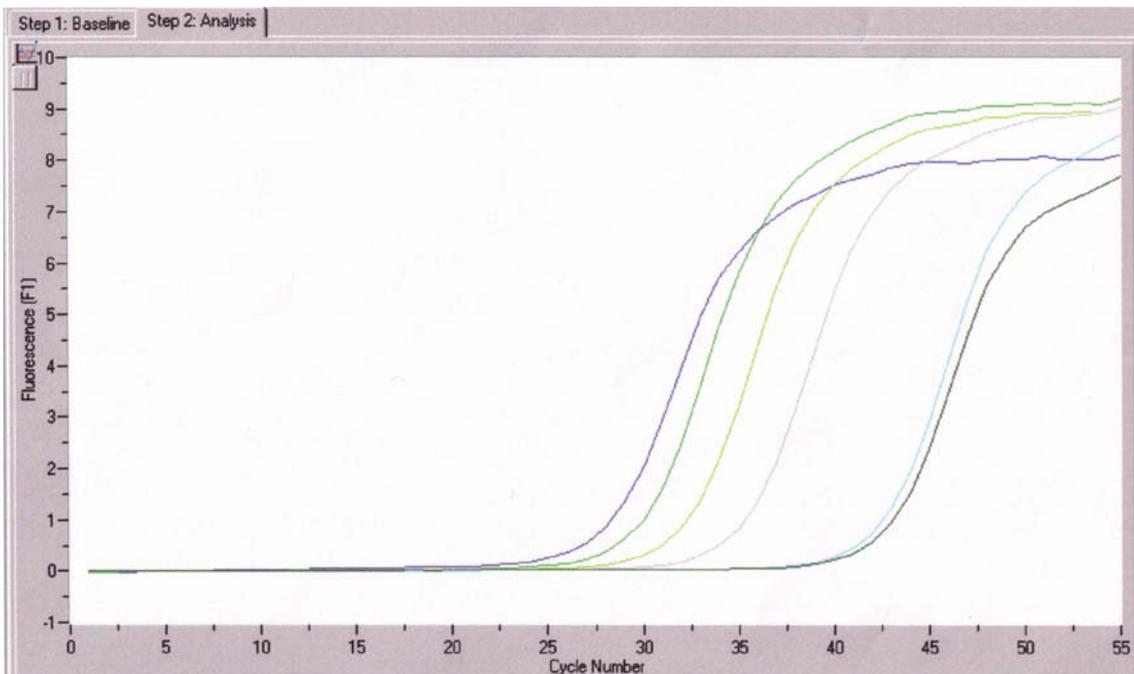


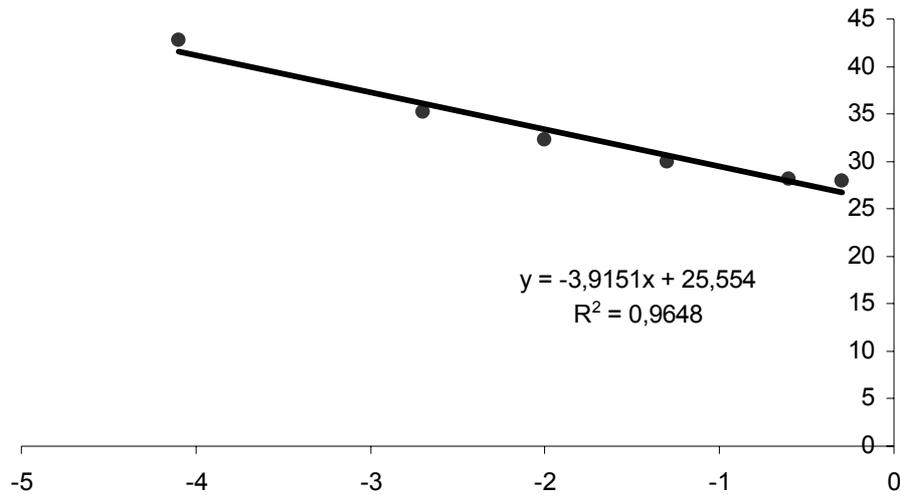
$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})} \rightarrow E = 1.91$$

Figura 36. Curva de amplificación y cálculo de eficiencia para el gen de c-myc. Para realizar la curva de eficiencia se realizaron diluciones seriadas del cDNA de las SMC y se amplificó por PCR a tiempo-real el gen de la c-myc. Se representaron los valores de Cp obtenidos en cada dilución y se calculó la eficiencia de amplificación.

J.1.5.- Cálculo de eficiencias de amplificación para el gen de p53

Para el caso del cDNA de p53, en la figura 37 puede observarse el cálculo de su eficiencia mediante la construcción de una recta en la que se representa el Cp de cada muestra (diluciones seriadas) respecto al log de la cantidad inicial. En este caso, la pendiente obtenida es de 1.81, que igualmente es considerada como una buena eficiencia de amplificación. Por otro lado, el rango de linealidad se puede observar tanto en los perfiles de amplificación de la reacción (gráfico superior), como por el coeficiente de regresión lineal (0.964). Todo ello nos demuestra que en todo este rango de diluciones tenemos una linealidad óptima.



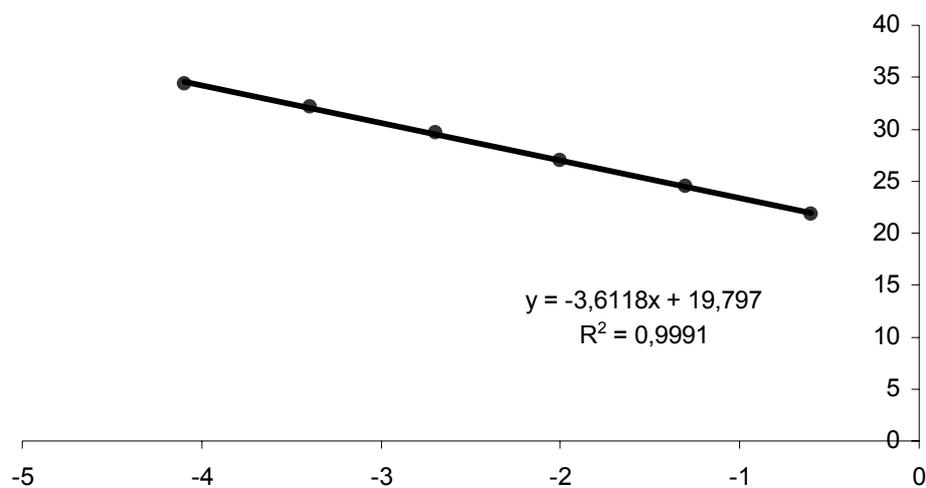
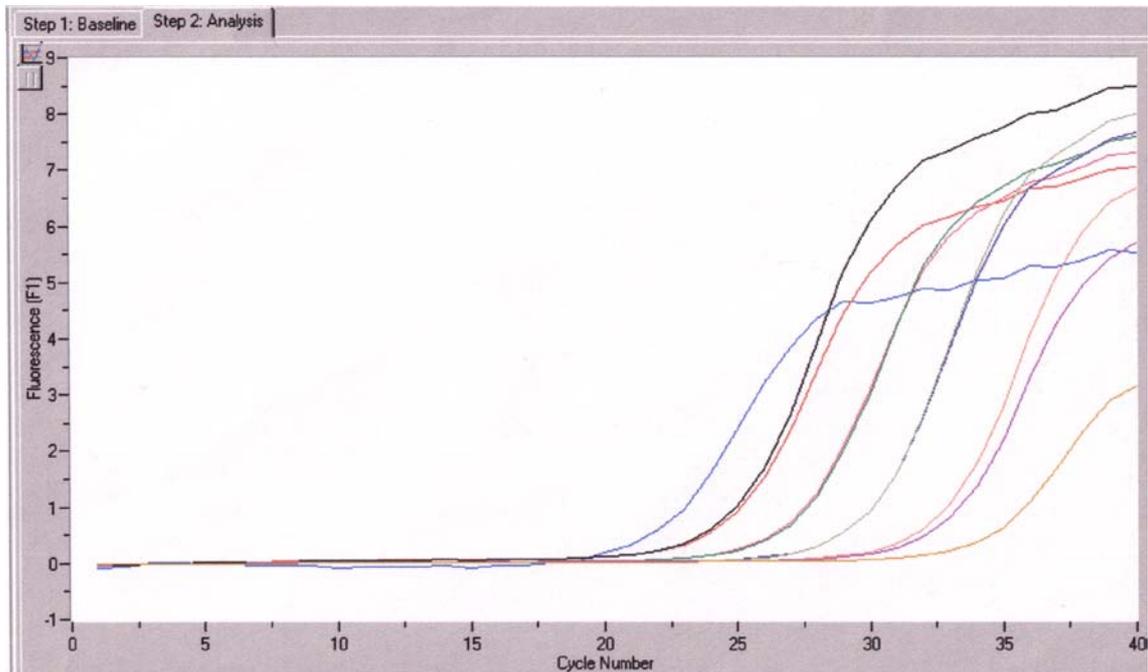


$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})} \rightarrow E = 1.81$$

Figura 37. Curva de amplificación y cálculo de eficiencia para el gen de p53. Para realizar la curva de eficiencia se realizaron diluciones seriadas del cDNA de las SMC y se amplificó por PCR a tiempo-real el gen de la p53. Se representaron los valores de Cp obtenidos en cada dilución y se calculó la eficiencia de amplificación.

J.1.6.- Cálculo de eficiencias de amplificación para el gen de caspasa-3

Por último, en la figura 38 se muestra el cálculo de eficiencia para el cDNA de caspasa-3 mediante la construcción de una recta en la que se representa el Cp de cada muestra (diluciones seriadas) respecto al log de la cantidad inicial. Para el caso de esta eficiencia, la pendiente obtenida es de 1.9, la cual es una eficiencia de amplificación muy buena. Al igual que en los otros casos, el rango de linealidad se puede observar tanto en los perfiles de amplificación de la reacción (gráfico superior), como por el coeficiente de regresión lineal (0.999). Por tanto, tenemos una linealidad óptima en todo este rango de diluciones, como confirman estos resultados.



$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})} \rightarrow E = 1.9$$

Figura 38. Curva de amplificación y cálculo de eficiencia para el gen de caspasa-3. Para realizar la curva de eficiencia se realizaron diluciones seriadas del cDNA de las SMC y se amplificó por PCR a tiempo-real el gen de caspasa-3. Se representaron los valores de C_p obtenidos en cada dilución y se calculó la eficiencia de amplificación.

En consecuencia y dado que el rango de amplificación guarda una gran linealidad para todos los genes y diluciones estudiados, se escogió una dilución intermedia de todas las estudiadas, en concreto 1/100 para los estudios de cuantificación posteriores.

J.2.- Comprobación de la especificidad del producto de PCR

Para realizar la comprobación de la especificidad del producto de PCR se llevó a cabo el análisis de curvas de desnaturalización

El SYBR Green I puede unirse a subproductos de la reacción de PCR que se encuentran en forma de doble cadena, como son los dímeros de los cebadores, que generan un fondo de fluorescencia. Igualmente se une a productos no específicos de la PCR generados por condiciones subóptimas de amplificación.

Con el sistema light Cycler es posible confirmar la identidad del producto amplificado a través del análisis de la curva de desnaturalización. Éste es uno de los programas incorporados en el software del sistema. El mismo consiste en inducir, tras completar los ciclos de amplificación, un aumento controlado de la temperatura dentro de la cámara térmica, detectándose la fluorescencia a intervalos muy cortos. El seguimiento del proceso permite observar la cinética de desnaturalización de la población de DNAs dentro del tubo de reacción. Cuando el DNA empieza a desnaturalizarse, el SYBR Green I es liberado DNAs, produciéndose un descenso paulatino de la fluorescencia. Esto permite conocer la homogeneidad de la población de DNAs generada y la determinación de la temperatura de desnaturalización (T_m) de las muestras. Como cada población de DNAs tiene su T_m específica, este conocimiento permite la confirmación de la identidad del producto y la diferenciación de los productos inespecíficos. Esto nos permite modificar los parámetros de la reacción, si fuese necesario, y, en consecuencia incrementar la especificidad del proceso llevado a cabo por el sistema.

Con este fin el cDNA de SMC para los genes de actina, bcl-2, bcl-X_L, c-myc, p53, caspasa-3, se amplificaron según el protocolo expuesto en material y métodos. Se llevo a cabo el ciclo de desnaturalización, según los parámetros expuestos en material y métodos y se analizaron los resultados obtenidos, los cuales se presentan a continuación:

J.2.1.- Análisis de la curva de desnaturalización para el gen de actina

Como se puede observar en la figura 39, se muestra un solo pico que corresponde al producto de desnaturalización de la actina. No se observan dímeros de cebador, los cuales aparecerían por delante del producto específico y la T_m del producto está alrededor de 87.5° C.

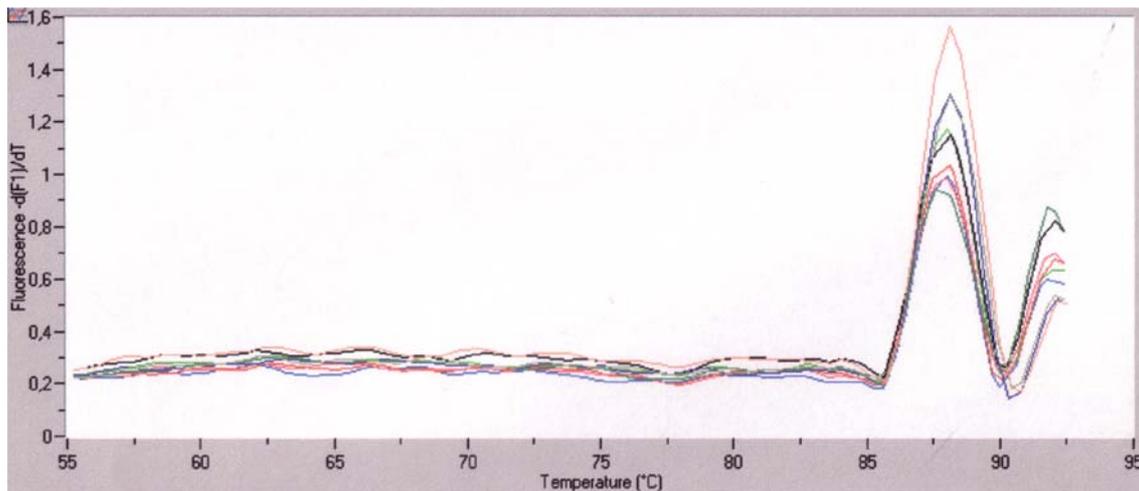


Figura.39. Curva de desnaturalización para **Actina**

J.2.2.- Análisis de la curva de desnaturalización para el gen de bcl-2

Por su parte, en la figura 40 se puede observar un solo pico que corresponde al producto de desnaturalización de bcl-2. Igualmente, no se observan dímeros de cebador, y la T_m del producto está alrededor de 86° C.

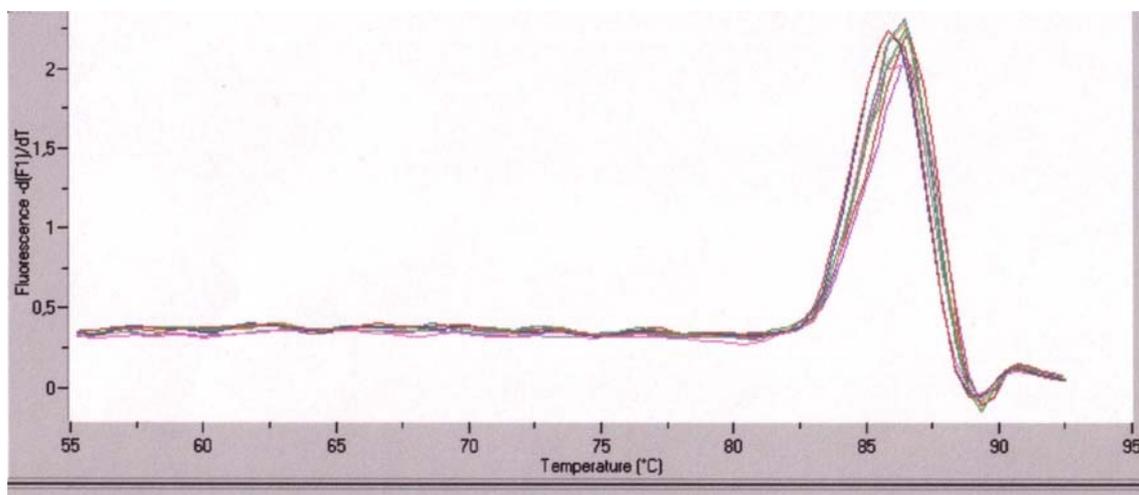


Figura.40. Curva de desnaturalización para **bcl-2**

J.2.3.- Análisis de la curva de desnaturalización para el gen de *bcl-X_L*

En la figura 41, se puede observar igualmente un solo pico que corresponde al producto de desnaturalización de *bcl-X_L*. Como en los anteriores casos, no se observan dímeros de cebador. Por su parte, la T_m del producto está alrededor de 90° C.

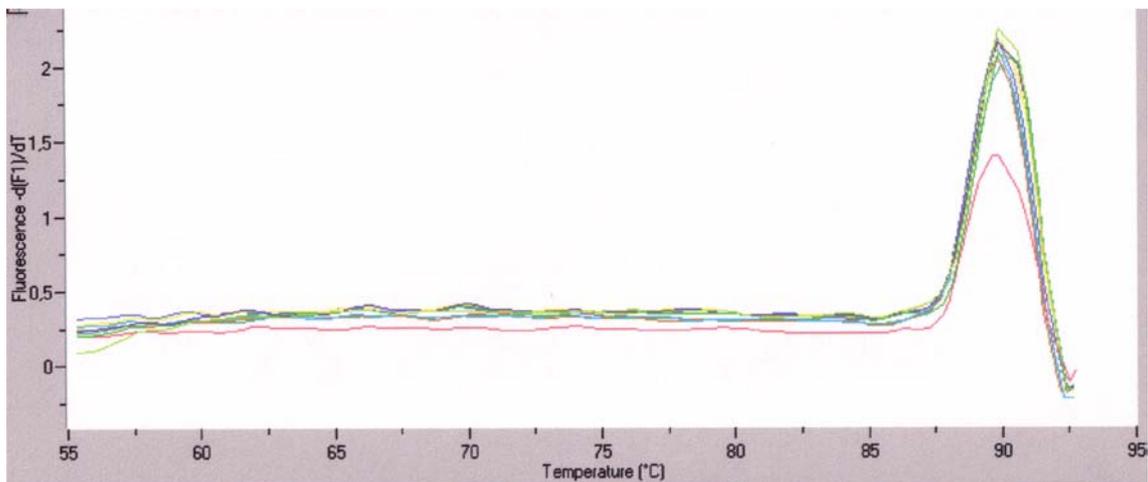


Figura.41. Curva de desnaturalización para *bcl-X_L*

J.2.4.- Análisis de la curva de desnaturalización para el gen de *c-myc*

Como se puede observar en la figura 42, se muestra un solo pico que corresponde al producto de desnaturalización de *c-myc*. Así mismo, no se observan dímeros de cebador. Con respecto a la T_m del producto, ésta se encuentra alrededor de 88.5° C.

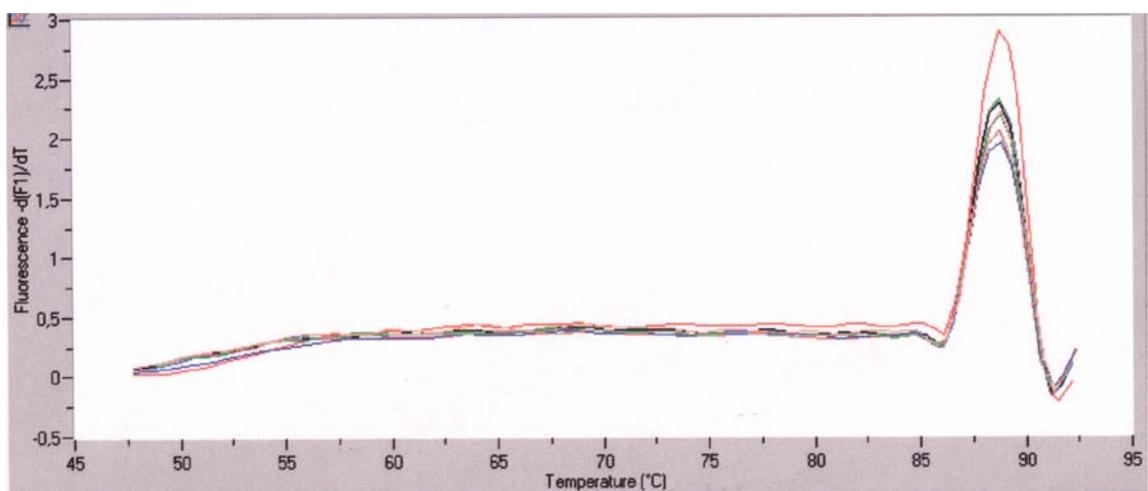


Figura.42. Curva de desnaturalización para *c-myc*

J.2.5.- Análisis de la curva de desnaturalización para el gen de p53

En la figura 43, se observa un solo pico que corresponde al producto de desnaturalización de p53. Con respecto a los posibles dímeros de cebador, estos no se pueden observar en la figura. Por su parte, la T_m del producto está alrededor de 92° C.

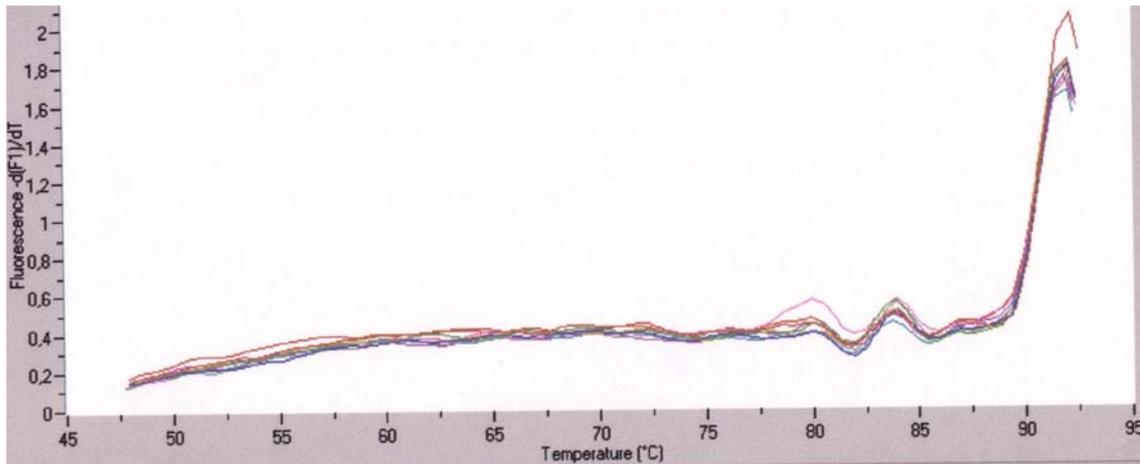


Figura.43. Curva de desnaturalización para p53

J.2.6.- Análisis de la curva de desnaturalización para el gen de caspasa-3

Finalmente, para el caso de la caspasa-3, los resultados se muestran en la figura 44. En la misma, se observa un solo pico que corresponde al producto de desnaturalización de este gen. No se observan dímeros de cebador. Con respecto a la T_m del producto, ésta se ha situado alrededor de 88.5° C.

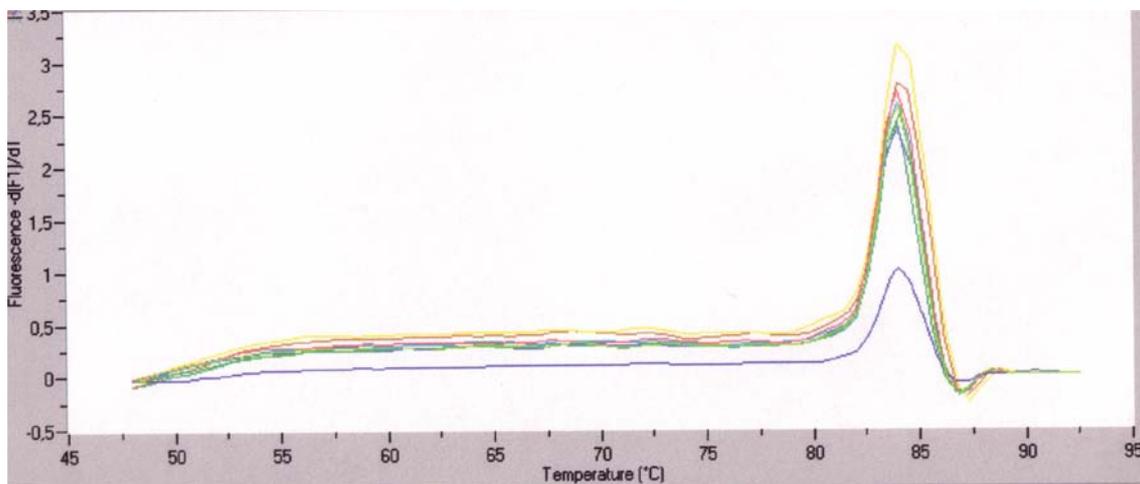


Figura.44. Curva de meeting para caspasa-3

J.3.- Cuantificación relativa de la expresión génica para los genes bcl-2, bcl-X_L, c-myc, p53, caspasa-3

La cuantificación relativa se basa en la expresión relativa de un gen problema respecto a un gen de referencia. De esta manera se obtiene una proporción de expresión relativo, lo que nos permite investigar los cambios fisiológicos en la expresión génica.

El gen de referencia suele ser de expresión constante, lo que se conoce como gen estructural o *housekeeping*. Estos suelen estar presentes en todos los tipos celulares, ya que son necesarios para las funciones básicas de la célula. El problema es que se ha visto que estos genes están regulados y que pueden variar bajo determinadas condiciones experimentales.

Por esta razón se Michael W. Pfaffl (318) ha desarrollado un método matemático de cuantificación basado únicamente en los incrementos de Cp de la muestra respecto al control y en las eficiencias de amplificación. Los incrementos del gen problema son normalizados con los incrementos respecto al gen de referencia (*housekeeping*). De esta manera se corrigen las variaciones que este pueda sufrir por las condiciones experimentales.

Además de este nivel de control general, se añaden diversos puntos de control con el fin de estandarizar cada reacción, como son las variaciones que se pueden producir por la integridad del RNA, la eficiencia de la RT, o las pequeñas variaciones en la cantidad de DNA carga en los capilares.

Los cDNA del gen de referencia β -actina y de los genes a estudiar (bcl-2, bcl-X_L, c-myc, p53, caspasa-3), de los distintas muestras de cultivos procedentes de los tratamientos *in vivo*: SMC-C, SMC-Ch, SMC-CH-FO, e *in vitro*: SMC-C, SMC-Ch, SMC-CH-FO tratadas con 25-hidroxicolesterol y SMC-C, SMC-Ch, SMC-CH-FO tratadas con nitroprusiato se diluyeron previamente 1/100, teniendo en cuenta los datos obtenidos para la linealidad en las curvas de eficiencia. Se amplificaron según el

protocolo expuesto anteriormente, y se obtuvieron los resultados de Cp para cada muestra y gen.

Con estos valores de Cp y los de eficiencias se aplicó la fórmula descrita por Michael W. Pfaffl y expuesta como Ec.7 en Material y Métodos. Los resultados obtenidos como proporciones de expresión respecto al control se describen a continuación:

J.3.1.- Análisis de la expresión de bcl-2 en SMC-C, SMC-Ch y SMC-CH-FO a nivel basal, tras la adición de 25-Hidroxicolesterol y nitroprusiato

Como se puede observar en la figura 44, a nivel basal la expresión de bcl-2 parece estar ligeramente disminuida para las SMC-Ch, mientras que para las SMC-CH-FO, se encuentra ligeramente aumentada.

La adición de 25-hidroxicolesterol provoca un aumento en la expresión de bcl-2 en los tres tipos celulares, especialmente en las SMC-Ch.

La acción del nitroprusiato como donador de óxido nítrico provoca una ligera disminución en los niveles de bcl-2 para las SMC-Ch y SMC-Ch-FO. Por el contrario para las SMC-C, se produce un ligero aumento.

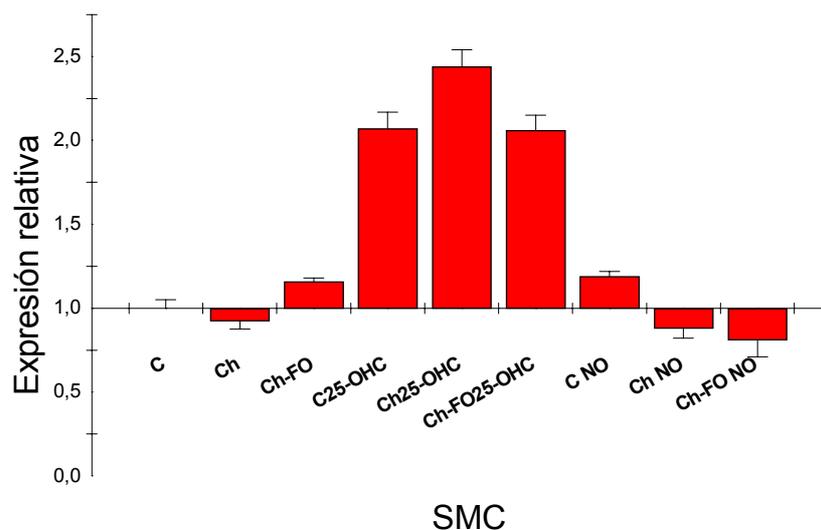


Figura 44. Análisis de las proporciones de expresión para el mRNA de bcl-2 mediante PCR a tiempo-Real, tanto a nivel basal (C,Ch,Ch-FO); tras la adición de 20 μ g/ml de 25-hidroxicolesterol durante 24 horas (C25-OHCol, Ch 25-OHCol, Ch-FO 25-OHCol); y de 0,6mM de Nitroprusiato durante 8 horas (C NO, Ch NO, Ch-FO NO). Los resultados están expresados respecto al control (SMC-C).

C	Ch	Ch-FO	C-25	Ch-25	Ch-FO-25	C-NO	Ch-NO	Ch-FO-NO
1,00	0,99	1,16	2,07	2,44	2,06	1,19	0,88	0,81

Tabla 18. Datos representados en la figura 44.

J.3.2.- Análisis de la expresión de bcl-X_L en SMC-C, SMC-Ch y SMC-CH-FO a nivel basal, tras la adición de 25-Hidroxicolesterol y nitroprusiato

A nivel basal no se aprecian grandes diferencias, aunque nuevamente encontramos que para las SMC-Ch la expresión de bcl-X_L está ligeramente disminuida.

Al adicionar 25-hidroxicolesterol aumenta notablemente la expresión en los tres tipos de cultivo, especialmente para SMC-C y SMC-Ch-FO. Aunque a nivel de

proteínas se produce una disminución, la explicación podría ser la misma que para bcl-2.

La acción de óxido nítrico provoca una disminución en los niveles de bcl-X_L. Esta disminución es especialmente significativa para las SMC-Ch.

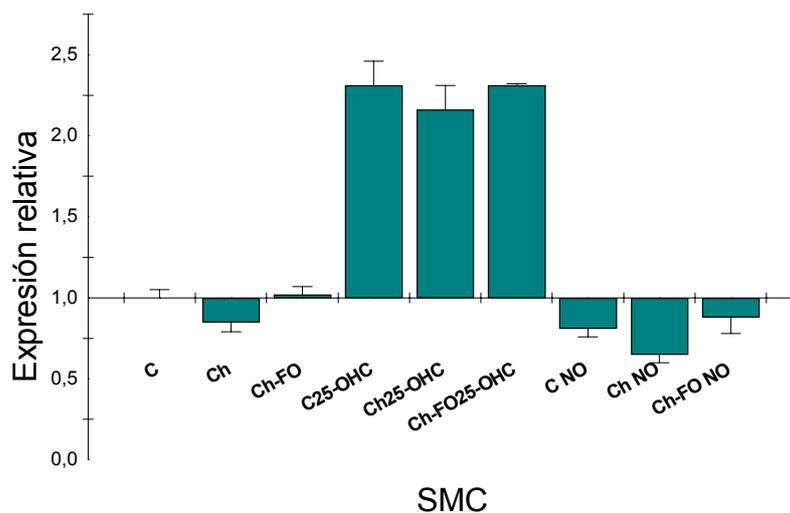


Figura 45. Análisis de las proporciones para el mRNA de expresión de bcl-X_L mediante PCR a tiempo-Real, tanto a nivel basal (C,Ch,Ch-FO); tras la adición de 20µg/ml de 25-hidroxicolesterol durante 24 horas (C25-OHCol, Ch 25-OHCol, Ch-FO 25-OHCol); y de 0,6mM de Nitroprusiato durante 8 horas (C NO, Ch NO,Ch-FO NO). Los resultados están expresados respecto al control (SMC-C).

C	Ch	Ch-FO	C-25	Ch-25	Ch-FO-25	C-NO	Ch-NO	Ch-FO-NO
1,00	0,85	1,02	2,31	2,16	2,31	0,81	0,65	0,88

Tabla 19. Datos representados en la figura 45.

J.3.3.- Análisis de la expresión de c-myc en SMC-C, SMC-Ch y SMC-CH-FO a nivel basal, tras la adición de 25-Hidroxicolesterol y nitroprusiato

A nivel basal no se aprecian grandes diferencias de expresión, aunque se muestra una cierta elevación en los niveles de c-myc para SMC-Ch-FO.

El 25-hidroxicolesterol provoca un gran incremento en la expresión de c-myc especialmente para SMC-Ch y menor para las SMC-Ch-FO. Este aumento se produce también tras la adición de óxido nítrico, especialmente para las SMC-C. Sin embargo, se produce en menor nivel para las SMC-Ch y aún menor para las SMC-Ch-FO.

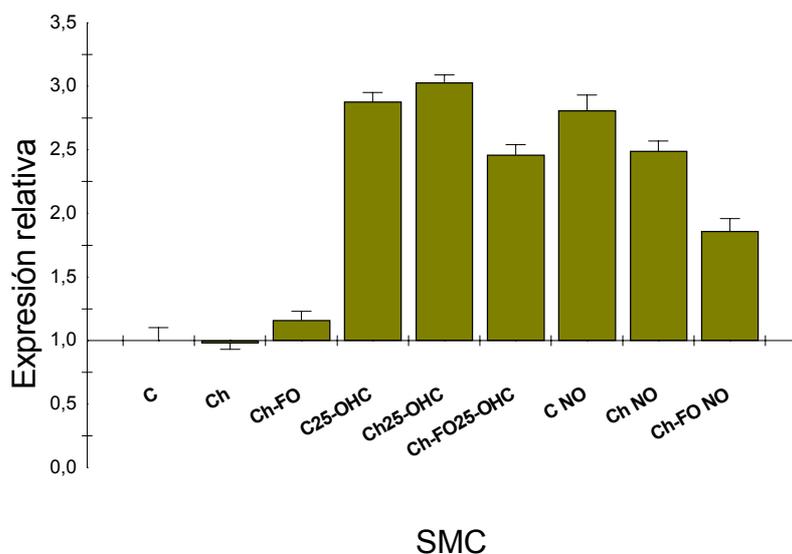


Figura 46. Análisis de las proporciones de expresión para el mRNA de c-myc mediante PCR a tiempo-Real, tanto a nivel basal (C,Ch, Ch-FO); tras la adición de 20µg/ml de 25-hidroxicolesterol durante 24 horas (C25-OHCol, Ch 25-OHCol, Ch-FO 25-OHCol); y de 0,6mM de Nitroprusiato durante 8 horas (C NO, Ch NO, Ch-FO NO). Los resultados están expresados respecto al control (SMC-C).

C	Ch	Ch-FO	C-25	Ch-25	Ch-FO-25	C-NO	Ch-NO	Ch-FO-NO
1,00	0,98	1,16	2,88	3,03	2,46	2,81	2,49	1,86

Tabla 20. Datos representados en la figura 46.

J.3.4.- Análisis de la expresión de p53 en SMC-C, SMC-Ch y SMC-CH-FO a nivel basal, tras la adición de 25-Hidroxicolesterol y nitroprusiato

A nivel basal hay que destacar que p53 se encuentra elevado para las SMC-Ch-FO.

Con respecto al 25-hidroxicolesteol, este provoca un gran aumento en los tres tipos de cultivo. Sin embargo el óxido nítrico provoca una elevación discreta en los niveles de p53, especialmente para las SMC-Ch en las cuales casi no varía la expresión respecto al nivel basal.

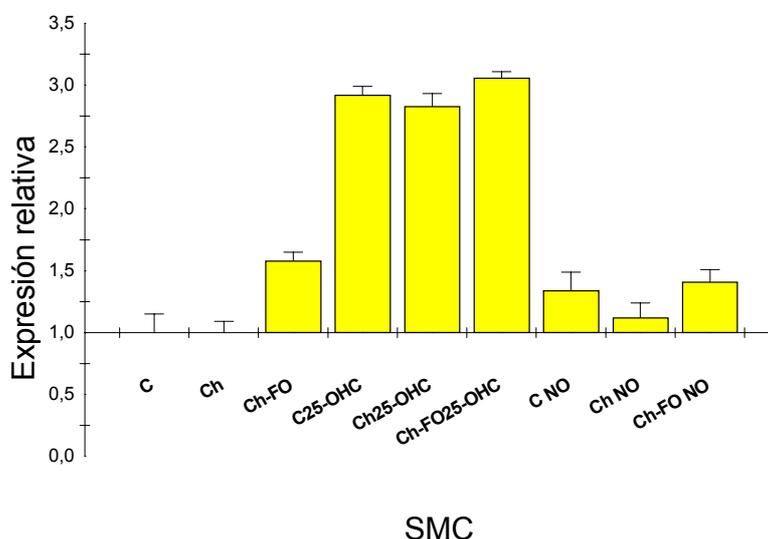


Figura 47. Análisis de las proporciones de expresión para el mRNA de p53 mediante PCR a tiempo Real, tanto a nivel basal (C,Ch, Ch-FO); tras la adición de 20µg/ml de 25-hidroxicolesterol durante 24 horas (C25OHC, Ch 25OHC, Ch-FO 25OHC); y de 0,6mM de Nitroprusiato durante 8 horas (C NO, Ch NO, Ch-FO NO). Los resultados están expresados respecto al control (SMC-C).

C	Ch	Ch-FO	C-25	Ch-25	Ch-FO-25	C-NO	Ch-NO	Ch-FO-NO
1,00	1,00	1,58	2,92	2,83	3,06	1,34	1,12	1,41

Tabla 21. Datos representados en la figura 47.

J.3.5.- Análisis de la expresión de caspasa-3 en SMC-C, SMC-Ch y SMC-CH-FO a nivel basal, tras la adición de 25-Hidroxicolesterol y nitroprusiato

Como se puede observar en la figura 48, a nivel basal la expresión de caspasa-3 es muy similar en los tres tipos de cultivos aunque parece estar ligeramente disminuida para las SMC-Ch.

Al adicionar 25-hidroxicolesterol se provoca un gran aumento en la expresión de caspasa-3 en los tres tipos celulares, especialmente en las SMC-C y menor para las SMC-Ch.

La acción del nitroprusiato como donador de óxido nítrico provoca una ligera disminución en los niveles de caspasa-3 en las SMC, especialmente para las SMC-Ch.

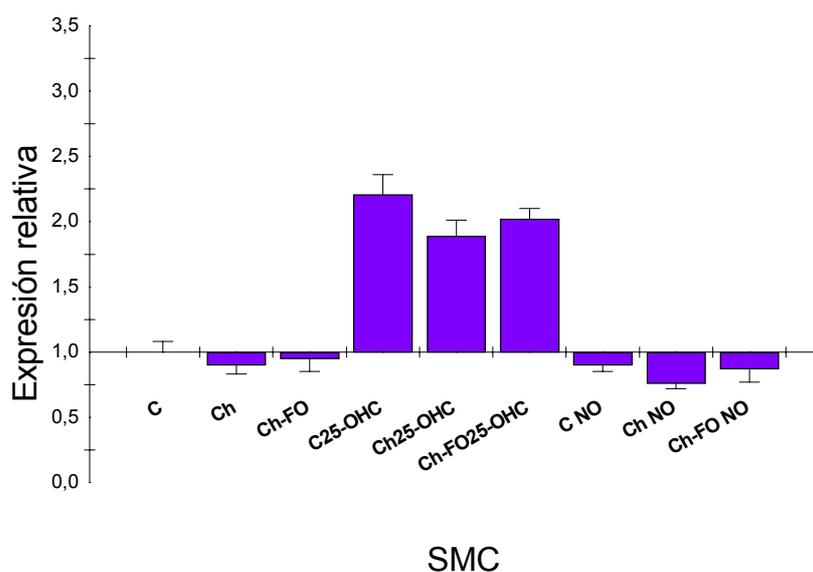


Figura 48. Análisis de las proporciones de expresión para el mRNA de caspasa-3 mediante PCR a tiempo-Real, tanto a nivel basal (C, Ch, Ch-FO); tras la adición de 20µg/ml de 25-hidroxicolesterol durante 24 horas (C25OHC_{ol}, Ch 25OHC_{ol}, Ch-FO 25OHC_{ol}); y de 0,6mM de Nitroprusiato durante 8 horas (C NO, Ch NO, Ch-FO NO). Los resultados están expresados respecto al control (SMC-C).

C	Ch	Ch-FO	C-25	Ch-25	Ch-FO-25	C-NO	Ch-NO	Ch-FO-NO
1,00	0,90	0,95	2,21	1,89	2,02	0,90	0,76	0,87

Tabla 22.-. Datos representados en la figura 48

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

K.1. Modelo celular de aterosclerosis experimental temprana SMC-C/SMC-Ch y SMC-Ch-FO

Las SMC sufren alteraciones relacionadas con la proliferación y la apoptosis, tanto en la remodelación fisiológica de los vasos, como en enfermedades del tipo aterosclerosis y restenosis (156). La proliferación de células vasculares, junto con la muerte celular programada, la migración y la renovación de la matriz extracelular, contribuyen a los cambios de la arquitectura vascular en el desarrollo y en la enfermedad (99, 152, 153). Por otra parte, situaciones como la hiperlipemia alteran la expresión de genes en las células endoteliales y SMC lo cual induce lesiones ateroscleróticas en las que la proliferación y la apoptosis coexisten (152-154). La desdiferenciación y proliferación/apoptosis de las SMC en la íntima arterial es uno de los cambios encontrados en las lesiones aterogénicas tempranas cuando la enfermedad es todavía reversible (123, 124).

El colesterol de la dieta es uno de los factores de riesgo que pueden iniciar estos cambios (124). En este sentido, se ha descrito que el pollo alcanza fácilmente una hipercolesterolemia con una dieta rica en colesterol y que ésta produce lesiones ateroscleróticas en determinadas aves de corral (323-325). En nuestro laboratorio, el pollo hipercolesterolémico ha sido ampliamente utilizado como modelo experimental, por lo que conocemos bien el metabolismo lipídico de estos animales y la regulación a nivel de distintas enzimas relacionadas con el metabolismo del colesterol (326-329), así como la reversión de la hipercolesterolemia con el cambio en la dieta (330, 331).

Estudios preliminares realizados en nuestro laboratorio, han demostrado que 20 días de tratamiento con una dieta enriquecida con un 5 % de colesterol, es suficiente no solo para provocar una hipercolesterolemia, sino que además da lugar a la formación de depósitos de lípidos en las arterias principales similares a las estrías lipídicas de los primeros estadios de la aterosclerosis (285). Sin embargo, manteniendo esa dieta solo 10 días, no se observan placas ateromatosas mediante microscopía electrónica. Aún así, las células de músculo liso arterial obtenidas y cultivadas (SMC-Ch), muestran

diferencias tanto en la proliferación como a nivel molecular con respecto a las SMC-C, obtenidas de pollos alimentados con dieta control. Así, las diferencias entre los cultivos SMC-C y SMC-Ch respecto a la síntesis de DNA, RNA, proteínas y lípidos así como la actividad y expresión del gen de la HMG-CoA reductasa, son significativas y propician un modelo celular de aterosclerosis muy temprana (285).

En nuestro laboratorio nos hemos interesado por el estudio de los eventos moleculares que ocurren en las células vasculares de músculo liso durante los primeros estadios de la aterosclerosis, cuando todavía no se observa la placa ateromatosa al microscopio electrónico. Para ello se desarrolló el modelo celular de aterosclerosis experimental temprana citado, que se basa en el estudio de los cambios experimentados a nivel molecular en las células SMC-Ch en relación con las SMC-C (311, 321). También, hemos estudiado los posibles efectos de reversión tras sustituir la dieta de colesterol por otra enriquecida en aceite de pescado, la cual tiene propiedades antiaterogénicas (297,301).

El desarrollo de nuestro modelo celular, tiene entre otras, dos ventajas fundamentales:

- Nos permite comprobar *in vitro* cambios a nivel genético y molecular provocados por el colesterol de la dieta *in vivo*. De este modo, al mantener paralelamente y en las mismas condiciones de cultivo las células SMC-C y SMC-Ch, cualquier diferencia encontrada entre ambos cultivos solo puede deberse a la dieta rica en colesterol y a la transformación que ésta haya podido provocar en las SMC vasculares en las primeras etapas del proceso aterogénico ya que el estrés *proliferativo* ha sido el mismo en ambos tipos de cultivos. Como la obtención de las células la realizamos antes de la formación de las placas ateromatosas, el modelo experimental celular es de aterogénesis muy temprana, con todas las ventajas que esto supone para los estudios a nivel de mecanismos moleculares y genéticos, que disparan la transformación o desdiferenciación de las SMC por el colesterol de la dieta. De igual manera ocurre con las SMC-Ch-FO, en las que las diferencias encontradas en la expresión de genes entre SMC-Ch y SMC-Ch-FO se deberán únicamente al cambio de la dieta enriquecida con colesterol por

la dieta enriquecida en aceite de pescado en el animal y, por tanto, *in vivo*.

- Por otro lado nos permite investigar *in vitro* los cambios que provocan sustancias presentes en una aterosclerosis temprana, como pueden ser productos derivados de la oxidación del colesterol y muchos otros factores como sustancias vasoactivas y citoquinas las cuales son producidas por las SMC durante el proceso aterosclerótico. Además de conocer la respuesta de los distintos cultivos SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO ante los tratamientos *in vitro*.

Durante el desarrollo de la presente memoria de tesis doctoral, dentro de la línea de investigación seguida por nuestro laboratorio, nos ha interesado investigar, por una parte y mediante estudios *in vivo*, los cambios que provoca una dieta de colesterol sobre la apoptosis y proliferación de los distintos cultivos SMC y conocer si estos cambios revierten al suprimir la dieta de colesterol y sustituirla por una dieta rica en aceite de pescado. Por otra parte, y mediante estudios *in vitro*, investigar los cambios que provocan sustancias presentes en una aterosclerosis temprana como son el 25-hidroxicolesterol y óxido nítrico sobre la proliferación y la apoptosis de los distintos cultivos SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO.

K.2. Análisis de la proliferación celular en cultivos SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO

Antes de iniciar los estudios de apoptosis en las SMC, realizamos un estudio preliminar del estado proliferativo de los cultivos SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO mediante el estudio del ciclo celular por citometría de flujo y de actividad de la fase S por incorporación de BrdU. Esto se realizó con el fin de aportar nuevos datos a la caracterización de los tres tipos de cultivo que nos permitieran la estandarización de los experimentos, así como la obtención de información sobre el estado proliferativo de las células.

Como hemos visto extensamente en los capítulos de introducción, muchos de los genes implicados en el proceso de proliferación tienen un doble papel al estar implicados también en la PCD (11, 12, 159, 182). Esto demuestra lo íntimamente relacionados que están estos dos procesos. Este doble papel se interpreta como un doble control celular en el sentido de que las células que tienen lesiones oncogénicas son más sensibles a los estímulos apoptóticos (9), con lo cual, aunque escapen al control del ciclo celular, como ocurre con las células cancerígenas, sería más fácil deshacerse de ellas; excepto en el caso en que los genes de la maquinaria apoptótica estén mutados lo cual sería altamente tumorigénico (10).

Las SMC, sufren alteraciones relacionadas con la proliferación y la apoptosis, tanto en la remodelación fisiológica de los vasos, como en enfermedades del tipo aterosclerosis y restenosis (156). Así, uno de los principales eventos en la formación de la placa aterosclerótica es la desregulación del equilibrio proliferación/muerte celular a favor de la proliferación de las SMC en los estados iniciales, y de la muerte celular en los estados avanzados.

Sin embargo, existen evidencias de que en la aterosclerosis temprana existe apoptosis y que está positivamente ligada a la proliferación celular (161, 171). En este sentido, estudios *in vitro* muestran que las SMC proliferativas, tal y como ocurre en la aterosclerosis, muestran más apoptosis que aquellas que no son proliferativas, aunque las SMC tanto en humanos como en aterosclerosis experimentales muestran unos valores de replicación muy bajos (162). Esto quiere decir que un leve incremento en el nivel de apoptosis de las SMC puede llevar a una disminución drástica del contenido en SMC en la vasculatura.

Por todo esto es necesario el estudio de la proliferación de los distintos cultivos SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO antes del estudio apoptótico.

Los estudios realizados tanto para el análisis del ciclo celular como para la actividad de la fase S, se llevaron a cabo con medio completo por dos razones: en primer lugar por la dificultad para sincronizar adecuadamente los cultivos SMC (321); en segundo lugar, debido a que todos los experimentos posteriores se iban a realizar con

células no sincronizadas para no dañarlas, ya que los métodos de sincronización pueden ser agresivos para las células y hacerlas más susceptibles a los estímulos apoptóticos.

Los cultivos SMC-Ch procedentes de pollos alimentados con dieta enriquecida en colesterol durante 20 días, muestran un porcentaje ligeramente mayor de células en fase S, tanto en los estudios de incorporación de BrdU como en el análisis del ciclo celular (figuras 6, 7, 8, 9). Además, los valores en G2/M para SMC-Ch, permanecen por encima de los valores para SMC-C de forma global a lo largo del tiempo de análisis, indicando que el estado proliferativo de los cultivos SMC-Ch es mayor que para los SMC-C. Esto está en consonancia con los resultados obtenidos en nuestro laboratorio en los cuales las SMC-Ch muestran una síntesis de DNA superior a las SMC-C (285) y con los datos de cultivos SMC obtenidos directamente de placas ateroscleróticas humanas (332), al igual que otros modelos de aterosclerosis experimentales (333).

Por tanto, el colesterol de la dieta induce la proliferación en los cultivos SMC procedentes de la media de arterias de pollos alimentados con dieta de colesterol. Esto podría implicar que estas SMC han sufrido una modulación de su fenotipo debido al cambio en la expresión de genes que les permite una mayor y más rápida capacidad de proliferación tal y como ocurriría en los estados iniciales del proceso aterosclerótico (105, 123). Al eliminar la dieta de colesterol y sustituirla por una dieta rica en aceite de pescado, las SMC-Ch-FO procedentes de estos animales, muestran unos valores de proliferación intermedios, lo cual está en consonancia con los estudios que muestran que el aceite de pescado disminuye los índices de proliferación en la adventicia y en la media, pero no parece afectar a la distribución en la apoptosis, es decir, el número de SMC disminuye no por muerte sino porque dejan de proliferar (303).

En este punto hay que hacer notar que en nuestro modelo experimental celular las SMC cultivadas proceden de la media y no de la íntima, lo cual implica que los cambios observados en ellas no pueden ser tan evidentes como los cambios que se producen en la íntima arterial en un proceso aterosclerótico más avanzado. Sin embargo, a pesar de ser células que todavía no han emigrado a la íntima, puesto que proceden de una aterosclerosis temprana, sí han debido experimentar cambios a nivel

genético que se manifiestan cuando están en cultivo, ya que muestran diferencias en la proliferación al compararlas con las SMC procedentes de animales con dieta control.

K.3. Citotoxicidad y viabilidad celular

El estudio de viabilidad celular nos ha permitido por un lado, determinar a qué concentraciones óptimas hemos de utilizar los tratamientos *in vitro* de 25-hidroxicolesterol y nitroprusiato para conseguir muerte celular. Por otro lado, determinar si existe alguna diferencia en la respuesta citotóxica de distintos tipos de cultivos de SMC, así como establecer las diferencias entre 10 y 20 días de tratamiento.

Hay que destacar que los ensayos de citotoxicidad por MTT proporcionan una medida de la actividad metabólica, lo cual está íntimamente relacionado con el número de células vivas, pero no nos da información acerca de porqué se están muriendo las células.

Los oxisteroles constituyen una familia de componentes naturales tanto de animales como de plantas (214). Las fuentes de oxisteroles son la dieta y la oxidación del colesterol en el propio organismo, fundamentalmente por peroxidación del colesterol presente en las LDL plasmáticas. Uno de sus acciones más importantes es contribuir al desarrollo de la aterosclerosis (209-212), ya que son capaces de inhibir la proliferación e inducir apoptosis en determinados tipos celulares y en especial en las SMC (214-218).

En este estudio hemos comprobado cómo el 25-hidroxicolesterol disminuye la viabilidad celular tanto en SMC procedentes de pollos alimentados durante 10 días, como de pollos alimentados durante 20 días sin grandes diferencias, y que alrededor de 20µg/ml provoca el 50% de muerte celular (fiuras 10, 12). Podemos destacar que entre los distintos cultivos SMC, las SMC-Ch-FO, muestran valores de viabilidad mayor, lo cual nos mostraría una cierta resistencia al tratamiento con oxisteroles en comparación con la respuesta de cultivos SMC-C y SMC-Ch.

Hay que señalar que los estudios de citotoxicidad con el 25-hidroxicolesterol sobre las células SMC presentan resultados muy variables. Nosotros apuntamos a que uno de los factores críticos puede ser el etanol añadido en el medio de cultivo para disolver el oxisterol, que en los estudios diferentes varían entre el 0,1% y el 1%. El porcentaje de etanol por supuesto no debe ser tóxico para las células y en este sentido nosotros hemos usado un porcentaje del 0,8%, ya que en estudios realizados previamente en nuestro laboratorio se comprobó que no era tóxico para las SMC en cultivo. En cualquier caso el factor limitante, como hemos dicho previamente, es la cantidad de etanol en sí, ya que éste, como vehículo, aumenta la habilidad del 25-hidroxicolesterol para penetrar a través de la membrana celular (334).

A efectos de los resultados obtenidos con el 25-hidroxicolesterol, en relación a los experimentos de detección apoptótica, análisis de proteínas y genes apoptóticos en los distintos cultivos SMC, se escogió la concentración de 20 µg/ml, ya que es aquella en la que se produce alrededor de un 50% de viabilidad celular y en la que se suele presentar mayores diferencias entre los distintos cultivos SMC.

Respecto al efecto del óxido nítrico, se conoce su capacidad tanto de inducir como de inhibir la apoptosis en las SMC (237-239). La generación de NO se puede obtener farmacológicamente a través de la adición de fármacos liberadores de NO, o bien de una forma endógena mediante la inducción de la iNOS. Entre los donadores de NO más habituales destaca el nitroprusiato sódico (SNP) y el S-nitroso-N-acetilpenicilinas (SNAP). Ambos son potentes vasodilatadores que inhiben la proliferación e inducen la apoptosis de las SMC en cultivo (243).

En nuestro estudio hemos evaluado la acción del SNP como donador de NO sobre los distintos cultivos SMC (figuras 14 y 15). La acción del SNP es más acusada sobre los cultivos SMC-20 días. Nuevamente, las mayores diferencias aparecen para las SMC-Ch-FO. Lo que nos muestra una protección de las SMC derivadas de pollos alimentados con dieta de colesterol y posteriormente sustituida por una dieta rica en aceite de pescado, mientras que, al menos a concentraciones bajas, las SMC-Ch muestran menor viabilidad tras el tratamiento con SNP. Tanto los resultados en SMC-C como en SMC-Ch pueden relacionarse con las diferencias en el estado redox de la célula, lo cual parece ser el factor determinante (164, 238). En este sentido hemos

descrito, en los antecedentes, que el aceite de pescado tiene una fuerte acción sobre la activación de enzimas antioxidantes (303-307), y también que la exposición de SMC a oxLDL lleva asociado una rápida generación de ROS.

Los resultados obtenidos con nitroprusiato, en los experimentos de detección apoptótica, de análisis de proteínas y genes apoptóticos en los distintos cultivos SMC, se realizaron a la concentración de 0.6 mM, ya que es la concentración con la que se produce alrededor de un 50% de viabilidad celular y en la que se suele presentar mayores diferencias entre los distintos cultivos SMC.

K.4. Detección de apoptosis en cultivos SMC

Cuando una célula recibe señales de muerte apoptótica, se producen una serie de cambios (4): encogimiento celular y pérdida del contacto con células vecinas; exposición al exterior de la membrana plasmática de fosfatidilserina, que, en condiciones normales se encuentra en la cara interna de la membrana; la membrana plasmática comienza a tener circunvoluciones y adquiere la apariencia vesicular característica; condensación de la cromatina y su acumulación en la periferia del núcleo; desintegración del nucleolo en partículas osmiófilas; fragmentación nuclear por parte de endonucleasas endógenas, las cuales rompen el DNA en fragmentos oligonucleosomales de entre 180-200pb, lo que produce el característico patrón de DNA en escalera; y finalmente, como resultado de las grandes invaginaciones, se producen los llamados cuerpos apoptóticos. Si son células en cultivo, suelen hincharse y destruirse, a esto se le conoce como apoptosis secundaria o falsa necrosis (4).

En este estudio hemos utilizado la detección morfológica de la apoptosis en los cultivos SMC (figura 16, 17, 18), no con fines cuantitativos sino únicamente cualitativos. Así en las fotografías de la figuras 17 y 18 se puede concluir que tanto la acción del 25-hidroxicolesterol como del nitroprusiato provocan cambios morfológicos típicos de una muerte por apoptosis, siendo evidentes la reducción en general del tamaño celular, la formación de las circunvoluciones de membrana externa y la formación de los cuerpos apoptóticos descritos anteriormente.

Para la cuantificación de la apoptosis en los cultivos SMC, se eligió una de las características apoptóticas descritas anteriormente como es la pérdida de la asimetría de membrana, ya que es un fenómeno que parece ser universal en el proceso apoptótico. Esto no ocurre con otras técnicas tan características como el análisis de DNA en escalera, ya que este patrón no es visible en todos los tipos celulares porque depende de que la rotura se produzca en las dos cadenas y del grado de fragmentación (4). Igual situación nos encontramos con la técnica TUNEL que puede dar falsos positivos cuando la síntesis de RNA es abundante o por “splicing”(335).

En este estudio las células SMC de los diferentes cultivos que están sufriendo apoptosis se detectaron marcando las células con Anexina V-FITC (figuras 22, 23). Esta se une a los restos de fosfatidilserina expuestos al exterior por la pérdida de asimetría de su membrana. Para distinguir las células de una situación necrótica se tiñen también con IP, el cual entrará en las células que hayan perdido la integridad de la membrana tal y como ocurre en las células necróticas.

Las SMC a nivel basal presentan índices muy bajos de apoptosis, los cuales se identifican con el porcentaje de muerte normal que sufren las células cuando están en cultivo. Estos datos son normales de acuerdo con otros estudios en los que se muestra cómo las células SMC de la media, incluso provenientes de una placa aterosclerótica, no muestran apoptosis al cultivarlas, al contrario de lo que ocurre con las SMC de la íntima (160). Incluso en lesiones ateroscleróticas tempranas, las células de la media que van a ser las que proliferen y migren y, en definitiva, las que modulen su fenotipo, están protegidas en cierta forma contra la apoptosis (163). Otra posible explicación es que esto sólo sea un reflejo de que el balance proliferación/apoptosis caiga del lado de la proliferación y minimice la muerte de las SMC.

La acción del 25-hidroxicolesterol (figura 22), provoca un gran incremento en el porcentaje de células apoptóticas, tanto en apoptosis tardía como temprana, pero esta acción es especialmente significativa para las SMC-Ch lo cual indica que una dieta de colesterol durante 20 días provoca cambios en las SMC que las hace más susceptibles a la apoptosis. Esto puede ser consecuencia del acúmulo de lípidos en las SMC, de hecho hay evidencias de que en la aterosclerosis temprana existe este acúmulo y que está positivamente ligado a la proliferación celular (161, 171). Por el contrario las SMC-Ch-

FO muestran los niveles de apoptosis más bajos, lo cual responde por un lado al hecho de que en animales con placas ateroscleróticas experimentales se revierte el proceso si se les elimina la dieta lipídica (164), y por otro nos indica un papel protector del aceite de pescado frente a la apoptosis mediada por 25-hidroxicolesterol, ya que los niveles de apoptosis son más bajos aún que los de SMC-C.

La acción del óxido nítrico (figura 23) mediante la incubación con nitroprusiato, muestra importantes diferencias entre los cultivos SMC, ya que induce apoptosis en los tres tipos de cultivos SMC, pero en las SMC-Ch es cuatro veces superior que en las SMC-C. Esto responde a la observación de que la acción de NO depende fundamentalmente del estado redox de la célula (164, 238). Además, en concreto en las SMC, la acción del NO es radicalmente distinto dependiendo del fenotipo que expresen las SMC. De esta forma, las SMC contráctiles, a las que denominan SMC de fenotipo arremolinado o “swirling”, son relativamente resistentes a la apoptosis inducida por NO, lo cual es consecuente con su papel estructural dentro del vaso. Por otra parte, las de fenotipo sintético (SMC de fenotipo epiteloide) muestran una respuesta apoptótica al NO muy superior (243). Una vez más encontramos que las SMC-Ch-FO se encuentran en una situación intermedia, lo cual nos indica una cierta reversión del proceso.

Es muy importante señalar, que tal y como se puede observar en las citometrías de las figuras 20 y 21, los porcentajes de necrosis son muy altos, especialmente por la acción del nitroprusiato sobre los cultivos SMC. De todas formas hay que destacar que, las células con necrosis secundaria también se marcan con IP. Como no existen marófagos capaces de fagocitar las células y/o cuerpos apoptóticos, éstas van a sufrir una necrosis que se conoce como necrosis secundaria al proceso apoptótico, aunque no haya sido un proceso de necrosis la primera causa para morir, sino de apoptosis (4). Por otro lado sería necesario disminuir los tiempos de exposición y/o las concentraciones de óxido nítrico o sea, de nitroprusiato, para determinar si lo expuesto anteriormente es la única causa de que aparezca necrosis, o bien si la muerte celular que se está produciendo no es únicamente apoptosis sino también necrosis, ya que se sabe que estos dos fenómenos pueden coexistir.

K.5. Análisis de la expresión de proteínas mediante “western-blot”

Los miembros de la familia Bcl-2 interactúan de una forma dinámica para regular la apoptosis (41, 43). Bcl-2 bloquea la inducción apoptótica de una gran variedad de estímulos, mientras que Bax puede heterodimerizar con Bcl-2 y bloquear su acción antiapoptótica. Por tanto, la relación en los niveles de expresión entre Bcl-2/Bax determina si la célula va a sufrir apoptosis o no tras un estímulo apoptótico. Cuando Bcl-2 está en exceso, las células están protegidas de la muerte celular, sin embargo cuando Bax está en exceso la célula está evocada a la apoptosis. Bax también tiene la habilidad de heterodimerizar con Bcl- X_L , por lo cual un balance entre los dos también es necesario para la inducción o represión del estímulo apoptótico.

En nuestro modelo experimental celular (tabla 15), podemos observar que las SMC procedentes de pollos hipercolesterolemicos con 20 días muestran una disminución en la proteína Bcl-2, mientras que Bax permanece prácticamente igual pero ligeramente superior en las SMC-Ch. Por tanto, la relación Bcl-2/Bax disminuye (alrededor de un 40%), sin embargo la relación Bcl- X_L /Bax es igual para ambos, lo cual indica que hay una predisposición mayor a la apoptosis en las SMC procedentes de pollos tratados con colesterol. Estos resultados serían consecuentes con los estudios donde se demuestra que Bax se expresa de una forma similar en las SMC con fenotipo sintético y contráctil. En cambio, Bcl-2 no se expresa en las de fenotipo sintético y sí lo hace en las de fenotipo contráctil (166). Por tanto se postula que Bcl-2 puede ser reprimido a lo largo de la modulación del fenotipo contráctil a sintético (166).

La modulación del fenotipo contráctil a sintético en las células musculares lisas de la íntima arterial es uno de los cambios encontrados en las lesiones ateroscleróticas tempranas, cuando la enfermedad es todavía reversible. Estas células de fenotipo sintético en cultivo se muestran desdiferenciadas, muy proliferativas y productoras de abundante matriz extracelular (124, 169, 170). El colesterol de la dieta es uno de los factores que pueden iniciar estos cambios y en este sentido en nuestro laboratorio se ha comprobado la transformación de las SMC por la dieta de colesterol, resultando ser más proliferativas, aumentando la producción de matriz extracelular y acumulando el doble de colesterol intracelular (285).

En el caso de aumento en la expresión de Bax se ha visto que las células que se encuentran en una estría lipídica muestran depósitos de lípidos, los cuales se presentan en pequeñas vacuolas en el citoplasma (165-167). Estas células mas tarde derivarán en lo que se conoce como células espumosas (164, 290). Tanto unas como otras muestran una alta expresión de Bax, así, aunque en nuestras células el aumento no sea realmente significativo, sí que puede ser indicativo de que los niveles de Bax van a ir aumentando, ya que podemos estar, en consecuencia con lo anterior, en un estadio aún temprano y reversible.

Respecto a las SMC-Ch-FO, se encuentra un aumento muy significativo en la relación Bcl-X_L/Bax, mientras que la relación Bcl-2/Bax disminuye, aunque no tanto como en las SMC-Ch, lo que indicaría una cierta resistencia a la apoptosis. Por tanto, la sustitución de la dieta de colesterol por una dieta con aceite de pescado no sólo revertiría los efectos del colesterol si no que además protegería a las SMC de los estímulos apoptóticos.

Con relación al efecto del 25-hidroxicolesterol (tabla 16), se observa una marcada elevación de los niveles de Bax para los tres tipos celulares. Sin embargo la relación antiapoptótica/proapoptótica no varía especialmente entre SMC-C y Ch. No obstante, aunque la relación no varíe, la respuesta en ambos cultivos es distinta puesto que Bcl-X_L aumenta para las SMC-C y permanece igual para las SMC-Ch, mientras que Bcl-2 permanece igual para las SMC-C y SMC-Ch.

En estos cultivos, hay un aumento total de Bax, por tanto, existe una inducción transcripcional. En esto es importante señalar a P53 como inductor de Bax (245, 246), además, recientemente p53 ha sido relacionado con el metabolismo celular del colesterol libre (290). Sin embargo diversos estudios muestran que la apoptosis en la aterosclerosis producida por la adicción de determinados oxisteroles, es independiente de p53, pero sí depende de p21, el cual es un mediador corriente debajo de p53. En este sentido se ha visto que la sobreexpresión de p21 da lugar a un incremento significativo de Bax, sin ningún efecto sobre Bcl-2 (187, 234). No obstante el papel de p53 y p21 están en controversia y sería necesario comprobar su expresión en nuestro modelo experimental.

En el caso de las SMC-Ch-FO, la relación Bcl-2/Bax aumenta respecto al control, sin embargo, la relación Bcl-X_L/Bax permanece igual a la observada en las SMC-C tras el tratamiento con 25-hidroxicolesterol. Esto nos indica que aunque en estas células se produce inducción apoptótica, esta inducción es menor que en SMC-C y en SMC-Ch, poniéndose una vez más de manifiesto la protección frente a la apoptosis en las células procedentes de pollos alimentados con aceite de pescado.

Respecto al nitroprusiato (tabla 17), como productor de óxido nítrico, éste origina una intensa acción sobre las SMC-Ch, produciéndose un descenso muy considerable tanto en Bcl-2/Bax como en Bcl-X_L/Bax. Hay que destacar que el efecto que produce el NO en este sistema es principalmente una disminución en los niveles de Bcl-2, pero también de Bcl-X_L, mientras que Bax permanece igual. Sin embargo, en los cultivos SMC-C, el Bcl-2 sube y Bax no varía mostrando una relación muy superior a la encontrada en los cultivos SMC-Ch. Estos resultados pueden asemejarse a estudios en los que se muestra un cambio en los niveles de Bcl-2/Bax en las llamadas SMC epiteloides, las cuales se encuentran principalmente en la estría adaptativa inicial y serían lo que anteriormente hemos llamado de fenotipo sintético, responsable de la proliferación y la migración hacia la íntima de las SMC después de un daño vascular. Sin embargo las llamadas SMC “swirling”, con fenotipo contráctil, no muestran cambios sustanciales, indicando una relativa resistencia a la apoptosis (243). Según los resultados respecto a la acción del nitroprusiato y en los niveles basales sobre la proporción Bcl-2/Bax, nuestras células SMC-Ch serían semejantes a las epiteloides., y las SMC-C serían las células de fenotipo contráctil o “swirling”.

En el caso de las SMC-Ch-FO, el óxido nítrico da lugar a una relación Bcl-X_L/Bax superior a las SMC-C, mientras que la relación Bcl-2/Bax, disminuye aunque en un grado menor que para las SMC-Ch.

Para explicar porque el NO produce apoptosis, tal y como encontramos en nuestro sistema experimental, existen varias hipótesis. Principalmente se habla de una ruta dependiente y otra independiente de p53 (240, 245, 246, 250). En la vía dependiente de p53, el daño en el DNA inducido por NO, podría estabilizar a p53, el cual de una forma muy efectiva, va a provocar la expresión y activación de genes relacionados con la apoptosis, como por ejemplo la sobreexpresión de Bax. (165, 166, 245, 246). Por otro

lado en la vía independiente, células en los que se ha mutado p53, se ha visto que se sigue induciendo apoptosis (253). Está descrito que las sustancias reactivas de oxígeno (ROS), producen la disminución de Bcl-X_L (224, 225), por tanto el NO podría actuar de esta manera. Así que se produciría una ruptura en el potencial de membrana y la liberación del citocromo c, sin que la familia antiapoptótica pudiese evitar esta liberación y el citocromo c activaría la ruta de caspasas ejecutora de la muerte celular. Esto indicaría que la capacidad del NO para producir apoptosis puede depender del estado redox de la célula.

K.6. Cuantificación de la expresión génica mediante RT-PCR a tiempo-real

Además de estudiar los niveles de proteínas, nuestro objetivo se ha centrado también en el estudio de la expresión de los genes que codifican proteínas implicadas en el proceso apoptótico y de proliferación celular: bcl-2, bcl-X_L, c-myc y p53, en células SMC expuestas a factores aterogénicos, como una dieta de colesterol (experimentos *in vivo*), o a la presencia de oxisteroles y óxido nítrico en los cultivos (experimentos *in vitro*). Por otra parte, hemos estudiado la expresión de los distintos genes al cambiar la dieta de colesterol por dieta de aceite de pescado rico en ácidos grasos ω -3 y ω -6, conocidos por sus propiedades antiaterogénicas (303).

Teniendo en cuenta que c-myc y p53 son oncogenes implicados tanto en la proliferación como en la apoptosis, podrían tener un papel clave en el desarrollo de patologías relacionadas con las SMC. En este sentido se ha visto que existe una desregulación de c-myc en SMC procedentes de placas ateroscleróticas y que éstas SMCs aumentan su susceptibilidad a la apoptosis mediada por p53 (185, 197).

Respecto a bcl-2 y bcl-X_L, son genes antiapoptóticos de la familia bcl-2, con capacidad para dimerizar entre sí y con miembros proapoptóticos. De esta manera la proporción de genes apoptóticos/antiapoptóticos expresados determinará la supervivencia/muerte de la célula. Estos genes tienen una gran importancia si entendemos que el incremento en la proliferación sin incrementar la apoptosis es el mecanismo para desarrollar la patología aterosclerótica en animales hipercolesterolémicos (152-154).

La expresión del gen *bcl-2* (figura 44), prototipo de genes anti-apoptóticos a nivel basal (experimentos *in vivo*) permanece inalterada en las SMC-C y SMC-Ch. Esto se encuentra en consonancia con los estudios en los que no se observan cambios en la expresión de *bcl-2* a lo largo de los cambios ateroscleróticos (174, 200, 204). Sin embargo, las SMC-Ch-FO muestran una ligera elevación en los niveles de *bcl-2*, lo que puede significar cierta resistencia a los estímulos apoptóticos. De hecho muchos de los genes de respuesta a estrés oxidativo activados por una dieta rica en aceite de pescado están también implicados en la regulación de *bcl-2*, tal es el caso, como ya hemos visto, del factor de supervivencia NF- κ B (37, 38, 307).

La incubación de los cultivos con 25-hidroxicolesterol (experimentos *in vitro*) provoca un aumento del mRNA de *bcl-2*, especialmente en las SMC-Ch. Estos resultados pueden parecer contradictorios por lo que se conoce a nivel de proteína Bcl-2, ya que ésta disminuye al tratar las células con oxisteroles (221). Sin embargo esto ocurre principalmente porque la proteína está dimerizando con Bax la cual aumenta en presencia de oxisteroles, tal y como hemos visto en los resultados sobre el análisis de proteínas. Por el contrario, la acción del nitroprusiato como donador de óxido nítrico provoca una disminución en los niveles de expresión del gen *bcl-2*. Sin embargo en los cultivos SMC-C se produce un ligero aumento, lo cual estaría en consonancia con los resultados que hemos obtenidos en el análisis de proteínas y con otros autores que muestran una disminución en los niveles de *bcl-2* (238). En estudios con SMC tratadas con NO se ha observado que las SMC de fenotipo sintético o epiteloide tienen disminuidos los niveles de Bcl-2 respecto a las SMC contráctiles, lo que indica una susceptibilidad a la apoptosis de las SMC sintéticas (243), esto estaría de acuerdo con nuestros resultados en los cultivos SMC-Ch.

La expresión del gen *bcl-X_L* (figura 45) a nivel basal en las células SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO no presenta grandes diferencias entre los diferentes cultivos, al igual que ocurría con *bcl-2*. Aún así encontramos que, para las SMC-Ch, la expresión de *bcl-X_L* está ligeramente disminuida. La disminución en los niveles de expresión de *bcl-X_L*, quizás pueda ser un requisito para la inducción apoptótica. De este modo, se piensa que el *bcl-X_L* juega un papel fundamental en la prevención de la muerte celular en placas ateroscleróticas (200). Además está descrito que la inhibición del NF- κ B

(activador de genes de supervivencia celular) da lugar a una disminución de la expresión de bcl- X_L y que esto sensibiliza a las células para la apoptosis (197).

Al adicionar 25-hidroxicolesterol aumenta notablemente el mRNA de bcl- X_L en los tres tipos de cultivo. Al igual que ocurre con la proteína Bcl-2, Bcl- X_L puede dimerizar con Bax, cuya expresión, como hemos visto, a nivel de proteínas está muy aumentada, así como otros miembros proapoptóticos, fundamentalmente Bak. Por lo tanto, al analizar, el nivel de proteína Bcl- X_L , aparece disminuida. Sin embargo la acción del óxido nítrico provoca una disminución en los niveles de expresión del bcl- X_L , especialmente para las SMC-Ch, esto nos muestra una mayor predisposición a la apoptosis. Como hemos señalado, hay que tener en cuenta que el NO actúa disminuyendo su capacidad de unión a DNA en las SMC (250). En SMC con donadores de NO a concentraciones apoptóticas se ha visto cómo disminuye esta capacidad de unión (250, 265, 266). La inhibición de NF- κ B hace que se pierda la transcripción de genes de supervivencia y se desencadene la apoptosis.

La expresión de c-myc (figura 46) en los cultivos SMC a nivel basal (experimentos *in vivo*) no se aprecian grandes diferencias, aunque en SMC-Ch-FO se aprecia una cierta elevación. La adición de 25-hidroxicolesterol y la acción de nitroprusiato provoca un notable aumento en los niveles de c-myc para los tres tipos de cultivos. El 25-hidroxicolesterol provoca un gran incremento en la expresión de c-myc, especialmente en los cultivos SMC-Ch. Hay que tener en cuenta que c-myc se expresa en células que proliferan activamente y es capaz de inducir apoptosis en ausencia de factores de crecimiento (28). Nuestra observación está apoyada por algunos estudios en los que las oxLDL provocan un aumento de la expresión de c-myc (235). Como hemos dicho, este aumento se produce también tras la adición de óxido nítrico, especialmente en los cultivos de SMC-C. Así la expresión continua de c-myc produce en las SMC una proliferación continua también, pero a la vez se produce una reducción en los niveles de α -actina (182) y de apoptosis, que responde a un cambio de fenotipo contráctil a sintético en las SMC.

El hecho de que los niveles de c-myc en SMC-Ch-FO sean inferiores, tanto al tratar con 25-hidroxicolesterol como con NO, de nuevo nos mostraría la protección de las SMC-Ch-FO al desarrollo de la patología. Tanto los oxisteroles como el NO, por

su naturaleza, son capaces de provocar un estrés oxidativo en las células y se activa c-myc dado que es un gen sensible a procesos de estrés oxidativos. Por otro lado, también se conoce que anulando el estrés oxidativo mediante la administración de antioxidantes, se atenúa esta activación y el desarrollo de la lesión (199). En este sentido, nuestros resultados indican que el papel del aceite de pescado es provocar una menor elevación en los niveles de c-myc respecto a SMC-C y SMC-Ch, posiblemente debido a su influencia sobre la expresión de genes antioxidantes (307).

La expresión del gen p53 (figura 47) en las SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO a nivel basal (experimentos *in vivo*) se encuentra elevado para las SMC-Ch-FO. Esto concuerda con la idea de que los niveles endógenos de p53 protegen a las SMC de la apoptosis y pueden reducir el desarrollo de la aterosclerosis (191). Al incubar las SMC-Ch-FO, con 25-hidroxicolesterol se observa un gran aumento del mRNA de p53 en los tres tipos de cultivos. Esto concuerda con el hecho de que las oxLDL producen la inducción de p53 (222). En concreto el 25-hidroxicolesterol aumenta los niveles de p53. Igualmente, los niveles para la proteína Bax también aumentan mucho, posiblemente mediado por p53. Esto demuestra que, al menos en nuestros cultivos, la apoptosis mediada por el 25-hidroxicolesterol, concuerda con una apoptosis dependiente de p53.

Sin embargo el óxido nítrico provoca una elevación discreta en los niveles de expresión del gen p53, especialmente para las SMC-Ch, en las que casi no varía respecto al nivel basal. En este caso de nuevo nos encontramos una situación diferente en la acción del óxido nítrico. Atendiendo a lo expuesto para los niveles basales, podría indicar una predisposición a la apoptosis y al desarrollo de la aterosclerosis de las SMC-Ch. Contrariamente a lo indicado para la acción del 25-hidroxicolesterol en nuestro modelo experimental celular, la acción apoptótica del NO podría ser independiente de p53, de hecho los valores encontrados para Bax tras los tratamientos con NO no varían sustancialmente, lo cual de nuevo lo correlacionaría con los niveles de p53. Estos resultados estarían de acuerdo con aquellos estudios en los que induciendo la apoptosis en cultivos SMC con NO no se produce acumulación de p53 (250), aunque éste es un punto de controversia entre distintos investigadores, nuestros resultados indican que el NO activa una ruta apoptótica independiente de p53.

Los niveles de expresión del gen caspasa-3 (figura 48) a nivel basal, no presenta variaciones entre los distintos cultivos SMC. La acción del 25-hidroxicolesterol provoca una marcada elevación en la expresión génica de caspasa-3, lo cual es coherente con los resultados que existen a nivel de proteínas, en los que la apoptosis inducida por oxisteroles produce la activación de caspasa-3 (221). Sin embargo el óxido nítrico parece que no solo no aumenta si no que disminuye los niveles de caspasa-3. Este dato es contradictorio y requiere estudios de activación de caspasas, para explicar estos resultados.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1.- Los cultivos SMC-Ch procedentes de pollos alimentados con dieta enriquecida con colesterol durante 20 días muestran unos porcentajes de células en fase S y G2/M ligeramente mayores que las SMC-C, indicando que el estado proliferativo de los cultivos SMC-Ch es mayor que para los SMC-C.

2.- El 25 hidroxicolesterol produce una disminución de la viabilidad en los cultivos SMC de alrededor de un 50% a una concentración de 20 µg/ml. Esta acción es menor para las SMC-Ch-FO, lo cual nos mostraría una cierta resistencia a la citotoxicidad del 25-hidroxicolesterol.

3.- El nitroprusiato como donador de óxido nítrico produce sobre los cultivos SMC un descenso de viabilidad de alrededor del 50% a una concentración 0,6mM. La acción citotóxica del nitroprusiato de nuevo es menor para las SMC-Ch-FO, lo que nos muestra una protección a la muerte celular inducida por el nitroprusiato.

4.- La detección morfológica de apoptosis nos muestra que tanto la acción del 25-hidroxicolesterol como del nitroprusiato provocan cambios morfológicos típicos de una muerte por apoptosis, siendo evidentes la reducción del tamaño celular, la formación de circunvoluciones en membrana citoplasmática y la formación de cuerpos apoptóticos.

5.- El análisis cuantitativo de apoptosis indica que la acción del 25-hidroxicolesterol provoca un gran incremento en el porcentaje de células tanto en apoptosis temprana como tardía. Estos valores son mayores para las SMC-Ch y menores para las SMC-Ch-FO respecto al control, lo cual responde a que el colesterol de la dieta aumenta la susceptibilidad a la apoptosis, mientras que el aceite de pescado protege de la apoptosis

6.- La acción del óxido nítrico mediante el nitroprusiato provoca una gran inducción apoptótica en los cultivos SMC, siendo ésta mucho mayor para las SMC-Ch. Las SMC-Ch-FO se encontrarían en una situación intermedia, lo cual nos indica una cierta reversión del proceso.

7.- En nuestro modelo experimental celular de SMC procedentes de pollos hipercolesterolémicos de 20 días muestran una cierta disminución en los niveles de Bcl-2 respecto a las SMC-C. Esto hace que la relación Bcl-2/Bax disminuya (alrededor de un 40%) y que por tanto las SMC-Ch tengan una mayor predisposición a la apoptosis. Se postula que Bcl-2 pueda ser reprimido en las SMC a lo largo de la modulación de fenotipo contráctil a sintético. Para las SMC-Ch-FO la relación Bcl-2/Bax muestra un valor intermedio mientras que la relación Bcl-X_L/Bax aumenta. Esto de nuevo nos muestra un proceso no sólo de reversión si no también de resistencia a la apoptosis de las SMC-Ch-FO.

8.- El 25-hidroxicolesterol provoca un gran incremento en los niveles de Bax en los tres tipos de cultivos, mientras que Bcl-2 únicamente aumenta para las SMC-Ch-FO. Esto se traduce en que los índices Bcl-2/Bax y Bcl-X_L/Bax disminuyen mucho en los tres tipos de cultivos, reflejo de una fuerte inducción apoptótica, que es mayor para las SMC-C y SMC-Ch.

9.- El óxido nítrico origina una intensa acción sobre los cultivos SMC siendo el principal efecto la disminución de Bcl-2 y Bcl-X_L, ya que Bax no varía. Esto produce un gran descenso en las relaciones Bcl-2/Bax y Bcl-X_L/Bax. Sin embargo para las SMC-C el efecto del nitroprusiato produce un ligero aumento en los niveles de Bcl-2, lo cual hace que la relación Bcl-2/Bax, sea superior a 1. Según esto las células SMC-Ch serían semejantes a las llamadas SMC de fenotipo epiteloide o sintético y las SMC-Ch de fenotipo contráctil. Las SMC-Ch-FO de nuevo muestran una situación intermedia.

10.- La expresión del gen bcl-2, prototipo de genes antiapoptóticos, es similar en los tres tipos de cultivos, aunque ligeramente superior para SMC-Ch-FO. La adición del 25-hidroxicolesterol provoca un aumento en el mRNA de bcl-2, especialmente para las SMC-Ch. Este aumento en los niveles de bcl-2 contrariamente a lo que ocurría con las proteínas se debe a que Bax está dimerizando con Bcl-2, y por tanto la detección de proteínas está disminuida. . Por el contrario, la acción del nitroprusiato como donador de óxido nítrico provoca una disminución en los niveles de expresión del gen bcl-2. Sin embargo en los cultivos SMC-C se produce un ligero aumento, lo cual estaría en consonancia con los resultados que hemos obtenidos en el análisis de proteínas.

11.- La expresión del gen *bcl-X_L* a nivel basal en las células SMC-C, SMC-Ch y SMC-Ch-FO no presenta grandes diferencias. Aun así encontramos que, para las SMC-Ch, la expresión de *bcl-X_L* está ligeramente disminuida. La disminución en los niveles de expresión de *bcl-X_L* quizás pueda jugar un papel fundamental en la prevención de la muerte celular en placas ateroscleróticas. Al incubar los cultivos con 25-hidroxicolesterol aumenta notablemente el mRNA de *bcl-X_L* en los tres tipos de células. Al igual que ocurre con la proteína Bcl-2, Bcl-*X_L* puede dimerizar con Bax. Por el contrario la acción del óxido nítrico provoca una disminución en los niveles de expresión del gen *bcl-X_L*, especialmente para las SMC-Ch. Esto muestra una mayor predisposición a la apoptosis en estas células.

12.- La expresión de *c-myc* en los cultivos SMC a nivel basal no presentan grandes diferencias, aunque en SMC-Ch-FO se aprecia un cierto incremento. La incubación con 25-hidroxicolesterol y con nitroprusiato provoca un notable aumento en los niveles de *c-myc* para los tres tipos de cultivos especialmente en los cultivos SMC-Ch. El hecho de que los niveles de *c-myc* en SMC-Ch-FO sean inferiores, tanto al tratar con 25-hidroxicolesterol como con NO, de nuevo nos mostraría la protección de las SMC-Ch-FO frente al desarrollo de la apoptosis.

13.- La expresión del gen *p53* a nivel basal se encuentra elevado para las SMC-Ch-FO. Esto concuerda con la idea de que los niveles endógenos de *p53* protegen a las SMC de la apoptosis y pueden reducir el desarrollo de la aterosclerosis. Al incubar con 25-hidroxicolesterol se observa un gran aumento del mRNA de *p53* en los tres tipos de cultivos. Igualmente, los niveles para la proteína Bax también aumentan mucho, posiblemente mediado por *p53*. Esto demuestra que en nuestros cultivos la apoptosis mediada por el 25-hidroxicolesterol concuerda con una apoptosis dependiente de *p53*. El óxido nítrico sin embargo provoca un incremento discreto en los niveles de expresión del gen *p53*, especialmente para las SMC-Ch. Contrariamente a lo indicado para la acción del 25-hidroxicolesterol en nuestro modelo experimental celular, la acción apoptótica del NO podría ser independiente de *p53*. De hecho los valores encontrados para Bax tras los tratamientos con NO tampoco varían sustancialmente. Nuestros resultados indican que el NO activa una ruta apoptótica independiente de *p53*.

14.- Los niveles de expresión del gen caspasa-3 aumentan con la acción del 25-hidroxicolesterol, por tanto la apoptosis inducida por oxisteroles produce la activación de caspasa-3. Sin embargo el óxido nítrico parece que no solo no aumenta si no que disminuye los niveles de caspasa-3. Este dato es contradictorio y se requieren estudios de activación de caspasas para explicar estos resultados.

CONCLUSIÓN GENERAL

El colesterol de la dieta produce cambios en las SMC que se manifiestan fundamentalmente en una disminución en la relación de proteínas antiapoptóticas/proapoptóticas y en una discreta disminución de los niveles de bcl-X_L, lo que las hace más susceptibles a la apoptosis.

La sustitución de la dieta de colesterol por una dieta enriquecida en aceite de pescado provoca en las SMC una reversión de los cambios inducidos por el colesterol, tal y como muestran los valores intermedios de proliferación, apoptosis y el balance entre proteínas antiapoptóticas/proapoptóticas. Además, la disminución en los niveles de c-myc tras estímulos apoptóticos y el aumento de bcl-2 y p53 señalan que el aceite de pescado ejerce una protección a la apoptosis en las SMC.

REFERENCIAS

REFERENCIAS

1. **Kerr J.F., Willie A.H., and Currie A.R.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, 26: 239-257, 1972.
2. **Clarke P.G.H. and Clacke S.** Nineteenth century research on naturally occurring cell death and related phenomenon. *Anat. Embryol.*, 193: 81-99, 1996.
3. **Glucksmann A.** Cell death in normal vertebrate ontogeny. *Biol. Rev.*, 26: 5986, 1951.
4. **Cotter T.G. and Martin S.J.** Techniques in Apoptosis, a user's guide. Portland Press.
5. **Clarke P.G.H.** Apoptosis: from morphological types of cell death to interacting pathways. *Trend Pharmacol. Sci.*, 23: 308-309, 2002.
6. **Vaux D.L. Aguila H.L. and Weissman I.L.** Bcl2 prevents death of factor-deprived cells but fails to prevent apoptosis in targets of cell mediated killing. *Int. Immunol*, 4: 821-4, 1992.
7. **McConkey D.J., Hartzell P., Nicoretta P. and Osrenius S.** Calcium-activated DNA fragmentation kills immature thyrocytes. *Faseb J.*, 3: 1843-1849, 1989.
8. **Willie A.H.** Chromatin cleavage in apoptosis; association of a condensed chromatin morphology and dependence on macromolecular synthesis. *J. Pathol.*, 142: 67-77, 1984.
9. **Evan G.I. and Vousden K.** Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature*, 411: 342-348, 2001.

10. **Marin M., Hsu B., Stephens L., Brisbay S., and McDonnell T.** The functional basis of c-myc and bcl-2 complementation during multistep lymphoma genesis in vivo. *Exp. Cell. Res.*, 217: 240-247, 1995.
11. **Evan G. and Littlewood T.** A matter of life and cell death. *Science*, 281: 1317-1322, 1998.
12. **Lundberg A.S. and Weinberg R.A.** Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur. J. Cancer*, 35: 531-539, 1999.
13. **Manfredi I.I.** p53 and apoptosis: it's not just in the nucleus anymore. *Molecular cell*, 11: 552-554, 2003.
14. **Haupt Y., Rowan S., Shaulian E., Vousden K.H., and Oren M.** Induction of apoptosis in HeLa cells by trans-activation-deficient p53. *Genes Dev.*, 9: 2170-2183, 1995.
15. **Marchenko N.D., Zaika A., and Moll V.M.** Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J. Biol. Chem.*, 275: 16202-16212, 2000.
16. **Mihara M., Erster S., Zaika A., Petenko O., Chittander T., Pancoska P., and Moll V.M.** p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol. Cell*, 11(3): 577-590, 2003.
17. **Muller M., Wilder S., Bannash D., Israeli D., Lehlbach K., Li-Weber M., Friedman S.L., Galle P.R., Stremmel W., Oren M., et al.** p53 activates the CD95 (Apo-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs. *J. Exp. Med.*, 188: 2033-2045, 1998.
18. **Bennet M., McDonnal K., Chan S.W., Luzio J.P., Simani R. and Weissberg P.** Cell surface trafficking of Fas: a rapid mechanism of p53-mediated apoptosis. *Science*, 282: 290-293, 1998.

19. **Wu G.S., Burns T.F., McDonald E.R., Jiang W., Meag R., Krautz I.D., Kao G., Gan D.D., Zhou J.Y., Muschel R., et al.** KILLER/DR5 is a DNA damage-inducible p53-regulated death receptor gene. *Nat. Genet.*, 17: 141-143, 1997.
20. **Kannan K., Kamiaski N., Rechani G., Jakob-Hirsch J., Amariglio N., and Girol D.** DNA microarray analysis of genes involved in p53 mediated apoptosis: activation of Apaf-1. *Oncogene*, 20: 3449-3455, 2001
21. **Haupt S., Berger M., Golberg Z., and Haupt Y.** Apoptosis – The p53 network. *Journal of Cell Science*, 116: 4077-4085, 2003.
22. **Phillip A.C. and Vousden K.H.** E2F-1 induced apoptosis. *Apoptosis*, 6: 173-182, 2001.
23. **Klefstrom J., Arighi E., Littlewood T., et al.** Induction of TNF-sensitive cellular phenotype by c-myc involves p53 and impaired NF- κ B activation. *EMBO J.*, 16: 7382-7392, 1997.
24. **Phillip A.C., Ernst M.K., Bates S., Rice N.R., and Vousden K.H.** E2F-1 potentiates cell death by blocking anti-apoptotic signalling pathways. *Mol. Cell.*, 4: 771-781, 1999.
25. **Haupt Y., Maya R., Kazaz A., and Oren M.** Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature*, 387: 296-299, 1997.
26. **Nebit C.A., Tersak I.M., and Prochownik E.V.** MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene*, 18: 3004-3016, 1999.
27. **Schlagbauer-Wadl H., Griffiven M., Van Elsas A., Shrier P.I., Pustelnik T., Eichler H.G., Wolff K., Petamberger H., and Jansen B.** Influence of Increased c-Myc Expression on the Growth Characteristics of Human Melanoma. *J. Invest. Dermatol.*, 112: 332-336, 1999.

-
28. **Petengaris S. and Khan M.** The many faces of c-myc. *Archives of biochemistry and biophysics*, 416: 129-136, 2003.

 29. **Steiner P., Phillipp A., Lukas J., Godden-Kent D., Pagano M., Mittacht J., Bartek M., and Eilers J.** Identification of a Myc-dependent step during the formation of active G1 cyclin-cdk complexes. *EMBO J.*, 14 (19): 4814-4826, 1995.

 30. **Berns K., Hijmans .E.M., and Becmards R.** Repression of c-Myc responsive genes in cycling cells causes G1 arrest through reduction of cyclin E/CDK2 kinase activity. *Oncogene*, 15(11): 1347-1356, 1997.

 31. **Evan G.I., Wyllie A.H., Gilbert C.S., Littlewood T.D., Laud H., Brooks M., Walters C.M., Penn L.Z., and Hancock D.C.** Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell*, 69(1): 119-128, 1992.

 32. **Askew D.S., Ashmun R.A., Simmons B.C., and Cleveland J.L.** Constitutive c-myc expression in an IL-3-dependent myeloid cell line suppresses cell cycle arrest and accelerates apoptosis. *Oncogene*, 6(10): 1915-1922, 1991.

 33. **Debbas M. and White E.** Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. *Genes Dev.*, 7(4): 546-554, 1993.

 34. **Tanaka H., Matsumura I., Eroo S., Saton Y., Sakamaki T., Albanese C., Machii T., Pestell R.G., and Kamakura Y.** E2F1 and c-Myc potentiate apoptosis through inhibition of NF-kappaB activity that facilitates MnSOD-mediated ROS elimination. *Mol. Cell*, 9(5): 1017-1029, 2002.

 35. **Zindy F., Eischen C.M., Randle D.H., Kamijo T., Cleveland J.L., Sherr C.J., and Roussel M.F.** Myc signaling via the ARF tumor suppressor regulates p53-dependent apoptosis and immortalization. *Genes Dev.*, 12(15): 2424-2433, 1998.

36. **Huebec A.O., Zorming M., Lyon D., Suda T., Nagata S. and Evan G.I.** Requirement for the CD95 Receptor-Ligand Pathway in c-Myc-Induced Apoptosis. *Science*, 278: 1305-1309, 1997.
37. **Magnani M., Crinelli R., Bianchi M., and Antonelli A.** The ubiquitin-dependent proteolytic system and other potential targets for the modulation of nuclear factor-kB (NF-kB). *Curr. Drug Targets*, 1(4): 387-399, 2000.
38. **Rath P.C., and Aggarwal B.B.** TNF-induced signaling in apoptosis. *J Clin Immunol.*, 19(6):350-364, 1999.
39. **Reed J.** Double identity for protein of the Bcl-2 family. *Nature*, 387: 773-776, 1997.
40. **Green D. and Reed J.** Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281: 1309-1311, 1998.
41. **Adams J.M. and Cory S.** The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*, 281: 1322-1326, 1998.
42. **Kolekan A. and Thompson C.B.** Bcl-2 family proteins: the role of the BH3 domain in apoptosis. *Trends Cell Biol.*, 8: 324-330, 1998.
43. **Reed J.C.** Bcl-2 family proteins. *Oncogene*, 17: 3225-3226, 1998.
44. **Sattler M., Liang H., Netteshein D., Meadows R.P., Harlan J.E., Eberstadt M., et al.** Structure of Bcl-X_L-Bak peptide complex: recognition between regulations of apoptosis. *Science*, 275: 983, 1997.
45. **Goping I.S., Gross A., Lavoie J.N., Nguyen M., Jemmerson R., Roth K. et al.** Regulated targeting of Bax to mitochondria. *J. Cell. Biol.*, 143: 207, 1998.

-
46. **Griffins G.J., Dubrez L., Morgan C.P., Jones N.A., Whitehouse I., Corfe B.M., et al.** Cell damage-induced conformational changes of the pro-apoptotic protein Bak in vivo precede the onset of apoptosis. *J. Cell. Biol.*, 144: 903, 1999.
47. **Nguyen M., Millan D.G., Yong V.W., Korsmeyer S.J., and Shore G.C.** Targeting of Bcl-2 to the mitochondrial outer membrane by a COOH-terminal signal anchor sequence. *J. Biol. Chem.*, 268: 25265-25268, 1993.
48. **Hsu Y.T., Wolter K.G. y Youle R.J.** Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X_L during apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 3668-3672, 1997.
49. **Puthlakath H., Huanf D.C., O'Reilly L.A., King S.M., and Strasser A.** The proapoptotic activity of the Bcl-2 family member Bim is regulated by interaction with the dynein motor complex. *Moll. Cell*, 3: 287-296, 1999.
50. **Jurgensmeier J.M., Xie Z.H., Deveraux Q., Ellerby L., Bredesen D., and Reed J.C.** Bax directly induces release of cytochrome from isolated mitochondria. *Pro. Natl. Acad. Sci.*, 95: 4997-5002, 1998.
51. **Zoratti M. and Szabo I.** The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys. Acta*, 1241: 139-176, 1995.
52. **Zamzami N., Brenner C., Manzo I., Susin S.A. and Kroemer G.** Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene*, 16: 2265-2282, 1998.
53. **Narita M., Shimizu S., Ito T., Chittenden T., Lutz R.J., Matsuda H., et al.** Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Prod. Natl. Acad. Sci.*, 95: 14681, 1998.
54. **Antonsson B., Conti F., Ciavatta A., Montessuit S., Lewis S, Martinou I., Bernasconi L., Bernard A., Murmod J.J., Mazzei G., Maundrell K.,**

- Ganbale F., Sadoul R. and Martinou J.C.** Inhibition of Bax channel- forming activity by Bcl-2. *Science*, 247: 370-372, 1997.
55. **Minn A.J., Velez P., Shendel S.L., Liang H., Muchmore S.W., Fesik S.W., Fill M., and Thompson C.B.** Bcl-X(l) forms on ion channel in sythetic lipid membranes. *Nature*, 385: 353-357, 1997.
56. **Schendel S.L., Xie Z., Montal M.O., Matsuyama S., Montal M., and Reed J.C.** Channel formation by antiopototic protein Bcl-2. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94: 5113-5118, 1997.
57. **Wei M.C., Zhong W.X., Cheng E.H., Lindsten T., Panovtza-Kopovlov U., Ross A.J., Roth K.A., McGregor G.R., Thompson C.B., and Korsmeyer S.J.** Proapoptotic Bax and Bak: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 292: 727-730, 2001.
58. **Vander Heiden M.G., Challdel N.S., Williamson E.C., Shumacker P.T. and Thompson C.B.** Bcl-X_L regulates the membrane potential and volume homeostasis of mitochondria. *Cell*, 91: 627-637, 1997.
59. **Pan G., O'Rourke K., and Dixit V.M.** Caspase-9, Bcl-X_L, and Apaf-1 form a ternary complex. *J. Biol. Chem.*, 273: 5841, 1998.
60. **Ng F.W., Nguyen M., Kwan T., Branton P.E., Nicholson D.W., Cromlish J.A., et al.** p28 Bap31, a Bcl-2/Bcl-X_L and caspasa-8 associated protein in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.*;139: 327, 1997.
61. **Krammer P.H.** The CD95(APO-1/Fas)/CD95L system. *Toxicol. Lett.*, 103:131-137, 1998.
62. **Nagata S.** Apoptosis by death factor. *Cell*; 88: 355-365, 1997.
63. **Schmitz I., Kirchhoff S., and Krammer P. H.** Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 32: 1123–1136, 2000.

-
64. **Vincenz C.** Death receptors and apoptosis. Deadly signaling and evasive tactics. *Cardiol. Clin.*, 19: 31–43, 2001.
65. **Thorburn A.** Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal*, 16: 139–144, 2004.
66. **Obeid LM, Linardic CM, Karolak A, and Hannun Y.A.** Programmed cell death induced by ceramide. *Science*, 259: 1769-1771, 1993.
67. **Williams G.T., Smith C. A., Spooncer E., Dexter T.M., and Taylor D.R.** Haemopoietic colony stimulating factors promote cell survival by suppressing apoptosis. *Nature*, 343: 76-79, 1990.
68. **Harrington E.A., Bennett M.R., Fanidi A., and Evan G.I.** C-Myc induced apoptosis in fibroblast is inhibited by cytokines. *EMBO J.*, 13, 3286-3295, 1994.
69. **Mannick J.B., Schonhoff C., Papeta N., Ghafourifar P., Szibor M., fang K., and Gaston B.** S-Nitrosylation of mitochondrial caspasas, *J. Cell Biol.*, 154: 1111-1116, 2001.
70. **Van Loo G., Saelens X., Matthijssens F., Schotte P., Beyaert R., Declercq W., and Vandenabeele P.** Caspases are not localized in mitochondria during life or death. *Cell Death Differ.*, 9: 1207-121, 2002.
71. **Susin S.A., Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M., Constantini P., Ferri K.F., Irinopoulou T., Prevost M.C., Brothers G., Mak T.W., Penninger J., Earnshaw W.C., and Kroemer G.** Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis, *J.Exp.Med.*, 192: 571-580, 2000.
72. **Roberts D.L., Merrison W., MacFarlane M., and Cohen G.M.** The inhibitor of apoptosis protein-binding domain of Smac is not essential for its proapoptotic activity. *J. Cell Biol.*, 153: 221-228, 2001.

-
73. **Gray C.W., Ward R.V., Karran E., Turconi S., Rowles A., Viglienghi D., Southan C., Barton A., Fanton K.G., West A., Savopoulos J., Hassan N.J., Clinkenbeard H., Hanning C., Amegadzie B., Davis J.B., Dingwall C., Livi G.P., Livi C.L., and Creasy C.L.** Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur. J. Biochem.*, 267: 5699-5710, 2000.
74. **Suzuki Y., Imai Y., Nakayama H., Takahashi K., Takio K., and Takahashi R.** A serine protease, HtrA2 is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol. Cell*, 8: 613-621, 2001.
75. **Li L.Y., Luo L., and Wang X.D.** Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature*, 412: 95-99, 2001.
76. **Zou H., Li Y.C., Liu H.S., and Wang X.D.** An APAF-1.cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J. Biol. Chem.*, 274:11549-11556, 1999.
77. **Jiang X.J., and Wang X.D.** Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J.Biol.Chem.*, 275: 31199-311203, 2000.
78. **Jiang X.J., and Wang X.D.** Cytochrome C-mediated apoptosis. *Annu.Rev.Biochem.*, 73: 87-106, 2004.
79. **Lazebnik Y., Takahashi A., Poirier G., Kaufmann S., and Earnshaw W.** Characterization of the execution phase of apoptosis in vitro using extracts from condemned-phase cells. *J. Cell Sci.*, 19: 41-49, 1995.
80. **Nicholson D., and Thornberry N.** Caspases: Killer proteases. *Trens Biochem. Sci.*, 8: 299-306, 1997.
81. **Thornberry N. and Lazebnik Y.** Caspases: Enemies within. *Science*, 281: 1312-1316, 1998.

-
82. **Rotonda J., Nicholson D.W., Fazil K.M., Gallant M., Gareau Y., Labelle M., et al.** The three-dimensional structure of apopain/CPP32, a key mediator of apoptosis. *Nature Struct.Biol.*, 3: 619-625, 1996.
83. **Wilson K.P., Black J.A., Kim E.E., Griffith J.P., Navia M.A., et al.** Structure and mechanism of interleukin-1 beta-converting enzyme. *Nature*, 370: 270-275, 1994.
84. **Chou J.J., Matsuo H., Duan H., and Wagner G.** Solution structure of the RAIDD CARD and model of CARD/CARD interaction in caspase-2 and caspase-9 recruitment. *Cell*, 94: 171-180, 1998.
85. **Slee E.A., Harte M.T., Kluck R.M., Wolf B.B., Casiano C.A., and Newmeyer D.D.** Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2,-3,-6,-7,-8 and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J.Cell Biol.*, 144: 281-292, 1999.
86. **Srinivasula S.M., Ahmad M., Fernandes-Alnemri T., and Alnemri E.S.** Autoactivation of procaspase-9 by Apaf-1-mediated oligomerization. *Mol. Cell*, 1: 949-957, 1998.
87. **Colossi P.A., Harvey N.L., Shearwin-Whyatt L.M., and Kumar S.** Conversion of procaspase-3 to an autoactivating caspase by fusion to the caspase-2 prodomain. *J. Biol.Chem.*, 273: 26566-26570, 1998.
88. **Cheng E.H., Kirsch D.G., Clem R.J., Ravi R., Kastan M.B., Bedi A., et al.** Conversion of Bcl-2 to a Bax like death effector by caspases. *Science*, 278: 1966-1968, 1997.
89. **Baichwal V.R., and Baeuerle P.A.** Activated nf-kappa b or die? *Curr.Biol.*, 7: 94-96, 1997.

90. **Suzuki A., Tsutomi Y., Miura M., and Akahane K.** Caspase-3 inactivation to suppress Fas-mediated apoptosis: identification of binding domain with p21 and ILP and inactivation machinery by p21. *Oncogene*, 18: 1239-1244, 1999.
91. **Cardone M.H., Salvesen G.S., Widmann C., Johnson G., and Frisch S.M.** The regulation of anoikis: MEEKK-1 activation requires cleavage by caspasas. *Cell*, 90: 315-323, 1997.
92. **Roy N., Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., and Redd J.C.** The c-IAP-1 and c-IAP-2 proteins are direct inhibitors of specific caspasas. *EMBO J.*, 16: 6914-6925, 1997.
93. **Deveraux Q.L., Takahashi R., Salvesen G.S., and Redd J.C.** X-linked IAP is a direct inhibitor of cell death proteases. *Nature*, 388: 300-304, 1997.
94. **Deveraux Q.L., Roy N., Stennicke H.R., Van Arsdale T., Zhou Q., Srinivasula S.M., et al.** IAPs block apoptotic events induced by caspasa-8 and cytochrome c by direct inhibition of distinct caspasas. *EMBO J.*, 17: 2215-2223, 1998.
95. **Irmle M., Thome M., Hahne M., Scheneider P., Hofmann K., Steier V., et al.** Inhibition of death receptor signal by cellular FLIP. *Nature*, 388: 190-195, 1997.
96. **Koseki T., Inohara N., Chen S., and Nunez G.** ARC, an inhibitor of apoptosis expressed in skeletal muscle and heart that interacts selectively with caspasas. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95: 5156-5160, 1998.
97. **Hermann C., Assmus B., Urbich C., Zeiher A.M., and Dimmeler S.** Insulin mediated stimulation of protein kinase Akt: A potent survival signalling cascade for enthotelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc.Biol.*, 20: 402-409, 2000.
98. **Mannick J.B., Hausladen A., Liu L., Hess D.T., Zeng M., Miao Q.X., et al.** Fas induced caspasa denitrosylation. *Science*, 284: 651-654, 1999.

-
99. **Owens G.K.** Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.*, 75: 487-517, 1995.
 100. **Han C.I., Campbell G., and Campbell J.H.** Circulating bone marrow cells can contribute to neointimal formation. *J. Vas. Res*, 38: 113-119, 2001.
 101. **Sata M., Saiura A., Kunisato A., Tojo A., Okada S., Tokuhsa T., Iria H., Makuuchi M., Hirata Y., and Nagai R.** Hematopoietic ítem cells differentiated into vascular cells that participate in the patogenesis of arterosclerosis. *Nat. Med.*, 8: 403-409, 2002.
 102. **Shimizu K., Sugiyama S., Aikawa M., Fukumoto Y., Rabkin E., Libby P., and Mitchell R.N.** Host bone-marrow cells are a source of donor intimal smooth-muscle-like cells in murine aortic transplant arteriopathy. *Nat. Med.*, 7: 738-741, 2001.
 103. **Frid M.G., Moiseeva E.P., and Stenmark K.R.** Multiple phenotypically distinct smooth muscle cells populations exist in the adult and developing bovine pulmonary arterial media in vivo. *Circ. Res.*, 75: 669-681, 1994.
 104. **Hao H., Ropraz P., Verin V., Camenzind E., Geinoz A., Peppers M.S., Gabbiani G., and Bochaton-Piallat M.L.** Heterogeneneity of smooth muscle cells populations cultured from pig coronary artery. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22: 1093-1099, 2002.
 105. **Owens G.K., Kumar M.S., and Wamhoff B.R.** Molecular regulation of Vascular Smooth muscle Cell Differentiation in development and disease. *Physiol Rev.*, 84: 767-801,2004.
 106. **Owens G.K., and Thompson M.M.** Developmental changes in isoactin expression in rat aortic smooth muscle cells in vivo. Relationship between growth and cytodifferentiation. *J Biol. Chem.*, 261: 13373-13380, 1986.

107. **Obrien E.R., Alpers C.E., Stewart D.K., Ferguson M., Tran N., Gordon D., Benditt E.P., Hinohara T., Simpson J.B., and Achartz S.M.** Proliferation in primary and restenotic coronary atherectomy tissue. Implications for antiproliferative therapy. *Circ. Re.*, 73: 223-231, 1993.
108. **Wicox J.N.** Analysis of local gene expression in human atherosclerotic plaques. *J. Vasc. Surg.*, 15: 913-916, 1992.
109. **Hungerford J.E. and Little C.D.** Developmental biology of the vascular smooth muscle cells: building a multilayered vessel wall. *J. Vasc. Res.*, 36:2-27.1999.
110. **Kim S., Ip H.S., Lu M.M., Clendenin C., and Parmacek M.S.** A serum response factor-dependent transcriptional regulatory program identifies distinct smooth muscle cells sublineages. *Mol. Cell Biol.*, 17: 2266-2278, 1997.
111. **Mack C.P., and Owens G.K.** Regulation of SM alpha-actin expression in vivo is dependent upon CArG elements within 5' and first intrón promoter region. *Circ. Res.*, 84: 852-861, 1999.
112. **Manabe I., and Owens G.K.** CArG elements control smooth muscle subtype-specific expression on smooth muscle myosin in vivo. *J. Clin. Invest.*, 107: 823-834, 2001.
113. **Mericskay M., Parlakian A., Porten A., Dandre F., Bonnet J., Paulin D., and Li Z.** An overlapping CArG/octamer element is required for regulation of desmin gene transcription in arterial smooth muscle cells. *Dev. Biol.*, 226: 192-208, 2000.
114. **Sartorelli V., Kurabayashi M. and Kedes L.** Muscle specific gene expression. A comparison of cardiac and skeletal muscle transcription strategies. *Circ. Res.*, 72: 925-931, 1993.

-
115. **Manabe I., and Owens G.K.** Recruitment of serum response factor and hyperacetylation of histones at smooth muscle –specific regulatory regions during differentiation of a novel p19-derived in vitro smooth muscle differentiation system. *Circ. Res.*, 88: 1127-1134, 2001.
116. **Chang P.S., Li L., McAnally J., and Olson E.N.** Muscle specificity encoded by specific serum response factor-binding sites. *J Biol. Chem.*, 276: 17206-17212, 2001.
117. **Mack C.P., Thompson M.M., Lawrenz-Smith S., and Owens G.K.** Smooth muscle alpha-actin CArG elements coordinate formation of a smooth muscle cell-selective, serum response factor-containing activation complex. *Circ. Res.*, 86: 221-232, 2000.
118. **Nishida W., Nakamura M., Mori S., Takahashi M., Ohkawa Y., Todokoro S., Yoshida K., Hiwada K., Hayashi K., and Sobue K.** A triad of serum response factor and de GATA and NK families governs the transcription of smooth and cardiac muscle genes. *J. Biol. Chem.*, 277: 7308-7317, 2002.
119. **Chen J., Kitchem C.M., Streb J.W., and Miano J.M.** Myocardin: a component of a molecular switch for smooth muscle differentiation. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 34: 1345-. 2002.
120. **Du K.L., IpH.S., Li J., Chen M., Dandre F., Yu W., Lu M.M., Owens G.K., and Parmacek M.S.** Myocardin is a critical serum response factor cofactor in the transcriptional program regulating smooth muscle cells differentiation. *Mol. Cell Biol.*, 23: 2425-2437, 2003.
121. **Hatmann M., Madsen C.S., and Owens G.K.** A transforming growth factor beta (TGF) control elements drives TGF-induced stimulation of SM alpha-actin gene expression in concert with two CArG elements. *J. Biol. Chem.*, 272: 10948-10956, 1997.

122. **Regan C.P., Adam P.J., Madsen C.S., and Owens G.K.** Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury. *J. Clin. Invest.*, 106: 1139-1147, 2000.
123. **Ross R.** The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *N. Engl. J. Med.*, 362: 801-809, 1993.
124. **Campbell G.R., Campbell J.H.** The role of smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, 5:323-330, 1994.
125. **Bennett M.R. and Boyle J.J.** Apoptosis of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 138: 3-9, 1998.
126. **Mallat Z., Hugel B., Ohan J., Lesèche G., Freyssinet J.M., and Tedgui A.** Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: a role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation*, 99: 348-353, 1999.
127. **Hegy L., Skepper J.N., Cary N.R., and Mitchinson M.J.** Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis. *J.Pathol.*, 180: 423-429, 1996.
128. **Chamley-Campbell J., Campbell G.R., and Ross R.** The smooth muscle cells in culture. *Physiol. Rev.*, 59: 1-6, 1979.
129. **Chamley J.H., Campbell G.R., and Burnstock G.** Dedifferentiation, redifferentiation and bundle formation of smooth muscle cells in tissue culture: the influence of cell number and nerve fibres. *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 32: 297-323, 1974.
130. **Tan E.M.L., Galssberg E., Olsen D.R., Noveral J.P., Unger G.A., Peltonen J., Chu M.L., Levine E., and Solberg S.** Extracellular matrix gene expression by human endothelial and smooth muscle cells. *Matrix* 11: 380-387, 1991.

131. **Turley E.A.** Extracellular matrix remodelling: multiple paradigms in vascular disease. *Circ. Res.*, 88: 2-4, 2001.
132. **Galis Z.S., Sukhova G.K., Lark M.W., and Libby P.** Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions in human atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.*, 94: 2493-2503, 1994.
133. **Rong X.J., Berman J.W., Taubman M.B., and Fisher E.A.** Lysophosphatidylcholine stimulates monocyte chemoattractant protein-1 gene expression in rat aortic smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.*, 22: 1617-1623, 2002.
134. **Roque M., Kim W.J., Gazdoin M., Malik A., Reis E.D., Fallo J.T., Badimon J.J., Charo I.F., and Taubman M.B.** CCR2 deficiency decreases intimal hyperplasia after arterial injury. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 22: 554-559, 2002.
135. **Kocher O., Gabbiani F., Gabbiani G., Reidy M.A., Cokay M.S., Peters H., and Huttner I.** Phenotypic features of smooth muscle cells during the evolution of experimental carotid artery intimal thickening. *Biochem. Morphol. Studies Lab. Invest.*, 65: 459-470, 1991.
136. **Kocher O. and Gabbiani G.** Cytoskeletal features of normal and atheromatous human arterial smooth muscle cells. *Hum. Pathol.*, 17: 875-880, 1986.
137. **Galis Z.S. and Khatri J.J.** Matrix metalloproteinases in vascular remodelling and atherosclerosis: the good, the bad, and the ugly. *Circ. Res.*, 90: 251-262, 2002.
138. **Luis A.J.** Atherosclerosis. *J. Clin. Invest.*, 106: 951-961, 2000.
139. **Ross r and Glomset JA.** The pathogenesis of atherosclerosis. *N. Engl. J. Med.*, 295: 369-377/420-425, 1976.

140. **Jawien A., Bowen Pope D.F., Lindner V., Scharz S.M., and Clowes A.W.** Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle cells migration and intimal thickening in a rat model of ballon angioplasty. *J. Clin. Invest.*, 89: 507-511, 1992.
141. **Somasundaram C., Kallmeier R.C., and Babij P.** regulation of smooth muscle myosin heavy chain gene expression in cultured vascular smooth muscle cells by growth factors and contractile agonists. *Basic Appl. Mycol.*, 6: 31-36, 1995
142. **Owens G.K., Geisterfer A.A., Yang Y.W., and Komoriya A.** Transforming growth factor-beta induced growth inhibition and cellular hypertrophy in cultured smooth muscle cells. *J. Cell Biol.*, 107:771-780, 1988.
143. **McLean M.J. and Sperelakis N.** Electrophysiological recordings from spontaneously contracting reagregates of cultured smooth muscle cells from chick embryos. *Exp. Cell Res.*, 104: 309-318, 1977.
144. **Goldstein S.** The Human Fibroblast Comes of Age. *Science*, 249: 1129-1133, 1990.
145. **Harley C.B., Futcher A.B., and Greider C.W.** Telomeres shorten during ageing of human fibroblast. *Nature*, 345: 458-460, 1990.
146. **Hubbard K. and Ozer H.L.** Senescence and immortalization of human cells. Cell Growth and Apoptosis. A Practical Approach. *IRL Press*. Cap. 12: 229-249, 1995.
147. **Stepp M.A., Kindy M.S., Franzblau C., and Sonenshein G.E.** Complex regulation of collagen gene expression in cultured bovine aortic smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 261: 6542-6547, 1986.
148. **Brown K.E., Kindy M.S., and Sonenshein G.E.** Expression of the c-myc Proto-oncogene in Bovine Vascular Smooth Muscle Cell. *J. Biol. Chem.*, 267: 4625-4630, 1992.

149. **Kindy M.S., Chang C.J., and Sonenshein G.E.** Serum deprivation of vascular smooth muscle cells enhances collagen gene expression. *J.Biol.Chem.*, 263: 11426-11430, 1988.
150. **Marhamati D.J. and Sonenshein G.E.** B-Myb Expression in Vascular Smooth Muscle Cells Occurs in a Cell Cycle-dependent Fashion and Down-regulates Promoter Activity of Type I Collagen Genes. *J.Biol.Chem.*, 271: 3359-3365, 1996.
151. **Gordon D., Reidy M. A., Benditt E.P., and Schwartz S. M.** Cell proliferation in human coronaryarteries. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 4600–4604, 1990.
152. **McCarty N.J, Bennett M.R.** The regulation of vascular smooth muscle cells apoptosis. *Cardiovascular Research* , , 45: 747-755, 2000.
153. **Slomp J, Gittenberger-de Groot AC, Glukhova MA et al.** Differentiation, dedifferentiation, and apoptosis of smooth muscle cells during the development of the human ductus arterious. *Arterioscler. Thromb. Vasc Biol.*, 17: 1003-1009, 1997.
154. **Metzler M, Hu Y, Dietrich h, Xu Q.** Increased expresión and activation of stress activated protein kinases/c-Jun NH2-terminal protein kinases in atherosclerosis lesions coincide with p53. *Am. J. Pathol.*, 156: 1875-1886, 2000.
155. **Virchow R.** Die Cellular pathologie: Sechszehnte verlesung, 14 April 1858, George Olms, Hildesheim, Germany 1966: 317-29.
156. **Isner J.M., Kearney M., Bortman S., and Passeri J.** Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation*, 91: 2703-2711, 1995
157. **Han D.K., Haudenschild C.C., Hong M.K., Tinkle B.T., Leon M.B., and Liao G.** Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in a rat vascular injury model. *Am. J. Pathol.*, 147: 267-277, 1995.

158. **Geng Y.L. and Libby P.** Evidence for apoptosis in advance human atheroma. Co-localization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *Am. J. Pathol.*,47: 251-266, 1995.
159. **Bennett M.R., Evan G.I., and Swartz S.M.** Apoptosis of rat vascular smooth muscle cells is regulated by p53 dependent and independent pathways. *Circ Res.*, 77: 266-273, 1995.
160. **Bennett M.R., Evan G.I., and Swartz S.M.** Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. *J. Clin. Invest.*, 95: 2266-2274, 1995.
161. **Kockx M.M., De M.G., Muhring J., Bult H., Bultinck J., and Herman A.G.** Distribution of cell replication and apoptosis in atherosclerotic plaques of cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis*, 120: 115-124, 1996.
162. **Kockx M.M., De M.G., Muhring J., Bult H., Bultinck J., and Herman A.G.** Apoptosis and related protein in different stages of human atherosclerotic plaques. *Circulation*, 97: 2307-2315, 1998.
163. **Mayr M, Xu Q.** Smooth muscle cells apoptosis in arteriosclerosis. *Exp. Gerontol*, 36: 969-987, 2001.
164. **Kockz M.M., and Herman A.G.** Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovascular Res.*; 45: 736-746, 2000.
165. **Kockz, M.M., De Meyer G.R.Y., Buysens N., et al.** Cell composition, replication, and apoptosis in atherosclerotic plaques after 6 months of cholesterol withdrawal. *Circ. Res.*, 83: 378-387, 1998.
166. **Hayakawa et al:** "Apoptosis and Overexpression of Bax Protein and bax mRNA in Smooth Muscle Cells within Intimal Hyperplasia of Human Radial Arteries". *Arteriorcler Tromb Vasc Biol*, 19(9): 2066-77, 1999.

-
167. **Dong C., Wilson J.E., Winters G.L., and McManus B.M.** Human transplant coronary artery disease: Pathologic evidence for Fas-mediated apoptotic cytotoxicity in allograft arteriopathy. *Lab. Invest.*, 74: 921-931, 1996.
168. **Kaplan M. and Aviram M.** Oxidized low density lipoprotein: atherogenic and proinflammatory characteristics during macrophage foam cell formation. An inhibitory role for nutritional antioxidants and serum paraoxonase. *Clin. Chem. Lab. Med.*, 37:777-787, 1999.
169. **Duff GL, McMillan GC, Ritchie AC.** The morphology of early atherosclerotic lesions of the aorta demonstrated by the surface technique in rabbits fed cholesterol. Together with a description of the anatomy of the intima of the rabbit's aorta and the "spontaneous" lesions which occur in it. *Am J Pathol*; 33: 845-861, 1957.
170. **Faggiotto. A.** New Trends in Atherosclerosis Research Atherosclerosis. *Rev Physiol*, 21: 187-194, 1990.
171. **Hasdai D., Snangiorgi G., Spagnoli L., Simari R.D., Holmes Jr D.R., Kwon H.M., Carlson P.J., Schawrtz R.S., and Lerman A.** Coronary artery apoptosis in experimental hypercholesterolemia. *Atherosclerosis*, 142: 317-325, 1999.
172. **Imanishi T., Han D. K., Hofstra L. et al.** Apoptosis of vascular smooth muscle cells is induced by Fas ligand derived from monocytes/macrophage. *Atherosclerosis*, 161:143-151, 2002.
173. **Fukuo K., Nakahashi T., Nomura S. et al.** Possible participation of Fas-mediated apoptosis in the mechanism of atherosclerosis. *Gerontology*, 43: 35-42, 1997.
174. **Cai W., Devaux B., Schaper W., and Schaper, J.** The role of Fas/APO 1 and apoptosis in the development of human atherosclerotic lesions. *Atherosclerosis*, 131: 177-186, 1997.

-
175. **Dimmeler S., Breitschopf K., Haendeler J., and Zeiher A.M.** Dephosphorylation targets Bcl-2 for ubiquitin-dependent degradation: a link between the apoptosome and the proteasome pathway. *J. Exp. Med.*, 189: 1815–1822, 1999.
176. **Geng Y. J., Henderson L. E., Levesque E. B., Muszynski M., and Libby, P.** Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler., Thromb. Vasc. Biol.*, 17: 2200–2208, 1997.
177. **Takarada S., Imanishi T., Hano T., and Nishio Y.** Oxidized low-density lipoprotein sensitizes human vascular smooth muscle cells to Fas (CD95)-mediated apoptosis. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, 30: 289-94, 2003.
178. **Patel, V. A., Zhang, Q. J., Siddle, K. et al.** Defect in insulin-like growth factor-1 survival mechanism in atherosclerotic plaque-derived vascular smooth muscle cells is mediated by reduced surface binding and signalling. *Circ. Res.*, 88: 895–902, 2001.
179. **Scheidegger K. J., James R. W., and Delafontaine P.** Differential effects of low density lipoproteins on insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and IGF-1 receptor expression in vascular smooth muscle cells. *J. Biol. Chem.*, 275: 26864–26869, 2000.
180. **Krueger K. D., Hunter III W. J., DelCore M. G., and Agrawal D. K.** Calphostin C as a rapid and strong inducer of apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells. *Int. Immunopharmacol.*, 3: 1751–1759, 2003.
181. **Ye S., Humphries S., and Henney, A.** Matrix metalloproteinases: implication in vascular matrix remodelling during atherogenesis. *Clin. Sci.*, 94: 103–110, 1998.

-
182. **Bennett M.R., Evan G.I., and Newby A.C.** Deregulated c-myc oncogene expression blocks vascular smooth muscle cells inhibition mediated by heparin, interferon-, mitogen depletion and cyclin nucleotide analogues and induces apoptotic cell death. *Circ. Res.*, 74: 525-536, 1994.
183. **Katayose D., Wersto R., Cowan K., and Seth P.** Consequences of p53 gene-expression by adenovirus vector on cell-cycle arrest and apoptosis in human aortic vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 215: 446-451, 1995.
184. **Bennett M.R., MacDonal K., Chan S.W., Boyle J.J., and Weissberg P.L.** Cooperative interaction between Rb and p53 regulate cell proliferation, senescence, and apoptosis in human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques. *Circ. Res.*, 82: 704-712, 1998.
185. **Aoki M., Morishita R., Matsushita H., Hayashi S.I., Nakagami H., Yamamoto K., Moriguchi A., Kaneda Y., Higaki J., and Ogihara T.** Inhibition of the tumor suppressor gene results in growth of human aortic vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 34: 192-200, 1999.
186. **Rodriguez-Campos A., Ruiz-Enriquez P., Faraudo S., and Badimon L.** Mitogen-induced p53 down-regulation precedes vascular smooth muscle cell migration from healthy tunica media proliferation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 21: 214-219, 2001.
187. **Matsushita et al.** "Inhibition of Growth of Human Vascular Smooth Muscle Cells by Overexpression of p21 Gene Trough Induction of Apoptosis", *Hypertension*, 31:493-8, 1998.
188. **Bennett MR, Littlewood TD, Schwartz SM, Peter LW.** Increased sensitivity of human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques to p53-mediated apoptosis. *Circ. Res*, 81: 591-599; 1997.

-
189. **Guevara N.V., Kim H.S., Antonova E.I., and Chan L.** The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation in vivo. *Nat. Med.*, 5: 335-339, 1999.
190. **Yonemitsu Y., Kaneda Y., Tanaka S., Nakashima Y., Komori K., Sugimachi K., and Sueishi K.** Transfer of wild-type p53 gene effectively inhibits vascular smooth muscle cells proliferation in vivo and in vitro. *Circ. Res.*, 82: 147-156, 1998.
191. **Mercer J., Figg N., Stoneman V., Braganza D., and Bennett M.R.** Endogenous p53 protects vascular smooth muscle cells from apoptosis and reduces atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Circ. Res.*, 96(6): 667-674, 2005.
192. **Shi Y., Hutchinson H.G., Hall D.J., et al.** Downregulation of c-myc expression by antisense oligonucleotides inhibits proliferation of human smooth muscle cells. *Circulation*, 88: 1190–1195, 1993.
193. **Parkes J.L., Cardell R.R., Hubbard F.C., et al.** Cultured human atherosclerotic plaque smooth muscle cells retain transforming potential and display enhanced expression of the myc protooncogene. *Am. J. Pathol.*, 138: 765–775, 1991.
194. **De nigris F., Youssef T., Ciafré S.A., Franconi F., Anania V., Condorelli G.L., Palinski W., and Napoli C.** Evidence for oxidative activation of c-Myc dependent nuclear signaling in human coronary smooth muscle cells and in early lesions of Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbits. *Circulation*, 102: 2111-2117, 2000.
195. **Bennett M.R., Littlewood T.D, Hancock D.C., Evan G.I., and Newby A.C.** Down-regulation of the c-myc protooncogene in inhibition of vascular smooth muscle cells proliferation: a signal for growth arrest? *Biochem. J.*, 302: 701-708, 1994.

196. **MacDonald K. and Bennett R.** cdc25A is necessary but not sufficient for optimal c-myc induced apoptosis and cell proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cir. Res.*, 84: 820-830, 1999.
197. **Bennet MR et al.** Deregulated expression of the c-myc oncogene abolishes inhibition of proliferation of rat VSMC, and induce apoptosis. *Circ Res*, 74(3): 525-36, 1994.
198. **De nigris F., Lerman L.O., Rodríguez-Porcel M., De montis M.P., Lerman A., Napoli C.** c-Myc activation in early coronary lesions in experimental hipercolesterolemia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281: 945-950, 2001.
199. **Hajra L., Evans A.I., Chen M., Hyduk S.J., Collins T., and Cybulsky M.I.** The NF-kappaB signal transduction pathway in aortic endothelial cells is primed for activation in regions predisposed to atherosclerotic lesion formation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97: 9052-9057, 2000.
200. **Saxena A., McMeekin J.D.,and Thompson DJ.** Expression of Bcl-x, Bcl-2, Bax, and Bak in endarterectomy and atherectomy specimens. *J. Pathol.*, 196(3):335-342, 2002.
201. **Krajewski S., Krajewska M., Shabaik A., Miyashita T., Gang-Wang H., and Reed JC.** Immunohistochemical determination of in vivo distribution of Bax, a dominant inhibitor of Bcl-2. *Am. J. Pathol.*, 145: 1323–1336, 1994.
202. **Pollman M.J., Hall J.L., Mann M.J., Zhang L., and Gibbons G.H.** Inhibition of neointimal cell bcl-x expression induces apoptosis and regression of vascular disease. *Nature Med.*, 4: 222–227, 1998.
203. **Esterbauer H., Wag H., and Puhl H.** Lipid peroxidation and its role in atherosclerosis. *Br. Med. Bull.*, 49: 566–576, 1993.
204. **Konstadoulakis M.M., Kyjionis G.D., Karagiani M., et al.** Evidence of apoptosis in human carotid atheroma. *J. Vasc. Surg.*, 27: 733–739, 1998.

-
205. **Schwartz S.M., deBlois D., and O'Brien E.R.** The intima: soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ. Res.*, 77: 445–465, 1995.
206. **Kojda G. and Harrison D.** Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc. Res.*, 43: 562–571, 1999.
207. **Betteridge D. J.** What is oxidative stress?. *Metabolism, Clin. Exp.*, 49: 3–8, 2000.
208. **Napoli C., De nigris, F., and Palinski W.** Multiple role of reactive oxygen species in the arterial wall. *J. Cell. Biochem.*, 82: 674–682, 2001.
209. **Wilson P. W., Garrison R. J., Castelli W. P., Feinleib M., McNamara P. M. and Kannel W. B.** Prevalence of coronary heart disease in the Framingham Offspring Study: role of lipoprotein cholesterol. *Am. J. Cardiol.*, 46: 649–654, 1980.
210. **Berliner J.L., Leitinger A., Watson J., Huber A., Fogelman A., and Navad M.** Oxidized lipids in atherogenesis: formation, destruction and action. *Thromb. Haemost.*, 78: 195-199, 1997.
211. **Chisolm G.M., and Steinberg D.** The oxidative modification hypothesis of atherogenesis. An overview. *Free Radic. Biol. Med.*, 28: 1815-1826, 2000.
212. **Steinberg D.** Low density lipoprotein oxidation and its pathological significance. *J. Biol. Chem.*, 275: 10002-10008, 1997.
213. **Diaz M.N., Frei B., Vita J.A., and Keaney Jr J.F.** Antioxidants and atherosclerotic Heart disease. *N. Engl. J. Med.*, 337: 408-416, 1997.

-
214. **Chaufour X., McLachlan C., McGuire M., White G., King N., and Hambly B.** Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by cholesterol and its oxides in vitro and in vivo. *Atherosclerosis*, 148: 365-374, 2000.
215. **Schroepfer G.J.** Oxysterols: modulators of cholesterol metabolism and other processes. *Physiol. Rev.*, 80: 361-554, 2000.
216. **Rusiñol A.E., Thewke D., Liu J., Freeman N., Panini S.R., and Sinensky M.S.** AKT/protein kinase B regulation of Bcl family members during oxysterol-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.*, 279: 1392-1399, 2004.
217. **Napoli C., Quehenberger O., De nigris F., Abete P., Glass C.K., and Palinski, W.** Mildly oxidized low density lipoprotein activates multiple apoptotic signalling pathways in human coronary cells. *FASEB J.*, 14: 1996–2007, 2000.
218. **Okura Y., Brink M., Itabe H., Scheidegger K.J., Kalangos A., and Delafontaine P.** Oxidized low-density lipoprotein is associated with apoptosis of vascular smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Circulation*, 102(22): 2680-2686, 2000.
219. **Dijkers P.F., Birkenkamp K.U., Lam E.W., Thomas N.S., Lammers J.W., Koenderman L., and Coffey P.J.** FKHR-L1 can act as a critical effector of cell death induced by cytokine withdrawal: protein kinase B-enhanced cell survival through maintenance of mitochondrial integrity. *J. Cell Biol.*, 156: 531-542, 2002.
220. **Kirito K., Watanabe T., Sawada K., Endo H., Ozawa K., and Komatsu N.** Thrombopoietin regulates Bcl-X_L gene expression through Stat5 and phosphatidylinositol 3-kinase activation pathways. *J. Biol. Chem.*, 277: 8329-8337, 2002.

221. **Nishio E. and Watanabe Y.** Oxysterols induced apoptosis in cultured smooth muscle cells through CPP32 protease activation and bcl-2 protein downregulation. *Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 226: 928-934, 1996.
222. **Lee T. and Chau L.** Fas/Fas ligand-mediated death pathway is involved in oxLDL-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 280: 709-718, 2001.
223. **Dimmeler S. and Zeiher A.M.** Reactive oxygen species and vascular cell apoptosis in response to angiotensin II and pro-atherosclerotic factors. *Regul Pept.*, 90(1-3): 19-25, 2000.
224. **Vivian Y. Lee, David S. McClintock, Matthew T. Santore, G. R. Scott Budinger, and Navdeep S. Chandel.** Hypoxia Sensitizes Cells to Nitric Oxide-induced Apoptosis. *The journal of Biological Chemistry*, 277:16067–16074, 2002
225. **U. Wenzel, S. Kuntz, UJ. De Sousa and Hannelore.** Nitric oxide suppresses apoptosis in human colon cancer cells by scavenging mitochondrial superoxide anions. *Int. J. Cancer*, 106: 666–675, 2003.
226. **Hsieh C.C., Yen M.H., Yen C.H., and Lau Y.T.** Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis via generation of reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc. Res.*, 49(1): 135-145, 2001.
227. **Orrenius S., Ankarcróna M., and Nicoretta P.** Mechanisms of calcium-related cell death. *Adv. Neurol.*, 71: 137-151, 1996.
228. **Ares M.P.S, Pörn-Ares M.I., Thyberg J., Juntti-Berggren L., Berggren P.O., Diczfalusy U., Kallin B., Björkhem I., Orrenius S., and Nilsson J.** Ca²⁺ channel blockers verapamil and nifedipine inhibit apoptosis induced by 25-hydroxycholesterol in human aortic smooth muscle cells. *J. Lipids Res.*, 38: 2049-2061, 1997.

229. **Peng SK, Tham P, Mikkelsen B.** Cytotoxicity of oxidation derivatives of cholesterol on cultured aortic smooth muscle cells and their effect on cholesterol biosynthesis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 32:1033-1042, 1980.
230. **Guijarro C., Blanco-Colio L.M., Ortego M., Alonso C., Ortiz A., Plaza J.J., Diaz C., Hernandez G., and Egido J.** 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ. Res.*, 83: 490-500, 1998.
231. **Wang X., Zelenski N.G., Yang J., Sakai J., Brown M.S., and Goldstein J.L.** Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis. *EMBO J.*, 15: 1012-1020, 1996.
232. **Lei Z.B., Zhang Z., Jing Q., Qin Y.W., Pei G., Cao B.Z., Li X.Y.** OxLDL upregulates CXCR2 expression in monocytes via scavenger receptors and activation of p38 mitogen-activated protein kinase. *Cardiovasc Res.*, 53(2): 524-532, 2002.
233. **Li D., Yang B., and Mehta J. L.** Ox-LDL induces apoptosis in human coronary artery endothelial cells: role of PKC, PTK, bcl-2 and Fas. *Am. J. Physiol.*, 275: H568–H576, 1998.
234. **Agrawal S., Agrawal M.L., Chatterjee-Kishore M., Stark G.R., and Chilsolm G.M.** Stat-1-Dependent, p53 independent expression of p21 Modulates oxysterol-induced apoptosis. *Mol. Cell. Biol* 22:1981-1992, 2002.
235. **de Nigris F, Youssef T, Ciafre S, Franconi F, Anania V, Condorelli G, Palinski W, Napoli C.** Evidence for oxidative activation of c-Myc-dependent nuclear signaling in human coronary smooth muscle cells and in early lesions of Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits: protective effects of vitamin E. *Circulation*, 102:2111-7, 2000.

236. **Li J., Li W., Su J., Liu W., Altura B.T., and Altura B.M.** Peroxynitrite induces apoptosis in rat aortic smooth muscle cells: posible relation to vascular diseases. *Exp. Biol. Med.*, 229: 264-269, 2004.
237. **Ghae I.H., Park K., Kim H., and Oh B.** Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspasa-3 in rat vascular smooth muscle cells. *Clin. Chim. Acta*, 83-91, 2004.
238. **Zhao Z., Francis C.E., Welch G., Loscalzo J., and Ravid K.** Regulated glutathione prevents nitric oxide-induced apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta*, 1359: 143-152, 1997.
239. **Calmels S., Hainaut P., and Ohshima H.** Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res.*, 57: 3365-3369, 1997.
240. **Iwashina M., Shichiri M., Marumo F., and Hirata Y.** Transfection of inducible nitric oxide synthase gene causes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 98: 1212-1218, 1998.
241. **Geng Y., Wu Q., Muszynski M., Hasson G., and Libby P.** Apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by in vitro stimulation with interferon-gamma, tumor necrosis factor-alpha, and interleukin-1-beta. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 16: 19-27, 1996.
242. **Bennet M.R.** Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and plaque rupture. *Cardio Res.*, 41: 361-368, 1999.
243. **Lau, H.** Citotoxicity of nitric oxide donors in smooth muscle cells is dependent on phenotype, and mainly due to apoptosis. *Atherosclerosis*, 166: 223-232, 2003.

-
244. **Phoa N. and Epe B.** Influence of nitric oxide on the generation and repair of oxidative DNA damage in mammalian cells. *Carcinogenesis*, 23: 469–475, 2002.
245. **Tian B., Liu J., Bitterman P.B., and Bache R.J.** Mechanisms of cytokine-induced NO-mediated cardiac fibroblast apoptosis. *Am. J. Physiol. Heart. Circ.Physiol.*, 283: H1958–1967, 2002.
246. **Ishida A., Sasaguri T., Miwa Y., Kosaka C., Taba Y., and Abumiya T.** Tumor suppressor p53 but not cGMP mediates NO-induced expression of p21(Waf1/Cip1/Sdi1) in vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.*, 56: 938–946, 1999.
247. **Yamaguchi A., Tamatani M., Matsuzaki H., Namikawa K., Kiyama H., Vitek M.P., Mitsuda N., and Tohyama M.** Akt activation protects hippocampal neurons from apoptosis by inhibiting transcriptional activity of p53. *J. Biol. Chem.*, 276: 5256–5264, 2001.
248. **Schneiderhan N., Budde A., Zhang Y., and Brüne B.** Nitric oxide induces phosphorylation of p53 and impairs nuclear export. *Oncogene*, 22:2857-68, 2003.
249. **Wang X., Michael D., de Murcia G., and Oren M.** p53 Activation by nitric oxide involves down-regulation of Mdm2. *J. Biol. Chem.*, 277: 15697–15702, 2002.
250. **Ibe W., Bartels W., Lindemann S., Grosser T., Buerke M., Boissel J.P., Meyer J., and Darius H.** Involvement of PKC and NF- κ B in nitric oxide induced apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells. *Cell Physiol. Biochem.*, 11 :231:240, 2001.
251. **Jun C.D., Pae H.O., Kwak H.J., Yoo J.C., Choi B.M.M., Oh C.D., Chun J.S., and Chung H.T.** Modulation of nitric oxide-induced apoptotic death of HL-60 cells by protein kinase C and protein kinase A through mitogen-activated

- protein kinases and CPP32-like protease pathways. *Cell Immunol.*, 194, 36–46, 1999.
252. **Kim S.J., Ju J.W., Oh C.D., Yoon Y.M., Song W.K., Kim J.H., Yoo Y.J., Bang O.S., Kang S.S., and Chun J.S.** ERK-1/2 and p38 kinase oppositely regulate nitric oxide-induced apoptosis of chondrocytes in association with p53, caspase-3, and differentiation status. *J. Biol. Chem.*, 277: 1332–1339, 2002.
253. **Kibbe M.R., Li J., Nie S., Choi B.M., Kovesdi I., Lizonova A., Billiar T.R., and Tzeng E.** Potentiation of nitric oxide-induced apoptosis in p53^{-/-} vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 282: C625–634, 2002.
254. **Gu M., Lynch J., and Brecher P.** Nitric oxide increases p21(Waf1/Cip1) expression by a cGMP-dependent pathway that includes activation of extracellular signal-regulated kinase and p70(S6k). *J. Biol. Chem.*, 275: 11389–11396, 2000.
255. **Chae H.J., So H.S., Chae S.W., Park J.S., Kim M.S., Oh J.M., Chung Y.T., Yang S.H., Jeong E.T., Kim H.M., Park R.K., and Kim H.R.** Sodium nitroprusside induces apoptosis of H9C2 cardiac muscle cells in a c-Jun N-terminal kinase-dependent manner. *Int. Immunopharmacol.*, 1: 967–978, 2001.
256. **Cheng A., Chan S.L., Milhavet O., Wang S., and Mattson M.P.** p38 MAP kinase mediates nitric oxide-induced apoptosis of neural progenitor cells. *J. Biol. Chem.*, 276: 43320–43327, 2001.
257. **Ghatan S., Larner S., Kinoshita Y., Hetman M., Patel L., Xia Z., Youle R.J., and Morrison R.S.** p38 MAP kinase mediates bax translocation in nitric oxide-induced apoptosis in neurons. *J. Cell Biol.* 150: 335–347 seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 240: 419–424, 2000.
258. **Park D.S., Stefanis L., Yan C.Y.I., Farinelli S.E., and Greene L.A.** Ordering the cell death pathway. Differential effects of BCL2, an interleukin-1-converting

- enzyme family protease inhibitor, and other survival agents on JNK activation in serum/nerve growth factor-deprived PC12 cells. *J. Biol. Chem.*, 271: 21898, 1996.
259. **Zhu W.H., Majluf-Cruz A., and Omburo, G.A.** Cyclic AMP-specific phosphodiesterase inhibitor rolipram and RO-20-1724 promoted apoptosis in HL60 promyelocytic leukemic cells via cyclic AMP-independent mechanism. *Life Sci.*, 63: 265, 1998.
260. **Hyde M.A., Lange P.A., and Nakayama D.K.** Nitric oxide and cyclic guanosine monophosphate stimulate apoptosis via activation of the Fas-Fas-L Pathway. *J. Surg. Res.*, 101: 183-189, 2001.
261. **Gopalakrishna R., Chen Z.H., and Gundimeda U.** Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding. *J. Biol. Chem.*, 268: 27180-27185, 1993.
262. **Messmer U.K., Lapetina E.G., and Brüne B.** Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is antagonized by protein kinase C- and protein kinase A-activating compounds. *Mol. Pharmacol.*, 47: 757-765, 1995.
263. **Shyposhinkova V.V., Dobrovinskaya O.R., Eidus L.K., and Korystov Y.N.** Dependence of thymocyte apoptosis on protein kinase C and phospholipase 32. *FEBS Lett.*, 348: 317-319, 1994.
264. **Jun C.D., Park S.J., Choi B.M., Kwak H.J., Park Y.C., Kim M.S., Park R.K., and Chung H.T.** Potentiation of the activity of nitric oxide by the protein kinase C activator phorbol ester in human myeloid leukemic HL-60 cells: association with enhanced fragmentation of mature genomic DNA. *J. Immunol.*, 176: 41-49, 1997.
265. **Huerta-Yepez S, et al.** Nitric oxide sensitizes prostate carcinoma cell lines to TRAIL-mediated apoptosis via inactivation of NF-kappa B and inhibition of bcl-X_L expression. *Oncogene*. 23: 4993-5003, 2004.

-
266. **Shin W.S., Hong Y.H., Peng H.B., De Caterina R., Libby P., and Liao J.K.** Nitric oxide attenuates vascular smooth muscle cell activation by interferon-. *J. Biol. Chem.*, 271: 11317-11324, 1996.
267. **Takeda Y., Tashima M., Takahashi A., Uchiyama T., and Okazaki T.** Ceramide generation in nitric oxide-induced apoptosis. Activation of magnesium-dependent neutral sphingomyelinase via caspase-3. *J. Biol. Chem.*, 274: 10654–10660, 1999.
268. **Huwiler A., Pfeilschifter J., and van den Bosch, H.** Nitric oxide donors induce stress signalling via ceramide formation in rat renal mesangial cells. *J. Biol. Chem.*, 274: 7190–7195, 1999.
269. **Boyd C.S. and Cadenas E.** Nitric oxide and cell signalling pathways in mitochondrial-dependent apoptosis. *Biol. Chem.*, 383: 411–423, 2002.
270. **Moncada S. and Erusalimsky J.D.** Does nitric oxide modulate mitochondrial energy generation and apoptosis? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 3: 214–220, 2002.
271. **Poderoso J.J., Carreras M.C., Lisdero C., Riobo N., Schopfer F., and Boveris A.** Nitric oxide inhibits electron transfer and increases superoxide radical production in rat heart mitochondria and submitochondrial particles. *Arch. Biochem. Biophys.*, 328: 85–92, 1996.
272. **Kim Y.M., Bombeck C.A., and Billiar T.R.** Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circ. Res.*, 84: 253–256, 1999.
273. **Li JR, Billiar T.R., Talanian R.V., and Kim Y.M.** Nitric oxide reversibly inhibits seven members of the caspase family via S-nitrosylation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 240: 419-424, 1997.

274. **Brookes P.S., Salinas E.P., Darley-USmar K., et al.** Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *J. Biol. Chem.*, 275: 20474–20479, 2000.
275. **Delikouras A., Hayes M., Malde P., Lechler R.I., and Dorling A.** Nitric oxide-mediated expression of Bcl-2 and Bcl-X_L and protection from tumor necrosis factor- α -mediated apoptosis in porcine endothelial cells after exposure to low concentrations of xenoreactivenatural antibody. *Transplantation*, 71: 599–605, 2001.
276. **Genaro A.M., Hortelano S., Álvarez A., Martínez C., and Bosca L., and Splenic B.** Lymphocyte programmed cell death is prevented by nitric oxide release through mechanisms involving sustained Bcl-2 levels. *J. Clin. Invest.*, 95: 1884–1890, 1995.
277. **Fruchrt J.C., and Duriez P.** Hight density lipoproteins and coronary heart disease. Future prospects in gene therapy. *Biochimie.*, 80: 167-72, 1998.
278. **Yeagle P.L.**, Lipid regulation of cell membrane structure and function. *FASEB J.*, 3: 1833-1842, 1989.
279. **Bastiannse E.M., Hold K.M., and Van der Laarse A.** The effect of membrane cholesterol content on ion transport processes in plasma membranes. *Cardiovasc. Res.*, 33: 272-283, 1997.
280. **Moghadasian M.H., Frohlich J.J., and McManus B.M.** Advances in experimental dyslipidemia and atherosclerosis. *Lab. Invest.*, 81: 1173-1183, 2001.
281. **Brown A.J., Leon S.L., Dean R.T., and Jessup W.** 7-hidroperoxycholesterol and its products in oxidized low density lipoprotein and human atherosclerosis plaques. *J. Lipid Res.*, 38: 1730-1745, 1991.

-
282. **Wolfbauer G., Glick J.M., Minor L.K., and Rothblat G.H.** Development of the smooth muscle foam cell: uptake of macrophage lipid inclusions *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 83: 7760-7764, 1986.
283. **Pomerantz K.B. and Haijar D.P.** Eicosanoid metabolism in cholesterol-enriched arterial smooth muscle cells: reduced arachidonate release with concomitant decrease in cyclooxygenase products. *J.Lipid Res.*, 30: 1219-1231, 1989.
284. **Klouche M., Rose-John S., Schmiedt W., and Bhakdi S.** Enzymatically degraded, nonoxidized LDL induces human vascular smooth muscle cell activation, foam cell transformation, and proliferation *Circulation*, 101: 1799-1805, 2000.
285. **Carazo A., Alejandro M.J., Díaz R., Ríos A., Castillo M., and Linares A.** Changes in cultured arterial Smooth muscle cells isolated from chicks upon Cholesterol feeding. *Lipids*, 33: 181-190, 1997.
286. **Rong J.X., Shapiro M., Trogan E., and Fisher E.A.** Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100: 13531-13536, 2003.
287. **Feng B., Yao P.M., Li Y., Devlim C.M., Zhang D., Harding H.P., Sweenedy M., Rong J.X., Kuriakose G., Fisher E.A. et al.** The endoplasmic reticulum is the site of cholesterol-induced cytotoxicity in macrophages. *Nat. Cell Biol.*, 5: 781-792, 2003.
288. **Meerarani P., Smart E.J., Toborel E.M., Boissonneault G.A., and Hennig B.** Cholesterol attenuates linoleic acid-induced endothelial cell activation. *Metabolism*, 52: 493-500, 2003.
289. **Yao P.M. and Tabas I.** Free cholesterol loading of macrophages induces apoptosis involving the Fas Pathway. *J. Biol. Chem.*, 275(31): 23807-23813, 2000.

-
290. **Yao P.M. and Tabas I.** Free cholesterol loading of macrophages is associated with widespread mitochondrial dysfunction of the mitochondrial dysfunction and activation of the mitochondrial apoptosis pathway. *J. Biol Chem.*, 276(45): 42468-42476, 2001.
291. **Pérez-Sala D., Collado Escobar D., and Mollinedo F.** Intracellular alkalization suppresses lovastatin-induced apoptosis in HL-60 cells through the inactivation of a pH-dependent endonuclease. *J. Biol. Chem.*, 270: 6235-6242, 1995.
292. **Jones K.D., Couldwell W.T., Hinton D.R., Su Y., He S., Anker L., and Law RE.** Lovastatin induces growth inhibition and apoptosis in human malignant glioma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 205: 1681-1687, 1994.
293. **Blanco-Colio L.M., Villa A., Ortego M., Hernández-Presa M.A., Pascual A., Plaza J.J., and Egido J.** 3-Hydroxy-3-methyl-glutaryl coenzyme A reductase inhibitors, atorvastatin and simvastatin, induce apoptosis of vascular smooth muscle cells by downregulation of Bcl-2 expression and Rho A prenylation. *Atherosclerosis*, 161: 17-26, 2002.
294. **Gómez J., Martínez A.C., Giry M., García A., Rebollo A.** rho prevents apoptosis through Bcl-e expresión: implications for interleukin-2 receptor signal transduction. *Eur. J. Immunol.*, 27: 2793-2799, 1997.
295. **Fielding C.J, Bist A., and Fielding P.E.** Intracellular cholesterol transport in synchronized human skin fibroblasts *Biochemistry*, 38: 2506-2513, 1999.
296. **Bist A., Fielding C.J., and Fielding P.E.** p53 regulates caveolin gene transcription, cell cholesterol, and growth by a novel mechanism *Biochemistry*, 39: 1966-1972, 2000.

-
297. **Davis H.R., Bridenstine R.T., Vesselinovith D., and Wissler R.W.** Fish oil inhibits development of atherosclerosis in rhesus monkey. *Arteriosclerosis*, 7: 441-449, 1987.
298. **Rogers K.A., Adelstein R., and Max E.P.A.** Fish oil enhances cholesterol-induced intimal foam cell formation in rabbits. *Am. J. Pathol.*, 137: 945-951, 1990.
299. **Fincham J.E., Gouws E., Woodroof C.W., van Wyk M.J., Kruger M., Smuts C.M., van Jaarsvel P.J., Taljaard J.J.F., Schall R., Strauss J.A., and Benade A.J.S.** Atherosclerosis: chronic effects of fish oil and a therapeutic diet in nonhuman primates. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 11: 719-732, 1993.
300. **Wolfe M.S., Sawyer J.K., Morgam T.M., Bullock B.C., and Rudel L.L.** Dietary polyunsaturated fat decreases coronary artery atherosclerosis in a pediatric-aged population of African green monkey. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 14: 587-597, 1994.
301. **Barbeau M.L., Klemp K.F., and Rogers K.A.** Dietary fish oil influence on lesion regression in the porcine model of atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17: 688-694, 1997.
302. **Nordoy A., Marchioli R., Arneses H., and Videbaek J.** n-3 Polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *Lipids*, 36: 127-129, 2001.
303. **Faggin E., Puato M., Chiavegato A., Franch R., Paulette P., and Sartore S.** Fish oil supplementation prevents neointima formation in nonhypercholesterolemic balloon-injured rabbit carotid artery by reducing medial and adventitial cell activation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 20: 152-163, 2000.
304. **Chen M.F., Hsu H.C., and Lee Y.T.** Fish oil supplementation attenuates myointimal proliferation of the abdominal aorta after balloon injury in diet induced hypercholesterolemic rabbits. *Prostaglandins*, 49: 295-310, 1995.

-
305. **Jump D.B.** Dietary polyunsaturated fatty acids and regulation of gene transcription. *Curr. Opin. Lipidol.*, 13: 155-164, 2002.
306. **Berger A., Match D.M., German J.B., and Roberts M.A.** Unraveling lipid metabolism with microarray: effects of arachidonate and docosahexaenoate acid on murine hepatic and hippocampal gene expression. *Genome Biol*, 3:reprint0004.1-0004.54, 2002.
307. **Takahashi M., Tsuboyama-Kasaoka N., Nakatani T., et al.** Fish oil feeding alters liver gene expressions to defend against PPARalpha activation and ROS production. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 282: G338-G348, 2002.
308. **Jump D.B. and Clarke S.D.** Regulation of gene expression by dietary fat. *Annu. Rev. Nutr.*, 19: 63-90, 1999.
309. **Narayanan B.A., Narayanan N.K., and Reddy B.S.** Docosahexaenoic acid regulated genes and transcription factors inducing apoptosis in human colon cancer cells. *Int. J. Oncol.*, 19: 1255-1262, 2001.
310. **Akbar M. and Kim H.Y.** Protective effects of docosahexaenoic acid in staurosporine-induced apoptosis: involvement of phosphatidylinositol-3 kinase pathway. *J. Neurochem.*, 82: 655-665, 2002.
311. **Díaz Durán R.** Caracterización de cultivos de células de músculo liso arterial en una aterosclerosis experimental temprana. Tesis doctoral de la Universidad de Granada. *Tesis doctoral de la Universidad de Granada* 1994.
312. **Goldstein S.** The Human Fibroblast Comes of Age. *Science* 249: 1129-1133, 1990.
313. **Hanon E., Vanderplasschen A., and Pastoret P.P.** The Use of Flow Cytometry for Concomitant Detection of Apoptosis and Cell Cycle Analysis. *Biochemica* 2: 25-27, 1996.

-
314. **Chomczynski P. and Sacchi N.** Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Anal.Biochem.* 162: 156-159, 1987
315. **Robert E. and Farrell J.R.** RNA methodologies. Academic Press, Inc. 1993.
316. **Sambrook J., Fritsch E.F., and Maniatis T.** Molecular Cloning. A laboratory manual. Second Edition. *Cold Spring Harbor lab.Press.* Cap.7: 1989.
317. **Köhler T.H., Labner D., Rost A.K., Thamm B., Pustowitz B., and Remke H.** Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction. Nonradioactive PCR methods. Springer-Verlag. 1995.
318. **Chelly J., Montarras D., Pinset C., Berwald-Netter Y., Kaplan J.C., and Kahn A.** Quantitative estimation of minor mRNAs by cDNA-polymerase chain reaction. *Eur.J.Biochem.* 187: 691-698, 1990.
319. **Wang A.M., Doyle M.V., and Mark D.F.** Quantitation of mRNA by the polymerase chain reaction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 86: 9717-9721, 1989.
320. **Michael W.Pfaffl.** A new mathematical model for relative quantification in real-time PCR. *Nucleic Acids Reseache*, 29(9): e45, 2001.
321. **Carazo A.** Metabolismo lipídico en células de músculo liso de aorta de pollo en cultivo. Cambios en la actividad enzimática y en el RNA mensajero de la HMG-CoA reductasa. *Tesis doctoral de la Universidad de Granada* 1999.
322. **Hsu YT and Youle JR.J.** Nonionic detergents induce dimerization among members of the Bcl-2 family. *J. Biol. Chem.* 272: 13829-13834, 1997.
323. **Mol MAE, De Smet RC, Terpstra AHM, West CE.** The effect of dietary protein and colesterol concentration and lipoprotein pattern in the serum of chickens. *J. Nutr.*, 112:1029-1035, 1982.

324. **Moss NS, benditt EP.** The ultrastructure of espontaneous and experimentally induced arterial lesions. Iii. The cholesterol-induced lesions and the effect of a cholesterol and oil diet on the preexinsting spontaneous plaque in the chicken aorta. *Lab. Invest*, 23: 521-535, 1970.
325. **Lucas A, Yue W, Jiang XY, Liu L, Yang W, Vauser J, Schneider W, Tulip J, Changpar A, Dait E, Perk M, Montague P, Garbutt M, Radosawljivic M.** Development of an avian model for restenosis. *Atherosclerosis*, 119: 17-41, 1996.
326. **Aguilera JA, Linares A, Arce V, Garcia-Peregrin E.** Effect of dietary colesterol on mevalonate metabolism by sterol and non-sterol pathway. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 122: 945-948, 1984.
327. **Gonzales-Pacanowska D, Marco c, Garcia-Martinez J, Linares A, Garcia-Peregrin E.** Feedback inhibition of mevalonate-5-phosphate kinase and mevalonate-5-pyrophosphate descarboxilase by cholesterol feeding. *Nutr. Rep. Int*, 31: 121-127, 1985.
328. **Alejandro MJ, Ramírez H, Segovia JL, García-Peregrín E.** Effect of dietary colesterol and cholestyramine on developmental pattern of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Ann. Nutr. Metab.*, 29:111-118, 1985.
329. **García-Gonzalez M, Segovia JL, Alejandro MJ.** Homeostatic restoration of microsomal lipids and enzyme changes in HMG-CoA reductasa and Acyl-CoA: colesterol acyltransferase in chick liver. *Mol. Cell. Biochem.*, 115:173-178, 1992.
330. **Alejandro MJ, Segovia JL, García-González M.** The reversal of the effects on HMG-CoA reductase activity and microsome lipid composition in chick livers caused by short-period colesterol feeding. *Life Science*, 49:361-365, 1991.

-
331. **Castillo M, Amalik F, Linares A, García-Peregrín E.** Fish oil reduces cholesterol and arachidonic acid levels in plasma and lipoproteins from hypercholesterolemic chicks. *Mol. Cell. Biochem.*, 210: 121130, 2000.
332. **Pickering JG, Weir L, Rosenfeld K, Stetz J, Jikanowski J, and Isner JM.** Smooth muscle cells outgrowth from human atherosclerotic plaque implications for the assessment of lesion biology. *J Am. Coll. Cardiol*, 20:430-439, 1992.
333. **Edwards IJ and Wagner WD.** Distinct synthetic and structural Characteristic of proteoglycans produced by cultured artery smooth cells of atherosclerosis-susceptible pigeons. *J. Biol. Chem*, 263:9612-9620, 1988.
334. **Brown MS and Goldstein JL.** Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J. Lipid Res.* 21:505-517. 1980
335. **Kocks M, Muhring J, Knaapen M, de Meyer G.** RNA synthesys and splicing interferes with DNA in situ end labelling techniques used to detect apoptosis. *Am. J. Pathol*, 152:885-888, 1998.