



TESIS DOCTORAL

EFFECTO DEL COLESTEROL SOBRE LA SÍNTESIS Y LA REMODELACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO EN CULTIVO.

Memoria que presenta el licenciado en
Bioquímica, Rogelio Jesús Palomino Morales,
para optar al grado de Doctor.

Fdo. Rogelio Jesús Palomino Morales.

VºBº

DIRECTORES DEL TRABAJO

M^a José Alejandro Pérez

Dra. en Ciencias Biológicas

Profesora Titular del Departamento de

Bioquímica y Biología Molecular I

Universidad de Granada

Ana Linares Gil

Dra. en Ciencias Biológicas

Catedrática del Departamento

de Bioquímica y Biología Molecular I

Universidad de Granada

Fdo. M^a José Alejandro

Fdo. Ana Linares Gil

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Rogelio Jesús Palomino Morales
D.L.: GR.1621-2008
ISBN: 978-84-691-4879-2

La presente memoria ha sido realizada en su totalidad en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada, con ayuda de una beca de Investigación con cargo al Proyecto "Producción de matrices tridimensionales a partir de cultivos de células de musculo liso de aorta de pollo: Aplicaciones a la mejora del mantenimiento de cultivos de células humanas" (PI030829). Ha sido financiada con cargo al grupo de investigación "Metabolismo de SMC en la aterosclerosis" (CTS 168) financiado por las subvenciones obtenidas de la Junta de Andalucía y por el proyecto concedido por el Instituto Carlos III "Producción de matrices tridimensionales a partir de cultivos de células de musculo liso de aorta de pollo: Aplicaciones a la mejora del mantenimiento de cultivos de células humanas" (PI030829).

A mis padres

A Elena

AA.- Ácido araquidónico

ABC.- *ATP-binding cassette*

ACAT.- Acil-CoA-colesterol acil-transferasa

AGPI.- Ácidos grasos poli-insaturados

AI.- Angiotensina I

AII.- Angiotensina II

Akt.- Familia de genes homólogos al oncogen viral *V-akt* que produce cáncer de timo en ratones.

ALA.- Ácido α linoléico

AP-1.- proteína activadora-1

Apo B.- Apoloproteína B

Arf.- Factor de ribosilación de ADP

RNA.- Ácido ribonucleico

mRNA.- RNA mensajero

tRNA.- RNA de transferencia

ATCC.- *American Type Culture Collection*

bHLHLZ.- Proteínas de regulación transcripcional (*basic élix-loop-élix leucine-zipper*)

BSA.- Albumina sérica bovina

CE.- Células endoteliales

Ci.- Curios

Cox-2.- Ciclooxygenasa-2

CRMP-2.- Proteína 2 mediadora de la respuesta a colapsina

CS.- Condroitín sulfatos

Cys.- Cisteína

DBD.- Dominio de unión a ADN

DHA.- Ácido decosahecanoico

dNTPs.- Desoxinucleótido trifosfato

DRIP.- proteínas de interacción con receptores de Vit. D.

DS.- Dermatan sulfatos

DTT.- Ditioneitol

ECM.- Matrix extracelular

Edg.- Gen de diferenciación endotelial

EDTA.- Ácido etilén diaminotetraacético

EGF.- Factor de crecimiento endotelial

ELAM-1/E-selectina.- Molécula de adhesión de células endoteliales-1

eNOS.- Óxido nítrico sintasa endotelial

EPA.- Ácido eicosapentaenoico

Erg-1.- Gen de respuesta al crecimiento temprano 1.

ERK.- quinasas reguladas por señales extracelulares

ERM.- Familia de proteínas ezrina/raixina/moesina

FACIT.- Fibras con interrupción de la triple hélice

FGF.- Factor de crecimiento de fibroblastos

FITC.- Isotiocianato de fluoresceína

FPP.- Farnesil pirofosfato

FSB.- Suero bovino fetal

Ftase.- Farnesiltransferasa

GAG.-Glicosaminoglicanos

GAP.- Proteína que activa la capacidad intrínseca de estas proteínas para hidrolizar GTP

GDI.- Inhibidor del intercambio de nucleótido guanina

GDP.- Guanosín difosfato

GEF.- Factor de intercambio de nucleótido guanina

GGPP.- Geranylgeranyl pirofosfato

GGTase.- Geranylgeranyltransferasa

GGTI-298.- Inhibidor específico de la geranylgeranyltransferasa

Gly.- Glicina

GPCR.- Receptores acoplados a proteínas G

GPI.- Glicosil-fosfatidilinositol

GRGDS.- Sitio -Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-

GTP.- Guanosín trifosfato

H³.- Tritio

HDL.- Lipoproteína de alta densidad.

HMG-CoA.- 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A reductasa

HS.- Heparán sulfatos, heparina

HSPGs.- Glipicanos

HUVEC.- Células endoteliales obtenidas de venas de cordón umbilical

ICAM-1.- Molécula de adhesión intercelular

Icmt.- Isoprenilcisteina carboxil metiltransferasa

IFN.- Interferón

Ifs.- Filamentos intermedios

IL.- Interleuquina

INSIG.- Gen inducido por insulina

IP3.- Inositol trifosfato

KS.- Keratán sulfatos

LBD.- Dominio de unión al ligando

LDL.- Lipoproteínas de baja densidad

LDLR.- Receptor de LDL

LDV.- Sitio -Leu-Asp-Val-

Lp**(a)**.- Lipoproteína(a)

LPA.- Ácido lisofosfatídico

LRP-1.- Proteína relacionada con lipoproteínas de baja densidad

LT.- Leucotrieno

LXR.- Receptor hepático X.

MAPK.- Proteinquinasas activadas por mitógenos.

MBS.- Subunidad de unión a miosína de la miosina fosfatasa

MCP-1.- Proteína quimiostática de monocitos-1

M-**C**SF.- Factor estimulador de colonias de macrófagos

MEKK-1.- Quinasa activada por mitógenos/ERKquinasa.

MLC.- Cadena ligera de la miosina

MMPs.- Metaloproteinasas

NADPH.- Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato.

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

NO.- Óxido nítrico

NOS.- Óxido nítrico sintasa

OMS.- Organización mundial de la salud

PAF.- Factor activador de plaquetas

PAI.-Inhibidor del activador del plasminógeno

Palm-CoA.- Palmitoil CoA

PBS.- Tampón salino fosfato

PCR.- Reacción en cadena de la polimerasa

PDGF.- Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDK.- Proteína quinasa dependiente de fosfatidil-inositol

PF4.- factor-4 de plaquetas

PG.- Prostaglandinas

PGI₂.- Prostaciclina

PGs.- Proteoglicanos

PH.- Plecstrina

PHSRN.- Sitio -Pro-His-Ser-Arg-Asn-

PI.- fosfatidil inositol

PI3K.- Fosfatidil inositol 3 quinasa.

PIP₂.- fosfatidil inositol-4,5- difosfato

PKC.- Proteina Quinasa C.

PMA.- forbol 12-miristato, 13-acetato

PPARs.- receptores activados proliferadores de peroxisomas

PUFA.- Ácidos grasos poli-insaturados

PVDF.- Polifluoruro de vinilo.

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

RANTES.- Regulador Expresado y Secretado de la activación de linfocitos T

RASI-1.- proteasas de sinovio inflamado de artritis reumatoide 1

RBD.- Dominio de unión a Rho

Rce1.- Enzima convertidora de Ras

REDV.- Sitio -Arg-Glu-Asp-Val-

RGD.- Sitio de unión Arg-Gly-Asp

Rho.- Proteínas G pequeñas

RHOCK.- Quinasas de Rho A/rho

RIP.- Proteína de interacción con receptores

ROS.- Especies reactivas del oxígeno

RT.- Retrotranscriptasa

RXR.- Receptor retinoico X

S1P.- Esfingosina-1-fosfato

SAM.- S-adenosilmetionina

SCAP.- Proteína activadora por corte de SREBP

SDS.- Dodecil Sulfato Sódico

SSD.- Sterol-sensing domain

SEM.- Error estandar de la media

SMC.- Células del músculo liso

SMC-C.- Células del músculo liso procedentes de animales con dieta control

SMC-Ch.- Células del músculo liso procedentes de animales con dieta enriquecida con colesterol

SNC.- Sistema nerviosos central

SP.- Sitio de corte de proteasas

SREBP.- Proteína de unión a elementos de respuesta a esteroles

SRF.- Factor de respuesta al suero

SSD.- dominio sensible a esteroles

TF.- Factor tisular

TGF- β .- Factor de crecimiento transformante

TIMP.- Inhibidores de metaloproteasas específicas de tejido.

TNF.- Factor de necrosis tumoral

TRAP.- proteínas activadoras de receptores tiroideos

TSP.- Trombospodinas

TX.- Tromboxano

TXA.- Tromboxano A2

VCAM-1.- Molécula de adhesión vascular

VEGF.- Factor de crecimiento del endotelio vascular

VEGFR2.- Recetor de VEGF 2

VLDL.- Lipoproteínas de muy baja densidad

WD.- Motivo asp-tryp

ÍNDICE

ANTECEDENTES	1
A.1.- Aterosclerosis	3
A.1.1.- Fisiopatología de la enfermedad	4
A.1.1.1.- Lesión inicial: disfunción endotelial	5
A.1.1.2.- Formación de la estría grasa	7
A.1.1.3.- Progresión de la placa aterosclerótica	9
A.1.1.4.- Lesión avanzada y trombosis	12
A.2.- Papel de las LDL en la aterosclerosis	13
A.2.1. Activación de las SMC por LDL	15
A.2.2.- Activación de las células endoteliales por LDL	16
A.3.- Modelos animales para el estudio de la aterosclerosis.....	16
A.3.1.- Modelos de conejo.....	17
A.3.2.- Modelos en ratón.....	18
A.3.3.- Modelos aviares	19
A.3.4.- Otros modelos animales.....	20
A.4.- Modelos celulares para el estudio de la aterosclerosis.....	20
A.4.1.- Cultivos de células endoteliales	21
A.4.2.- Cultivo de células de SMC	22
A.4.3.- Cultivos de macrófagos	24
A.4.4.- Co-cultivos.....	26

A.5.- Estructura y función de la ECM en los vasos sanguíneos y su relación con la aterosclerosis.	27
A.5.1.- Colágenos	28
A.5.1.1- Clasificación de los colágenos	30
A.5.1.1.1- Colágenos fibrilares	30
A.5.1.1.1.1.-Colágenos que forman redes o mallas: tipos IV, VIII, X y la cadena α del colágeno tipo IV.	30
A.5.1.1.1.2.-Colágenos asociados a fibras con interrupción de la triple hélice (FACIT): tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI y XXII.	31
A.5.1.1.1.3.-Filamentos con glóbulos y constituyentes de las fibras de anclaje: tipos VI, VII, XXVI y XXVIII.	31
A.5.1.1.1.4.-Colágenos con dominios transmembrana: tipos XII, XVII, XXIII y XXV	32
A.5.1.1.2.- Otros colágenos no fibrilares: tipos XV y XVIII	32
A.5.1. 2.- Síntesis de Colágeno	34
A.5.1. 3.- Papel del colágeno en los vasos sanguíneos y en la aterosclerosis	38
A.5.2.- Elastina y proteínas microfibrilares.....	40
A.5.2.1.- Elastinas	40
A.5.2.2.- Fibrilina	41
A.5.2.3.- Papel de la elastina en los vasos sanguíneos y en la aterosclerosis	41
A.5.3.- Glicoproteínas de adhesión.....	43
A.5.3.1.- Fibronectina	43
A.5.3.1.1.-Estructura	44
A.5.3.1.2.-Dominio de unión a células	47
A.5.3.2.-Laminina.....	48

A.5.3.2.1.-Papel de las lamininas en los vasos sanguíneos y en la aterosclerosis	50
A.5.4.-Proteínas matricelulares	51
A.5.4.1.-Trombospodina.....	51
A.5.4.2.-Tenascina	52
A.5.4.3.- Papel de las proteínas matricelulares en los vasos sanguíneos y en la aterosclerosis.....	52
A.5.5.-Proteoglicanos.....	53
A.5.5.1.- Papel de los proteoglicanos en los vasos sanguíneos y en la aterosclerosis	57
A.6.-Remodelación de la ECM.....	62
A.6.1-Metaloproteasas (MMPs)	63
A.6.1.1.-Papel de las MMPs en la aterosclerosis.....	69
A.7.- Rutas de señalización implicadas en la aterosclerosis	71
A.7.1.-Vía del mevalonato y proteínas G de membrana	71
A.7.1.1.-Ruta biosintética del mevalonato	71
A.7.1.2.-Proteínas Isopreniladas: GTPasas pequeñas (Ras, Rho).	72
A.7.1.2.1-Regulación de la activación de proteínas G.....	73
A.7.1.2.2.-Modificaciones lipídicas y localización subcelular.....	74
A.7.1.2.3.- Subfamilia Ras.....	77
A.7.1.2.3.1.-Vías de señalización de Ras	78
A.6.1.2.3.1.1-Cascada MAPKs (mitogen activator protein kinases)	79
A.6.1.2.3.1.2-Cascada de PI3K	80
A.7.1.2.3.2.-Papel de estas rutas de señalización en las células vasculares....	82
A.7.1.2.4.-Subfamilia Rho.....	83

A.7.1.2.4.1.- Rho A	83
A.7.1.2.4.1.1.- Rho A y células musculares lisas	84
A.7.1.2.4.1.2.- Rho A y RHOCK	85
A.7.2.- PPAR	88
A.7.2.1.- PPAR γ	91
A.7.3.- SERBP	93
A.7.4.- Receptor hepático X	97
A.8.- Estrategias terapéuticas destinadas al tratamiento de la aterosclerosis	102
A.8.1.- Inhibidores de la HMG-coA reductasa, estatinas	102
A.8.2.- Tetraciclinas	107
A.8.3.- Acidos grasos poli-insaturados (AGPI)	109
Objetivos	117
Material y Métodos	104
B.1.- Animales y dietas	105
B.2.- Cultivos celulares	106
B.2.1.- Obtención de cultivos primarios de células de músculo liso de aorta.	106
B.2.2.- Línea celular de A10 de rata.	107
B.2.3.- Mantenimiento de los cultivos de células de músculo liso	108
B.3.- Tratamientos <i>in vitro</i>	109
B.4.- Cuantificación de la síntesis de colágeno: Incorporación de [H ³]-prolina	112
B.5.- Inmunofluorescencia indirecta	112
B.6.- Extracción y cuantificación de RNA	113
B.6.1.- Electroforesis de RNA	114

B.7.- Síntesis de cDNA	114
B.8.- Cuantificación del cDNA: PCR a tiempo-real	115
B.9.- Determinación de la actividad del promotor de <i>col1a2</i>	118
B.9.1.- Plásmidos recombinantes	118
B.9.2.- Tansfección y medida de la inducción del promotor mediante actividad luciferasa.....	119
B.10.- Incorporación de [H^3]-mevalonato	120
B.11.- Determinación del estado de activación de Rho A.....	120
B.12.- Obtención de mutantes dominantes negativos y positivos de Rho A y H-Ras.	123
B.13.- Cuantificación de proteínas	124
B.14.- Análisis estadístico de los resultados.....	124
Resultados	126
C.1.- Efecto del colesterol en la producción de proteínas de la matriz extracelular.	127
C.1.1.- Efecto del colesterol sobre la síntesis de colágeno (incorporación de [H^3]-prolina).....	127
C.1.2.- Efecto del colesterol sobre la expresión de los genes que codifican los colágenos tipo I, II y III	128
C.1.3.- Efecto del colesterol sobre la expresión de los genes que codifican la fibronectina y la MMP2	130
C.1.4.- Inmunofluorescencia indirecta de colágeno tipo I, III y fibronectina en cultivos primarios de SMC-C y SMC-Ch.....	131
C.1.5.- Inmunofluorescencia indirecta de colágeno tipo I, III y fibronectina en cultivos primarios de SMC-C y SMC-C tratadas con colesterol soluble.	133
C.2.- Papel de la ruta del mevalonato en la producción y remodelación de la ECM en cultivos de SMC: efecto de las estatinas.....	135
C.2.1.- Síntesis de colágeno (incorporación de [H^3]-prolina).....	136

C.2.2.- Expresión de genes que codifican los colágenos tipo I, II y III.....	138
C.2.2.1.- Gen col1a2 (colágeno, tipo I, alpha2)	138
C.2.2.2.-Gen col2a1 (Colágeno, tipo II, alpha1).....	140
C.2.2.3.- Gen col3a1 (Colágeno, tipo III, alpha1).....	141
C.2. 3.- Efecto de las estatinas a nivel del promotor de <i>col1a2</i>	142
C.2. 4.- Expresión de los genes que codifican para la fibronectina y la MMP2.	145
C.2. 4.1.- Gen fibronectina	145
C.2. 4.2.- Gen mmp2.....	147
C.2. 5.- Isoprenilación de proteínas (incorporación de [H ³]-mevalonato a proteínas totales).....	149
C.2. 6.- Activación de Rho-A.....	152
C.2. 7.- Expresión de genes que codifican para PPAR- γ , LXR y SREBP	153
C.2. 7.1.- Gen ppar- γ	153
C.2. 7.2.- Gen lxr	155
C.2. 7.3.- Gen srebp-1	157
C.3.- Papel de las GTPasas Rho A y H-Ras en la síntesis de proteínas de la ECM	158
C.3.1.- Incorporación de [H ³]-prolina colágenos en mutantes dominantes negativos y positivos de Rho A y H-Ras.	158
C.3.2.- Inmunofluorescencia indirecta de los colágenos tipos I y III en mutantes dominantes positivos y negativos de Rho A.	160
C.3.2.1.- Colágeno tipo I	160
C.3.2.2.- Colágeno tipo III	163
C.3.3.- Efecto del estado de activación de Rho A y Ras-H a nivel del promotor de <i>col1a2</i>	166

C.3.4.- Inmunofluorescencia indirecta de fibronectina en mutantes dominantes positivos y negativos de Rho A.	167
C.4.- Efecto de la doxicilina sobre la síntesis de ECM y las vías de activación derivadas de la ruta del mevalonato en cultivos de SMC.	170
C.4.1.- Efecto de la doxiciclina en la síntesis de colágeno.	170
C.4.2.- Efecto de la doxiciclina sobre la expresión de genes que codifican los colágenos tipo I, II y III, fibronectina y MMP2	172
C.4.3.- Efecto de la doxicilina sobre la isoprenilación de proteínas.	174
C.4.4.- Efecto de la doxicilina sobre el estado de activación de Rho-A.	175
C.4.5.- Efecto de la doxiciclina en la expresión de genes que codifican para PPAR- γ , LXR y SREBP.....	177
C.5.- Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) sobre la síntesis de ECM y las vías de activación derivadas de la ruta del mevalonato en las SMC.....	178
C.5.1.- Efecto de los PUFA sobre la síntesis de colágeno	178
C.5.2.- Efecto de los PUFA en la expresión de genes que codifican proteínas de la ECM	180
C.5.2.1.- Gen col1a2	180
C.5.2.2.- Gen col2a1	182
C.5.2.3.- Gen col3a1	183
C.5.2.4.- Gen fibronectina	185
C.5.2.5.- Gen mmp2.....	186
C.5.3.- Efecto de los PUFAs sobre la isoprenilación de proteínas	188
C.5.4.- Efecto de los PUFAs sobre la activación de Rho-A	190
C.5.5.- Efecto de los PUFAs sobre la expresión de genes que codifican para PPAR- γ , LXR y SREBP.....	191
C.5.5.1.- Gen ppar- γ	191

C.5.5.2.- Gen lxr	192
C.5.5.3.- Gen srebp-1	194
Discusión.....	195
D.1.- Papel del colesterol en la matriz extracelular	196
D.2.- Efecto de las estatinas y el estado de activación de Rho A y H-Ras sobre la ECM.	199
D.3.- Efecto de la doxiciclina sobre la ECM	204
D.4.- Efecto de los PUFA sobre la ECM	205
Conclusiones.....	209
Bibliografía.....	210
Anexo: Publicaciones	255

ANTECEDENTES

A.1.- Aterosclerosis

Los hábitos propios del estilo de vida de los países desarrollados como el tabaquismo, el estrés, la inactividad física y dietas ricas en grasas insaturadas y azúcares favorecen el desarrollo de enfermedades cardiovasculares como la aterosclerosis.

Las últimas estadísticas publicadas por la Organización Mundial de la Salud (OMS) calculan que cada año mueren 16,7 millones de personas a causa de enfermedades cardiovasculares, lo que supone un tercio de mortalidad mundial anual¹. La OMS predice 11,1 millones de muertes por enfermedades cardiovasculares en el año 2020. Estas predicciones señalan que la mortalidad en los países desarrollados se incrementara en un 120% en mujeres y en un 137% en hombres. Además, en las próximas dos décadas se incrementarían por tres la mortalidad debida a estas enfermedades en las zonas menos desarrolladas².

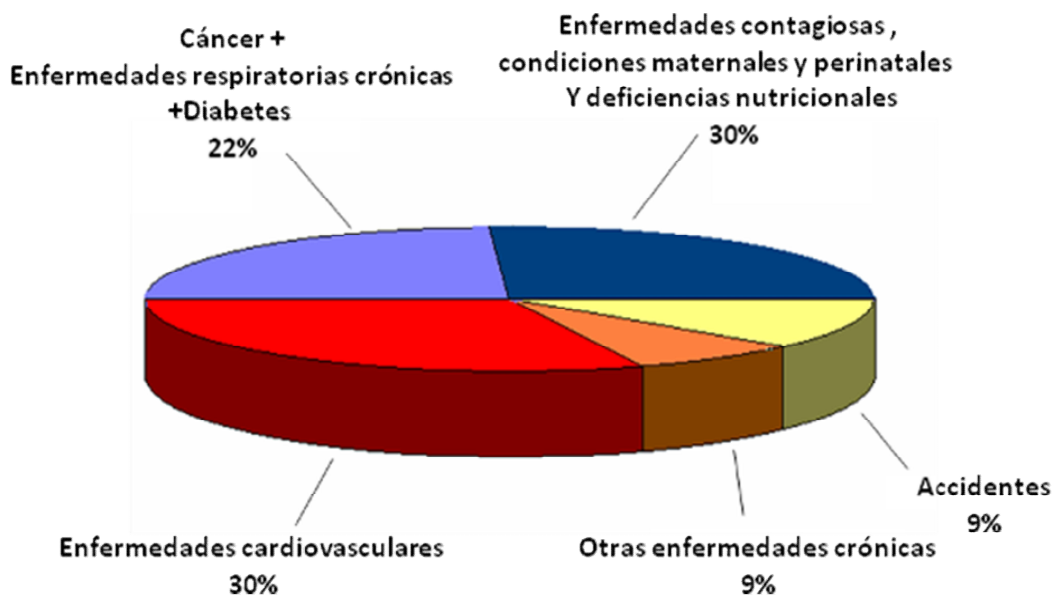


Figura A.1. Distribución de las muertes en el mundo según la OMS

Dentro de estas patologías, la principal casusa subyacente de los síntomas clínicos es la aterosclerosis. Esta enfermedad se caracteriza por el engrosamiento y el endurecimiento de las paredes arteriales debido a la acumulación de material lipídico en el espacio subendotelial, tejido fibroso, depósitos de calcio y otros productos sanguíneos. Esto da lugar a una reducción del lumen arterial que puede llegar a disminuir el flujo sanguíneo e incluso ocasionar episodios isquémicos en las zonas distales al engrosamiento. Dichos episodios isquémicos tienen repercusiones clínicas tan importantes como el infarto cerebral, infarto de miocardio y gangrena de las extremidades inferiores.

A.1.1.- Fisiopatología de la enfermedad

Las lesiones ateroscleróticas se forman mayoritariamente en arterias grandes y medianas (aorta, carótidas e ilíacas). La estructura de las arterias consta de tres capas concéntricas bien diferenciadas morfológicamente que desde el lumen hacia el exterior son: la íntima, la media y la adventicia. Estas dos últimas están separadas por una malla compacta de elastina, la lámina elástica externa. La adventicia está formada por tejido conectivo y fibroblastos. En ella nos encontramos vasos de pequeño calibre que en ocasiones penetran en la media con la función de aportar nutrientes y oxígeno a las capas más internas de la pared arterial ³. La media es la capa de mayor grosor, está formada por células musculares lisas (*smooth muscle cells*: SMC) cuya principal función es mantener el tono muscular de la pared arterial y por ello tienen un citoesqueleto rico en actina y miosina. La media está separada de la íntima por otra malla de elastina, la lámina elástica interna. En la íntima el subendotelio, constituido principalmente por una matriz de proteoglicanos y colágeno, da soporte al endotelio que es una monocapa de células planas endoteliales (fig. A.2).

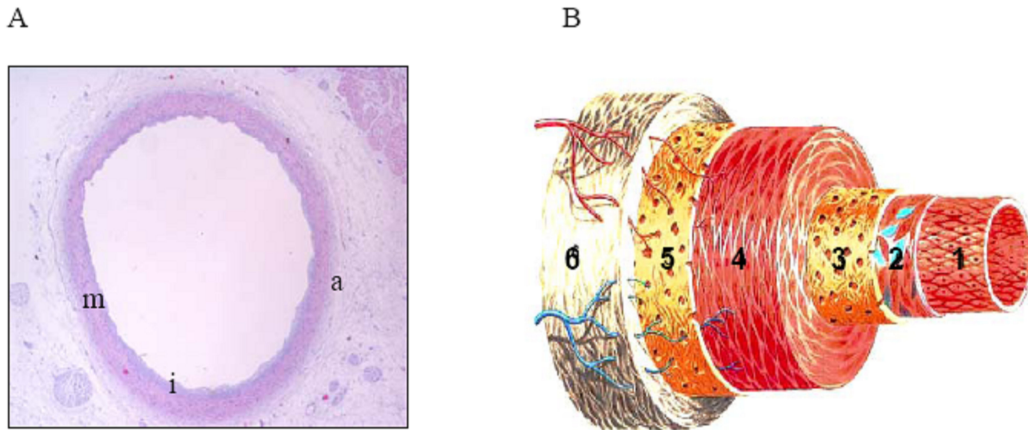


Figura A.2. A) Corte transversal de una arteria (i=íntima; m=media; a=adventicia). B) Esquema de una sección transversal de una arteria elástica: 1- Células endoteliales, 2- Subendotelio, 3- Lámina elástica interna, 4-Células musculares lisas, 5- Lámina elástica externa, 6- Adventicia. Adaptado de Ross R (1999)⁴.

A.1.1.1.- Lesión inicial: disfunción endotelial

El endotelio vascular desarrolla un gran número de funciones en el mantenimiento de la homeostasis vascular ⁵. Proporciona una superficie no trombogénica y no adherente para leucocitos, a través de la cual se realiza el intercambio de numerosas sustancias entre la sangre y los tejidos. Este endotelio contribuye al mantenimiento del tono vascular mediante el balance de producción y liberación de sustancias vasodilatadoras, como el óxido nítrico (NO) y la prostaciclina (PGI₂), y vasoconstrictoras, como la endotelina, el tromboxano A₂ (TXA₂) y la angiotensina II (AII). Además, puede modular el tono y el crecimiento de las SMC, así como la coagulación, la fibrinólisis y la adhesión de células sanguíneas a la pared vascular^{6 7; 8}, mediante diversos factores promotores e inhibidores del crecimiento, moduladores de la inflamación (moléculas de adhesión) y factores hemostáticos y trombolíticos. En condiciones normales existe un equilibrio entre las acciones de estos

factores, pero en presencia de factores de riesgo cardiovascular (como hiperlipidemia, tabaquismo, hipertensión arterial, diabetes, infecciones y otros) este equilibrio se altera provocando respuestas anormales del endotelio (figura A.3).

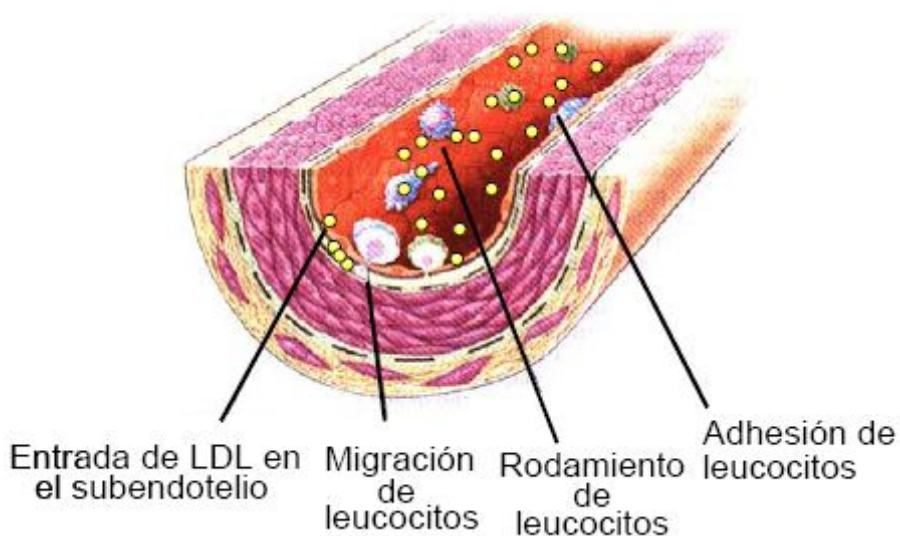


Figura A.3. Inicio de la lesión aterosclerótica: Niveles elevados de LDL circulantes producen que éstas se acumulen en el subendotelio donde desencadenan una respuesta inflamatoria que hace que el endotelio favorezca la adhesión y migración de monocitos y linfocitos T al subendotelio. Adaptado de Ross R (1999)⁴.

A partir del momento en que el endotelio presenta alteraciones de su funcionalidad, se produce la entrada de monocitos, lípidos plasmáticos y proteínas dentro de la pared arterial, así como la activación de fenómenos inflamatorios que dan lugar a la formación de la estría grasa, primer paso de la formación de la placa aterosclerótica ^{6,9}.

A.1.1.2.- Formación de la estría grasa

El inicio de la enfermedad se localiza fundamentalmente donde hay cambios en la velocidad y turbulencia de la sangre circulante, demostrando la importancia de las condiciones hemodinámicas en el desarrollo de las lesiones. En las curvaturas y las bifurcaciones de los vasos es dónde estas turbulencias mecánicas, junto con la acción biológica de los factores de riesgo, provocan la disfunción endotelial y aumentan la permeabilidad de las células endoteliales (CE) al paso de lípidos y células plasmáticas. Como consecuencia, las partículas LDL que circulan en la sangre pasan a través del endotelio y son retenidas por los proteoglicanos (PGs), debido a la interacción electrostática de la carga negativa de los PGs y la positiva de la apolipoproteína B (Apo B) ^{10, 11}. Las LDL acumuladas en el espacio subendotelial se modifican por procesos de oxidación, lipólisis y/o agregación, favorecidos por la presencia de radicales libres y las características de los PGs de la íntima arterial. Estas LDLox son altamente inflamatorias y citotóxicas e inducen la respuesta inflamatoria con la atracción de monocitos y linfocitos-T hacia la lesión ¹². Al mismo tiempo, como mecanismo de defensa, el endotelio expresa proteínas de adhesión (E-selectina, L-selectina y P-selectina) y quimiotácticas (MCP-1) que se unen a los ligandos de la superficie de los leucocitos y monocitos, facilitando su atracción y adhesión a la superficie endotelial. Las LDLox y factores proinflamatorios (INF- γ , TNF- α) liberados por linfocitos-T, activan la transcripción de los genes responsables de la síntesis de factores quimiotácticos mediante la inducción NF κ B.

El factor NF κ B también aumenta la síntesis y liberación de citoquinas (IL-1, IL-2 e IL-6), que activan las células inflamatorias perpetuando de esta manera el proceso de acumulación celular en el espacio subendotelial. Los monocitos acumulados en la íntima de la pared fagocitan las LDLox acumuladas en la pared arterial y, al incrementar su contenido lipídico, se transforman en macrófagos espumosos ⁴. Al

contrario que otros receptores de LDL, los receptores *scavenger* (basureros) no se regulan por las concentraciones de colesterol intracelular y permiten al macrófago fagocitar grandes cantidades de las LDLox que se acumulan en la pared arterial, transformándose así en células espumosas. La perpetuación de este proceso deriva en acúmulos focales de células espumosas que se observan en la superficie de la íntima, incluso en la infancia, y se denominan estrías grasas ¹³(figura A.4).

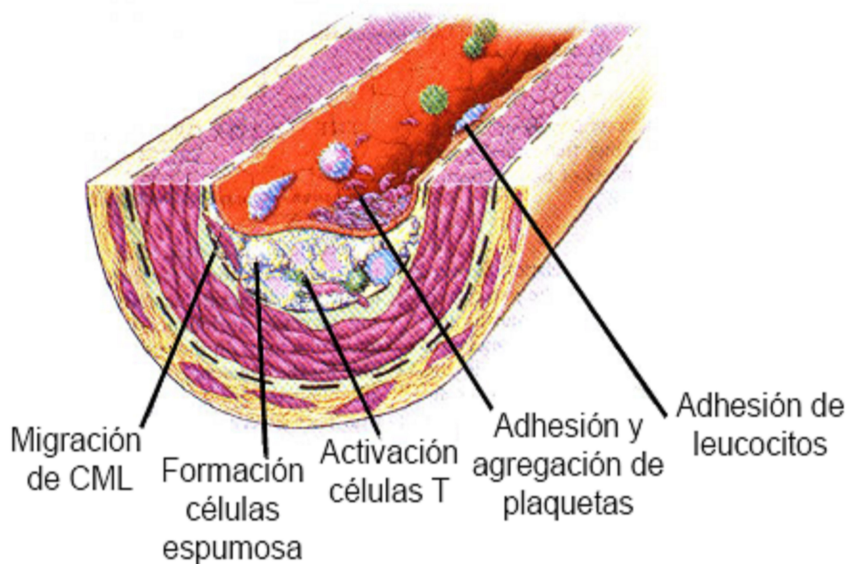


Figura A.4. Formación de estría grasa: Las citoquinas y factores quimiotácticos liberados por el endotelio activan a los linfocitos T y hacen que los macrófagos expresen receptores scavenger a través de los cuales captan LDL modificadas lo que hace que se transformen en células espumosas. Estas células espumosas sintetizan citoquinas y ROS, lo que aumenta la oxidación de las LDL y facilita su captación por los macrófagos, además estimulan la migración de las smc desde la media a la íntima. Adaptado de Ross R (1999)⁴.

A.1.1.3.- Progresión de la placa aterosclerótica

La estría grasa puede progresar hasta la formación de la placa, aunque no todas las estrías grasas progresan ¹⁴. Hay dos factores clave en la progresión de la lesión: la proliferación y migración de SMC; y la acumulación lipídica en macrófagos y SMC. Los macrófagos y linfocitos T activados aumentan su capacidad de oxidación de lipoproteínas y la secreción de factores de crecimiento y citoquinas inflamatorias (MCP-1, M-CSF, IL-1, TNF, IFN- γ) ¹⁵. Estas citoquinas estimulan la expresión en las CE y SMC de factores de crecimiento (FGF, PDGF) y de más citoquinas, originándose un círculo vicioso que perpetúa los procesos aterogénicos descritos anteriormente. Las células espumosas saturadas de lípidos acaban rompiéndose, liberando al intersticio su contenido en LDLox, radicales libres y otros materiales altamente tóxicos para el endotelio. Las LDLox y principalmente el PDGF ^{9, 16}, activan las SMC de la capa media que secretan IL-1, TNF- α y TGF- β , estimulando así la síntesis de PDGF y EGF ¹⁷. El PDGF y otros agentes como la trombina y la AII promueven la proliferación de las SMC, previa a su migración a través de la lámina elástica interna. Además, el PDGF y citocinas liberadas por los macrófagos activados inducen la expresión de proteasas (plasmina y metaloproteasas) en macrófagos y SMC, que degradan la matriz extracelular, facilitando a su vez la migración de las estas últimas. Este paso produce el cambio de fenotipo de estas células, de forma que dejan de ejercer una función principal en la contractibilidad celular y el mantenimiento del tono vascular, para adquirir fenotipo sintético. El cambio fenotípico que experimentan las SMC implica ^{18, 19} (figura A.5):

- Cambios en el estado proliferativo.
- Incremento en la producción de matriz extracelular (ECM).
- Producción de proteasas, especialmente metaloproteinasas (MMPs).

- Síntesis de moléculas proinflamatorias (citoquinas y marcadores de inflamación).
- Disminución en la expresión de proteínas contráctiles.

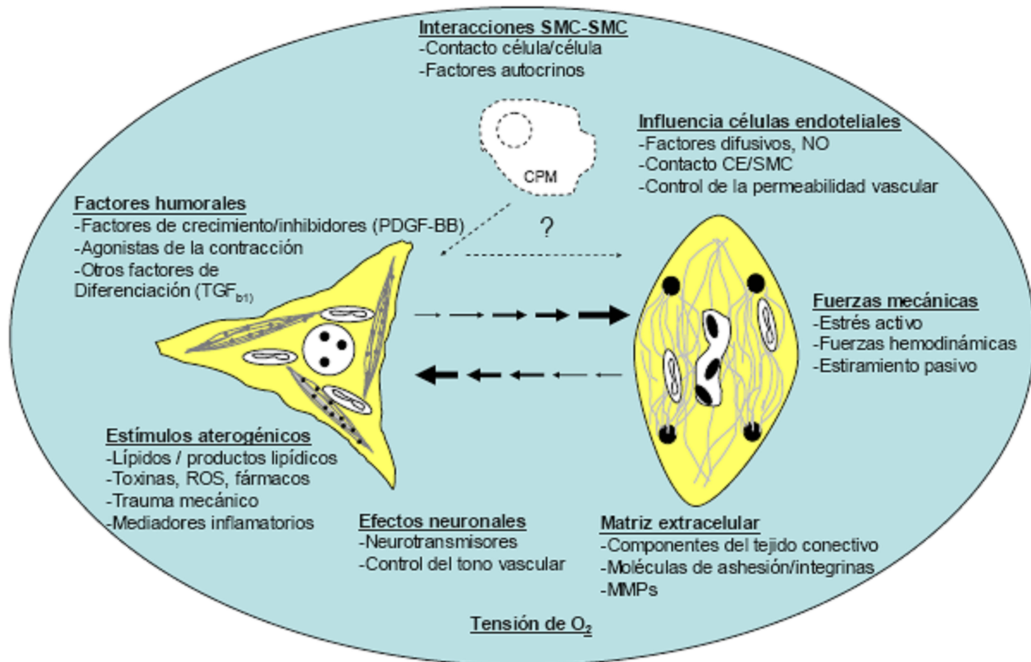


Figura A.5. Esquema del estado de diferenciación dependiente de factores locales.

Esta nueva funcionalidad permite un mayor engrosamiento de la íntima, reduciéndose de este modo el lumen arterial. Además, la producción de factores de crecimiento (PDGF, IGF-I,...) y citoquinas (TGF_{β} , IL-1) regulan la propia actividad de estas células. Así mismo, las SMC, igual que los macrófagos, pueden captar y acumular intracelularmente LDL modificadas a través de receptores proteicos como LRP-1, transformándose así en células espumosas ^{20, 21}. La migración de las SMC hacia la íntima y la producción de fibras de colágeno producen la formación de una cubierta fibrosa protectora del núcleo lipídico. Esta cubierta fibrosa es uno de los componentes

cruciales en la evolución de la placa aterosclerótica, ya que separa el núcleo lipídico altamente trombogénico de las plaquetas circulantes y otros factores de la coagulación. Las placas ateroscleróticas estables se caracterizan por un core lipídico necrótico y recubierto por una gruesa capa fibrosa rica en SMC ⁴.

Los macrófagos juegan el papel central en el proceso ya que están presentes desde el inicio de la lesión. Como ya se ha mencionado anteriormente, bajo la acción de MCP-1, M-CSF y otras citoquinas, los macrófagos son activados y se incrementa su capacidad de oxidación de lipoproteínas así como la secreción de factores de crecimiento, y diversas citoquinas inflamatorias ²²; entre ellas destacan nuevamente MCP-1, M-CSF, IL-1 y TNF, y también el IFN- γ ¹⁵. Estas citoquinas siguen estimulando la expresión de moléculas de adhesión y citoquinas por parte de las células endoteliales y las SMC, favoreciéndose así un círculo vicioso de captación, proliferación y activación de monocitos-macrófagos, expresión de receptores basureros, captación de LDL modificadas y transformación en células espumosas, lo que se traduce en una acumulación incontrolada de lípidos en el espacio subendotelial.

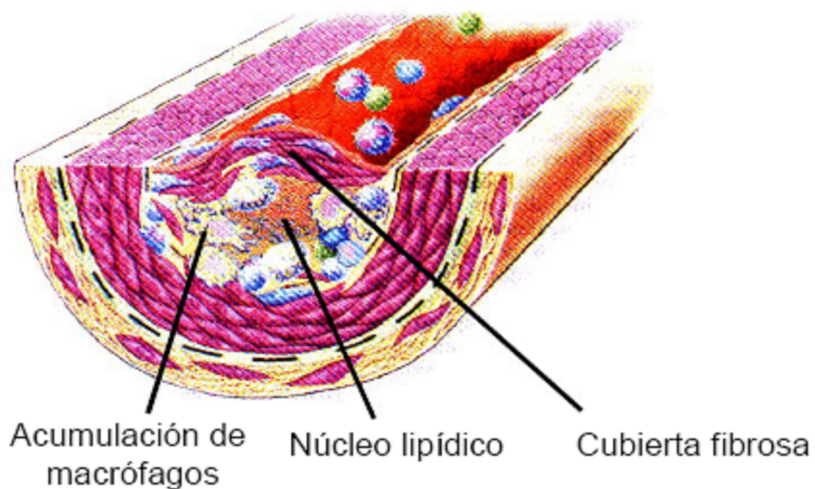


Fig A.6. Ruptura de la placa fibrosa. La formación de un trombo se produce por la pérdida de la cubierta fibrosa, sobretodo en los lugares donde hay menos ECM, y la consiguiente exposición a la circulación de sustancias protrombóticas. También las pequeñas hemorragias que se producen en los vasos formados por angiogénesis en la placa son causa de formación de trombos. Adaptado de Ross R (1999)⁴.

A.1.1.4.- Lesión avanzada y trombosis

En los estadios finales de la enfermedad, la placa aterósclerótica puede romperse o ulcerarse y provocar la formación de un trombo, que puede causar un coronario agudo ²³. Las placas con una cubierta fibrosa delgada y un elevado número de células inflamatorias son más propensas a romperse. El mantenimiento de la cubierta fibrosa depende del equilibrio entre la formación y la destrucción de matriz extracelular. En este proceso juegan un papel importante las células inflamatorias. Así por ejemplo, los linfocitos T producen IFN- γ que inhibe la síntesis de matriz extracelular, y los macrófagos sintetizan proteasas (colagenasas, gelatinasas, catepsinas, etc.) que degradan la matriz extracelular.

Las placas ateroscleróticas presentan una estructura excéntrica y su ruptura se produce en el lugar denominado "hombro" (*shoulder*) de la placa ²⁴. Esta zona es rica en macrófagos y pobre en SMC y matriz extracelular. El trombo que se forma al romperse la cubierta fibrosa se debe a que se expone a la circulación sanguínea numerosos elementos protrombóticos presentes en el núcleo lipídico (figura A.7)^{25, 26}.

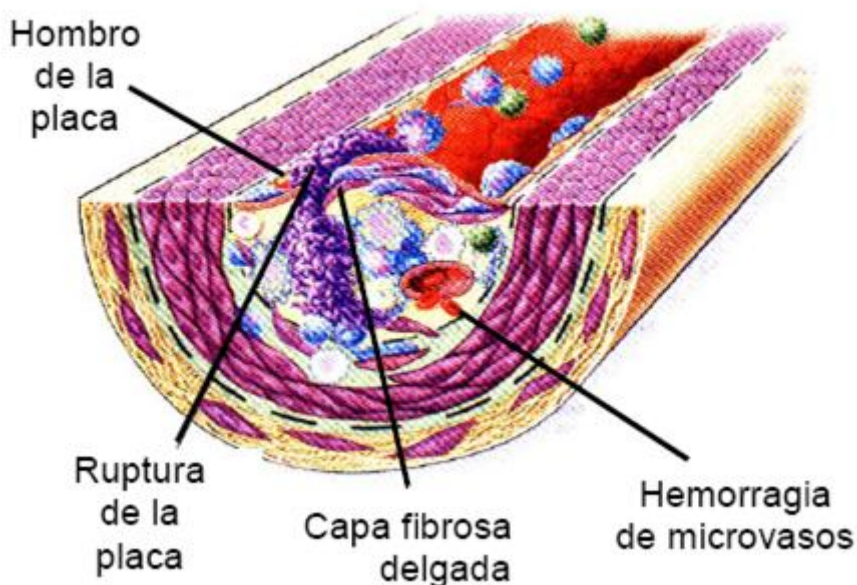


Figura A.7. Ruptura de la placa fibrosa. La formación de un trombo se produce por la pérdida de la cubierta fibrosa, sobretodo en los lugares donde hay menos ECM y la consiguiente exposición a la circulación de sustancias protrombóticas. También las pequeñas hemorragias que se producen en los vasos formados por angiogénesis en la placa son causa de formación de trombos. Adaptado de Ross R (1999)⁴.

A.2.- Papel de las LDL en la aterosclerosis

Las LDL son unas de las principales lipoproteínas involucradas en aterosclerosis. Se forman a partir de las VLDL y están constituidas por una única lipoproteína que es la ApoB-100. Las LDL se encargan del transporte de colesterol a los tejidos periféricos, que es necesario para la formación de la membrana plasmática, hormonas esteroidales y sales biliares en el hígado. Para conseguir colesterol, las células tienen dos posibilidades: síntesis de colesterol o mediante la captación de LDL. Para ello, las células poseen receptores de apo B/E, también denominado receptor de

LDL (LDLR), que son capaces de interactuar con las lipoproteínas e internalizarlas. Los LDLR están dispuestos en depresiones de la membrana celular recubiertos con una proteína denominada clatrina. Cuando la LDL interactúa (a través de la ApoB-100) con el receptor, se forma una vesícula que origina un endosoma que posteriormente se fusiona con lisosomas, cuyas enzimas hidrolíticas degradan la apoB-100 y los ésteres de colesterol. El colesterol libre formado puede ser utilizado para integrarse en las membranas celulares o ser almacenado como ésteres de colesterol por acción del enzima acil-CoA-colesterol acil-transferasa (ACAT). El aumento de colesterol en la membrana inhibe la activación de un factor de transcripción denominado proteína de unión al elemento de respuesta a esteroides 2 (*sterol response element binding protein-2*, SREBP-2). SREBP-2 controla diferentes genes involucrados en la vía de la síntesis de colesterol, como el de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa o el del LDLR, de forma que se regula el contenido del colesterol intracelular ²⁷ (figura A.8).

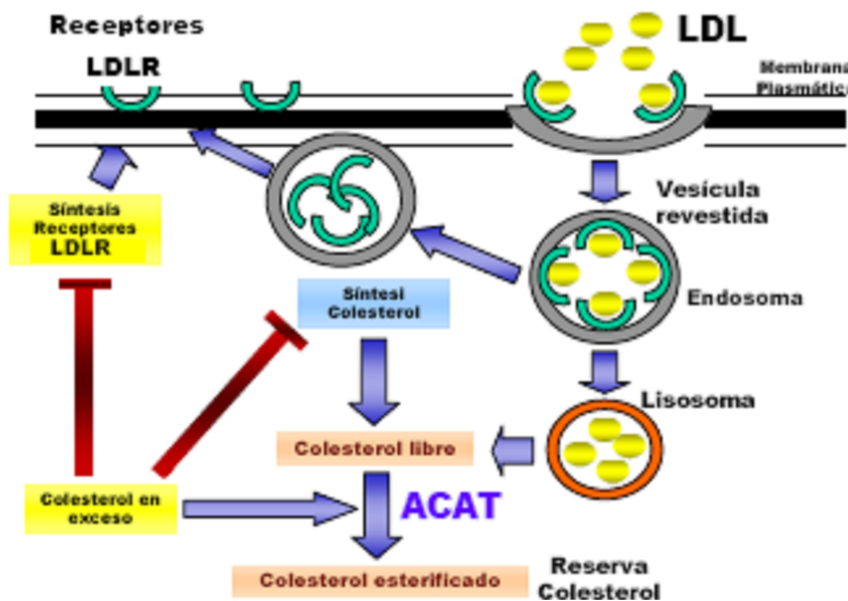


Figura A.8. Metabolismo de las LDL: La interacción de las LDL con los LDLR de las células produce una vesícula que se fusiona con lisosomas. Las lipoproteínas se hidrolizan generando

colesterol libre para su utilización en la membrana o para su almaxenaje como ésteres de colesterol. Los LDLR son reciclados a membrana y se produce la inhibición tanto de su síntesis como la de HMG- CoA reductasa, enzima clave en la síntesis de coelesterol.

Este mecanismo es especialmente activo en el hígado, que es el principal órgano involucrado en la síntesis y la regulación del colesterol plasmático.

A.2.1. Activación de las SMC por LDL.

Uno de los principales factores de riesgo aterosclerótico es la hipercolesterolemia. Una alta concentración de LDL plasmática, favorece su infiltración en la pared vascular, lo que promueve una respuesta inflamatoria. Las LDL nativas *per se* pueden activar las SMC actuando como factores de crecimiento que inducen diferentes vías de transducción de señales ^{28, 29}. Las LDL pueden aumentar la concentración intracelular de calcio ³⁰, estimular el metabolismo de fosfoinositoles y la translocación a la membrana de la PKC ³¹, activar la vía de las MAP quinasas ³² y regular la actividad de factores de transcripción como la proteína activadora-1 (*activator protein-1*, AP-1) ³³. Algunos de estos efectos se producen a través de proteínas G, independientes del receptor clásico de las LDL ³⁴. Las proteínas G normalmente transducen la señal desde receptores con 7 dominios transmembrana denominados receptores acoplados a proteínas G (*G-protein coupled receptors*, GPCR). El mecanismo por el cual las LDL pueden activar estos receptores no está muy claro, aunque podría ser que alguno de sus componentes interactuara con ellos. Esta hipótesis se apoya en la presencia de GPCRs pertenecientes a la familia del gen de diferenciación endotelial (*endotelial differentiation gene*, Edg), los cuales son receptores para la esfingosina-1-fosfato (S1P) (componente de las LDL). La activación de receptores Edg transmite señales intracelulares a través de las proteínas G (Gi y Gq)

y las proteínas G pequeñas (Rho), que activan la proliferación y la migración de las SMC ^{35, 36}. Además, existen receptores GPCRs para el ácido lisofosfatídico (LPA) (presente en LDLox)³⁷ que transmiten señales de proliferación en SMC a través de las proteínas G pequeñas Cd42 y Rac ³⁸.

A.2.2.- Activación de las células endoteliales por LDL

Las LDL inducen efectos mitogénicos sobre las CE como la expresión del gen de respuesta al crecimiento temprano (early growth response gene-1 ,Erg-1) ³⁹, o la activación de factores de transcripción como AP-1 ³³ y de vías como la p38 MAPK ⁴⁰. Las LDL también activan la respuesta proaterogénica de las CE aumentando la producción de inhibidor del activador del plasminógeno 1 (*plasminogen activator inhibitor-1*, PAI-1) ⁴¹ e inhibiendo la óxido nítrico sintasa endotelial (*endothelial nitric oxide synthase*, eNOS) que regula la producción de NO ⁴², o la lisil oxidasa que contribuye a estabilizar las lesiones ⁴³.

Recientemente se ha descrito que las LDL producen un aumento de la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y de su receptor VEGFR-2. Un aumento de VEGF/VEGFR-2 puede contribuir al desarrollo de la placa aterosclerótica, produciendo un incremento de la permeabilidad e induciendo angiogénesis en lesiones avanzadas ⁴⁴.

A.3.- Modelos animales para el estudio de la aterosclerosis

Para el estudio de la aterosclerosis es fundamental la búsqueda de modelos experimentales animales que asemejen en el desarrollo de la arteriosclerosis a la especie humana⁴⁵.

A.3.1.- Modelos de conejo

El uso de estos modelos para el estudio de la aterosclerosis se conoce desde principios del siglo pasado. La primera cita del uso de animales con este fin es de 1908, en la que Ignatowsky y colaboradores observaron en aortas de conejos alimentados con una dieta rica en proteínas, un engrosamiento de la íntima con formación de grandes células claras ⁴⁶.

En 1912 Anitschkow obtuvo lesiones semejantes con dietas de colesterol puro disuelto en aceite vegetal ⁴⁷. Desde entonces, el modelo de aterosclerosis experimental más utilizado es el conejo. A pesar del hecho de que este animal no desarrolla aterosclerosis espontánea, su uso tan extendido como modelo aterosclerótico se debe a que es muy sensible a la inducción de las lesiones ateromatosas mediante una dieta rica en colesterol. Aunque las lesiones se parecen mucho a la estría lipídica humana, son mucho más ricas en lípidos y macrófagos que las humanas y no desembocan en la formación de placas ateromatosas, que son el hecho clave del desarrollo de la enfermedad en humanos ^{48, 49}. Además, las dietas hipercolesterolémicas empleadas en estos estudios producen una inflamación masiva en el cuerpo del animal y tiene un alto grado de hepatotoxicidad en los conejos, lo que produce la muerte del animal cuando se administran durante un tiempo prolongado. El uso actual de modelos de conejos modificados genéticamente han mejorado estos problemas. Cabe destacar la cepa de conejo New Zealand que expresa apo A-100 humana, los modelos que sobreexpresan la lecitín-colesterol-acil transferasa, la lipasa hepática, la apo B-100 humanas, o bien la cepa de conejos WHHL que expresan la Lp(a) humana, consiguiendo lesiones ateromatosas muy avanzadas y similares a las de los humanos ^{49, 50}.

A.3.2.- Modelos en ratón

Uno de los modelos animales más utilizados en los últimos años son los ratones. Estos animales son muy resistentes al desarrollo de aterosclerosis e incluso podríamos decir que no se puede inducir la enfermedad como tal. La única excepción son los ratones C57BL/6, los cuales desarrollan la enfermedad al alimentarlos con una dieta muy rica en colesterol y ácido cólico. No obstante las lesiones vasculares difieren mucho de las humanas, y son debidas más que a una predisposición genética a una inflamación crónica ⁴⁸. Además, el metabolismo lipídico del ratón difiere mucho del humano. Así por ejemplo, mientras que la mayor parte del colesterol se transporta por las HDL en ratones, en humanos son las LDL las que realizan esta función y las HDL tienen un carácter protector frente a la aterosclerosis. Todo ello ha hecho que el ratón no haya sido usado como modelo durante años. Sin embargo el desarrollo de ratones "knock-out" para el gen apo-E ha permitido cambiar esta circunstancia. La Apo-E es una glicoproteína sintetizada por el hígado y el cerebro, que se encuentra en todas las lipoproteínas y en quilomicrones, y cuya función principal es unirse con una alta afinidad a sus receptores del hígado, permitiendo de este modo su entrada y su metabolismo. Estos ratones presentan una alta concentración de colesterol plasmático, con una distribución muy similar a la humana, un alto contenido en LDL y más bajo en HDL⁵¹. En la actualidad existen otros modelos murinos transgénicos, como los que son nulos para receptor de LDL, el doble "knock-out" para apo-E y ldl-r, los que expresan la variante humana del apo-E, o que tienen defectos en la agregación plaquetaria. Estos modelos tienen la ventaja de su reducido tamaño. No obstante, la distribución de las lesiones en estos animales difiere mucho de las presentes en humanos y además no se produce rotura espontánea de la placa. Estos datos junto al hecho de ser animales modificados, en los que el efecto en otras rutas metabólicas (y

con ello en la respuesta a dietas y fármacos) tiene que ser probada, hacen que los datos obtenidos con estos modelos tengan que tomarse con precaución.

A.3.3.- Modelos aviares

Entre los animales de fácil manejo, pequeño tamaño y bajo coste, nuestro grupo de investigación utiliza el pollo. Este animal, al igual que otras especies aviares, es capaz de desarrollar aterosclerosis aórtica y coronaria de forma espontánea e inducida por una dieta, hecho descrito por primera vez en 1949⁵². Estos animales presentan hipocolesterolemia de forma natural, con concentraciones plasmáticas de 200 a 350 mg/dl, la mayoría como lipoproteínas de alta densidad^{53, 54}. Las alteraciones vasculares observadas en pollos alimentados con dietas aterogénicas afectan principalmente a la aorta torácica, particularmente en su pared ventral, lo que sugiere influencias hemodinámicas en la patogenia⁵⁵. Estas lesiones no muestran diferencias esenciales con las descritas en la arteriosclerosis humana⁵⁶⁻⁵⁹.

Las ventajas del pollo como modelo animal de arterosclerosis son las siguientes⁵⁹⁻⁶²:

- a.- Animal omnívoro.
- b.- De bajo coste y de fácil manejo para la investigación prolongada.
- c.- Capaz de desarrollar aterosclerosis espontánea.
- d.- Capaz de desarrollar aterosclerosis con dietas hipercolesterolémicas con un ligero pero significativo incremento del colesterol plasmático.
- e.- Los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos son similares a los de humanos.
- f.- La composición de las lipoproteínas HDL, LDL y de quilomicrones es similar a la de humanos.

g.- No hay diferencias entre las lesiones desarrolladas en pollos y las de humanos.

h.- Son animales bípedos, lo que afecta a la distribución de las lesiones.

l.- Son hipertensos por naturaleza.

Estas condiciones, junto al menor tiempo necesario para la regresión de las lesiones, hacen que este animal sea adecuado para este tipo de estudios.

A.3.4.- Otros modelos animales

Recientemente, se ha indicado que el conejo de Indias puede ser un modelo adecuado para el estudio de los fenómenos de aterogénesis. En estos animales, como ocurre en el hombre, la mayor parte del colesterol está asociado a las LDL. Además, tienen proteínas de transferencia de ésteres de colesterol y lipoproteína lipasa ⁶³.

Animales de mayor tamaño como el cerdo y el mono desarrollan aterosclerosis muy semejante a la humana, en donde es frecuente el desarrollo de engrosamientos intimales adaptativos, difusos y excéntricos, como consecuencia del estrés mecánico y físico del flujo sanguíneo sobre las paredes arteriales, principalmente en las zonas de bifurcación o salida de ramas secundarias. Sin embargo, su alto coste, su dificultad de manejo y los problemas éticos hacen que no sean utilizados para estudios preliminares ⁶⁴.

A.4.- Modelos celulares para el estudio de la aterosclerosis

Utilizando cultivos de células vasculares de forma independiente o en co-cultivo se pueden evaluar muchas de las alteraciones que ocurren durante el

desarrollo de la placa de ateroma, especialmente de los acontecimientos que ocurren a nivel celular y molecular. Asimismo, una vez inducido el daño celular se puede evaluar la influencia de diferentes agentes farmacológicos o dietéticos.

Los modelos celulares *ex vivo* más utilizados se circunscriben casi exclusivamente a cultivos primarios de CE, SMC y macrófagos y en algunos casos cocultivos de estos, además de líneas celulares establecidas procedentes de estos tipos celulares y que mantienen las características de estos.

A.4.1.- Cultivos de células endoteliales

El cultivo de CE, obtenidas de vasos de cordón umbilical, fue descrito por primera vez en 1973 ⁶⁵. Anteriormente se habían descrito otras aproximaciones similares, pero los cultivos no estaban bien caracterizados ⁶⁶. En estudios posteriores se han aislado y cultivado CE vasculares de distintas especies y tejidos ⁶⁷⁻⁷⁰. Los cultivos primarios de estas células se obtienen por digestión enzimática o bien de forma mecánica raspando la pared de los vasos. Una vez en cultivo, estas células forman monocapas celulares con la clásica forma de "adoquines", que puede cambiar bajo ciertas circunstancias y volverse alargada. En cultivo, estas células se caracterizan por expresar en superficie el enzima convertidor de angiotensina, por introducir LDL y por expresar factor 8 ⁷¹. Otra característica distintiva de las CE vasculares es que en ciertas condiciones de cultivo forman tubos similares a los de los vasos sanguíneos embrionarios o a los que se forman en los procesos angiogénicos.

La composición de la ECM afecta al crecimiento y al fenotipo de estas células ^{69, 72, 73}. En general, las CE se adhieren mejor a superficies recubiertas de componentes de ECM como colágeno, fibronectina y laminina, o matrices más complejas como Matrigel ⁶⁹ o matrices amnionicas ⁷⁴. No obstante, estas células sintetizan su propia matriz en cultivo ⁷² y pueden crecer sin estos sustratos.

El problema fundamental del cultivo de CE es que existen grandes diferencias según el órgano o la especie del que se obtenga. Esto hace que dependiendo del tipo de estudio que se vaya a realizar tengamos que utilizar un cultivo en particular. Aunque estas diferencias existen ⁷⁵, la ausencia de estudios en los que queden bien caracterizadas hacen que la mayoría de los estudios se utilicen CE obtenidas de venas de cordón umbilical (HUVEC).

Además de los cultivos primarios, existen líneas celulares vasculares que mantienen las características de estas células. Entre estas, las más utilizadas son la línea CPAE (ATCC número CCL- 209)⁷⁶ , procedente de arterias pulmonares bobinas, y la línea HUV-EC-C (ATCC número CRL- 1730) de cordón umbilical humano ⁷⁷.

A.4.2.- Cultivo de células de SMC

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 celulares¹⁸.

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 ECM. 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 ECM, son exclusivas del fenotipo sintético. En el desarrollo de la aterosclerosis participan numerosos tipos celulares entre los que se encuentran macrófagos, células del endotelio vascular, linfocitos, SMC, así como las plaquetas ¹⁸. 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 ⁷⁸.

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 ⁷⁹⁻⁸¹. 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 ECM, 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 ¹⁸.

La composición de la ECM 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 ¹⁸.

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 ECM 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 ECM⁸².

Existen multitud de líneas celulares de SMC, sin embargo dado que es la más utilizada y la que hemos usado en nuestros experimentos, nos vamos a referir a la línea A10 de aorta de rata (ATCC número CRL-1476)⁸³. La línea A10, que deriva de aortas de embriones de ratas DB1X, posee la mayor parte las características de las células de músculo liso⁸⁴. Estas células se contraen espontáneamente en respuesta a corrientes eléctricas en la fase estacionaria de crecimiento, y exhiben un incremento en la actividad de los enzimas miokinasa y creatina fosfatasa. Además, estas células expresan receptores de AI y un gran número de proteínas contráctiles características de las SMC⁸⁵⁻⁸⁹. Estas células tienen la capacidad de cambiar su fenotipo de un modo similar a lo que ocurre en las SMC en un proceso aterosclerótico, e incluso transformarse en células espumosas por un acúmulo de colesterol intracelular⁹⁰. Además, presentan un metabolismo lipídico y de respuesta a multitud de estímulos aterogénicos muy similar a los cultivos de células primarias humanas⁹¹⁻⁹⁴. Estos hechos, junto a su facilidad de obtención y de cultivo, y la reproductibilidad de los resultados que se obtienen con estos cultivos, hacen que hayan sido uno de los modelos experimentales más utilizados en los últimos años para el estudio de los mecanismos moleculares que producen el cambio fenotípico de las SMC en la aterosclerosis y en la respuesta a fármacos.

A.4.3.- Cultivos de macrófagos

Los estudios con macrófagos se centran en monocitos primarios obtenidos de sangre periférica y líneas celulares establecidas. Los monocitos primarios al ser

estimulados se transforman en macrófagos que pueden ser cultivados por un tiempo largo y mantienen gran parte de las características que presentan *in vivo*⁹⁵.

Existen multitud de líneas celulares de macrófagos que difieren en su estado de diferenciación (monocito o macrófago), y de la línea hematopoyética de la que proceden. La línea celular THP-1 es la más utilizada y procede de un paciente con leucemia monocítica aguda⁹⁶. Estas células expresan marcadores característicos de los monocitos y poseen receptores Fc y C3b. Sin embargo, no expresan inmunoglobulinas de superficie o citoplasmáticas. Están caracterizadas por su capacidad fagocítica y por la producción de lisozimas y esterasa, además de por su capacidad para restaurar la respuesta de los linfocitos T a la concavalina A⁹⁶. Al tratar las THP-1 con PMA (12-miristato, 13-acetato de forbol) se observa adherencia a las superficies de cristal, a la vez que exhiben características morfológicas similares a los macrófagos⁹⁷. Además, poseen la capacidad de acumular lípidos procedentes de las LDL en su interior, y de expresar en su superficie el receptor para las LDL acetiladas, la apolipoproteína E y la lipoproteín lipasa⁹⁸, así como el receptor para las VLDL⁹⁹, todos ellos considerados marcadores diferenciadores de los macrófagos. Por estos motivos, estas células activadas con PMA han sido ampliamente utilizadas para el estudio *in vitro* de la formación de células espumosas y de la aterosclerosis¹⁰⁰.

Sin embargo, existen diferencias fundamentales entre las células monocíticas y las THP-1. En primer lugar, los monocitos humanos sufren apoptosis cuando no son estimulados por determinadas citoquinas, mientras que las THP-1 crecen indefinidamente. En segundo lugar, existe una heterogeneidad celular en cuanto a la expresión de algunos receptores. Incluso se ha observado que pueden perder la diferenciación cuando se cultivan por un tiempo excesivo, hecho que no les ocurre a los macrófagos. Por otro lado, se ha observado que tras su activación, las THP-1 segregan TGF- β 1, que inhibe la actividad de los receptores scavenger para las LDL acetiladas¹⁰¹. Además, en las células activadas tampoco se observa la expresión del receptor hepático característico de los macrófagos¹⁰⁰. Concretamente, se ha

caracterizado el perfil de expresión genética de estas células, comparándolo con el de los monocitos y macrófagos y se ha demostrado que los monocitos son bastante diferentes a las células THP-1 no estimuladas. Sin embargo, al comparar con los macrófagos, las THP-1 activadas con PMA, comparten la expresión de algunos, aunque no todos, los genes característicos ¹⁰⁰. Todos estos datos sugieren que, aunque el uso de esta línea celular es adecuado para el estudio *in vitro* de los mecanismos moleculares de las enfermedades cardiovasculares, requieren una rigurosa interpretación de los resultados.

Los cultivos celulares con THP-1 han sido ampliamente utilizados para el estudio de múltiples mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la aterosclerosis. Entre ellos, se han estudiado receptores de membrana para distintas partículas como las HDL ¹⁰², procesos de activación e inhibición de proliferación celular ¹⁰³, la expresión de metaloproteasas y de algunas moléculas que pueden modular su expresión y/o actividad ¹⁰⁴, el metabolismo de moléculas de adhesión y citoquinas, así como los mecanismos nucleares activados a través de las LDL oxidadas durante el desarrollo de la aterosclerosis ¹⁰⁵.

A.4.4.- Co-cultivos

Existen varios estudios en los que se cultivan conjuntamente varios tipos de células características de las lesiones ateroscleróticas, con el fin de estudiar los mecanismos moleculares de sus interacciones durante la formación de la placa de ateroma. Así por ejemplo, se ha visto que el co-cultivo de células THP-1 con células del músculo liso y células aórticas endoteliales es adecuado para el estudio de los mecanismos moleculares y celulares implicados en la formación de células espumosas durante los primeros estadios de la aterosclerosis ¹⁰⁶. Añadiendo LDL a este tipo de cultivos, se ha llegado incluso a obtener estructuras muy similares a la placa

ateromatosa *in vitro* ¹⁰⁷. No obstante, estos cultivos son complicados, no se pueden mantener durante mucho tiempo y los resultados obtenidos se restringen únicamente a técnicas histomorfológicas e inmunohistoquímicas, lo que hace que no sean muy utilizados.

A.5.- Estructura y función de la ECM en los vasos sanguíneos y su relación con la aterosclerosis.

La ECM es una mezcla compleja de macromoléculas, cada una de ellas con una función especializada, que constituye el entorno de las células eucarióticas. La composición de la ECM es específica para cada tejido y genera un mediambiente diferente para las distintas células del organismo. La ECM actúa como soporte para el crecimiento celular y proporciona una estructura estable alrededor de las células. Además de esta función estructural, la matriz contiene información codificada, en función del tipo de moléculas que la constituyan, que se transmite al interior celular ¹⁰⁸, ¹⁰⁹, por lo que ejerce un papel esencial en el desarrollo de la función celular normal ¹¹⁰, ¹¹¹. Influye en procesos de adhesión y separación, en la motilidad, en el establecimiento de la morfología y en la iniciación de la transmisión de señales. Modula la proliferación celular y la diferenciación tisular, y participa en la regulación de diversas funciones metabólicas ¹¹², ¹¹³. Además, desempeña una importante función en la angiogénesis ¹¹⁴, ¹¹⁵ y actúa como reservorio de moléculas con actividad biológica ya que, por ejemplo, algunos factores de crecimiento y citoquinas están unidos a los proteoglicanos de la matriz y de la superficie celular ¹¹⁶.

A mediados del siglo XX se consideraba a la ECM como “fibras de colágeno embebidas en una sustancia coloidal”. Sin embargo, actualmente se sabe que su composición y su organización son muy variadas. La expresión de los genes que codifican las proteínas de la ECM varía según el tipo celular y la edad de la célula, y está relacionada con algunas patologías. Los componentes de la ECM se pueden dividir en cinco tipos diferentes de macromoléculas:

- Colágenos,
- Elastinas y proteínas microfibrilares
- Proteínas matricelulares
- Glicoproteínas de adhesión.
- PGs

Estas macromoléculas, frecuentemente multiméricas, se asocian entre sí de manera no covalente para formar una matriz insoluble, generando estructuras especializadas que difieren en su forma y propiedades, lo que les permite adaptarse a los requerimientos funcionales de los diferentes tejidos. Las propiedades de la matriz dependen de las moléculas particulares que la forman, del porcentaje relativo de cada una de ellas y de las interacciones que se establezcan entre los diferentes componentes. La composición y, por tanto, la organización supramolecular de los componentes de la ECM, determinan su influencia en el comportamiento celular.

A.5.1.- Colágenos

Estas proteínas son los principales elementos estructurales de la ECM y proporcionan la forma, la fuerza y la flexibilidad a los tejidos, entre otras propiedades. El colágeno ha sido sinónimo de proteína fibrosa, ya que los primeros colágenos conocidos forman fibras. Un ejemplo es el colágeno de tipo 1, que constituye el 90% del colágeno corporal; la molécula está formada por una triple hélice rígida (triple hélice de colágeno), que se asocia formando las características fibras visualizadas por microscopía electrónica. Sin embargo, el descubrimiento de otros tipos ha permitido concluir que la formación de fibras es una característica de un número limitado de colágenos. Actualmente el término colágeno se engloba a una superfamilia de

proteínas de 28 tipos de moléculas diferentes, formadas por más de una treintena de cadenas polipeptídicas genéticamente diferentes ¹¹⁷.

Algunos colágenos identificados en la última década son componentes minoritarios en los tejidos y todavía no se conoce la estructura macromolecular y/o la función que desempeñan. Los colágenos se pueden definir como “moléculas cuyas propiedades dependen de la triple hélice” o como aquellas “macromoléculas estructurales de la ECM que incluyen en su estructura uno o varios dominios con conformación de triple hélice” ¹¹⁸. Dentro de esta familia se incluyen las moléculas de colágeno que no tienen una triple hélice continua y que presentan dominios globulares. Además, se excluyen otras proteínas, como el componente C1q del complemento o la acetilcolinesterasa, que aunque contienen una región en triple hélice no se encuentran en la ECM.

Los colágenos presentan una secuencia en sus cadenas polipeptídicas muy peculiar, con muchas repeticiones del triplete glicina-X-Y (donde X suele ser prolina, e Y suele ser hidroxiprolina) que hacen posible que se genere la triple hélice de colágeno, estructura resistente a la acción de proteasas comunes. En los colágenos que no forman fibras la estructura en triple hélice queda interrumpida por las denominadas regiones no colagenosas, que varían desde dominios globulares extensos hasta pequeñas regiones donde la secuencia del triplete no se repite o se altera. Estas zonas son sensibles al ataque proteolítico, pero confieren flexibilidad a la molécula de colágeno y la capacita para formar una gran diversidad de estructuras macromoleculares.

A.5.1.1- Clasificación de los colágenos

Los colágenos se clasifican según sus propiedades estructurales, y se nombran con números consecutivos según la fecha de su descubrimiento y la composición de sus cadenas α .

A.5.1.1.1- Colágenos fibrilares

Presentan una triple hélice continua de 300 nm, con repeticiones Gly-X-Y en toda la molécula, a excepción de los tipos XXIV y XXVII que presentan pequeñas interrupciones en estas secuencias. Forman fibras resistentes, estabilizadas por enlaces covalentes, con bandas periódicas y diámetro característico para cada uno de ellos. El tipo II y el XI tienen varias isoformas y se han encontrado formas híbridas que contienen los tipos V y XI.

A.5.1.1.1.1.-Colágenos que forman redes o mallas: tipos IV, VIII, X y la cadena α del colágeno tipo IV.

Contienen un gran dominio con estructura típica de los colágenos, que se interrumpe por varios dominios en las que se pierde la secuencia Gly-X-Y (dominios no-colágenos) y con ello la estructura. Estos dominios también se encuentran en las cadenas amino y carboxilo terminales. Los monómeros se asocian en estos dominios formando dímeros y tetrámeros, según se produzca la unión por el extremo carboxilo o el amino respectivamente. De este modo, se forma una estructura compleja en la que los dominios de triple hélice se entrelazan dando lugar a una especie de red. El colágeno tipo VIII se encuentra en el ojo en forma de mayas hexagonales apiladas. El

colágeno tipo X se encuentra en estructuras similares en zonas hiper-calcificadas del cartílago ¹¹⁹.

A.5.1.1.1.2.-Colágenos asociados a fibras con interrupción de la triple hélice (FACIT): tipos IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI y XXII.

Estos colágenos se caracterizan por tener pequeños segmentos de triple hélice interrumpidos por pequeños dominios no-colágenos. Estos colágenos no forman fibras por sí mismo, sino que se unen a la superficie de los colágenos fibrilares.

El colágeno tipo IX se encuentra en la superficie del colágeno tipo II, con el que se une covalentemente. Además este tipo de colágeno presenta cadenas de glicosaminoglicanos (GAG) unidas covalentemente a la cadena $\alpha 2$ (IX). Los tipos XII and XIV muestra similitudes con el IX, incluida la cadena de GAG. El resto de los tipos que se han incluido en este grupo no están totalmente caracterizados, pero muestran similitudes con otros miembros de la familia ¹²⁰⁻¹²².

A.5.1.1.1.3.-Filamentos con glóbulos y constituyentes de las fibras de anclaje: tipos VI, VII, XXVI y XXVIII.

El colágeno tipo VI se caracteriza tener cadenas α con grandes dominios globulares en sus extremos amino y carboxilo, separados por pequeños dominios de triple hélice. Las cadenas $\alpha 2$ (VI) y $\alpha 3$ (VI) presentan varias isoformas por ajuste alternativo. El colágeno tipo VI forma pequeños filamentos globulares en la matriz. El colágeno tipo VII forma fibras de anclaje que unen la membrana basal a las fibras de anclaje del colágeno tipo IV y la laminina de capas de matriz subyacentes. Este tipo contiene la triple hélice más grande conocida en los colágenos, con muy pocas y

pequeñas interrupciones. En la primera de estas interrupciones (dominio NC1) el colágeno tipo VII se une a los tipos I y IV, a fibronectina y a laminina. El colágeno XXVI se expresa principalmente en testículo y ovario, presenta numerosos sitios de glicosilación y una estructura similar a los demás miembros de este grupo. El colágeno tipo XXVIII contiene dominios factor de von Willebrand A, y se localiza en piel y nervios periféricos ¹²³⁻¹²⁶.

A.5.1.1.4.-Colágenos con dominios transmembrana: tipos XII, XVII, XXIII y XXV.

Estos son los únicos colágenos con dominios transmembrana conocidos y se orientan de forma que su extremo amino está en el citoplasma. El colágeno tipo XII tiene multitud de isoformas y el XVIII forma parte de los hemidesmosomas. El colágeno tipo XXIII se expresa en pulmón, córnea, cerebro, piel y tendones, y presenta una estructura idéntica a los anteriores. El XXV se expresa principalmente en cerebro y está implicado en el desarrollo de la enfermedad de Alzheimer ^{127, 128}.

A.5.1.1.2.- Otros colágenos no fibrilares: tipos XV y XVIII .

Los colágenos XV y XVIII presentan grandes dominios globulares en sus extremos, y la triple hélice está muy interrumpida con dominios no-colágenos. Presentan una gran cantidad de sitios de glicosilación por lo que se cree que están fuertemente glicosilados ¹²⁹.

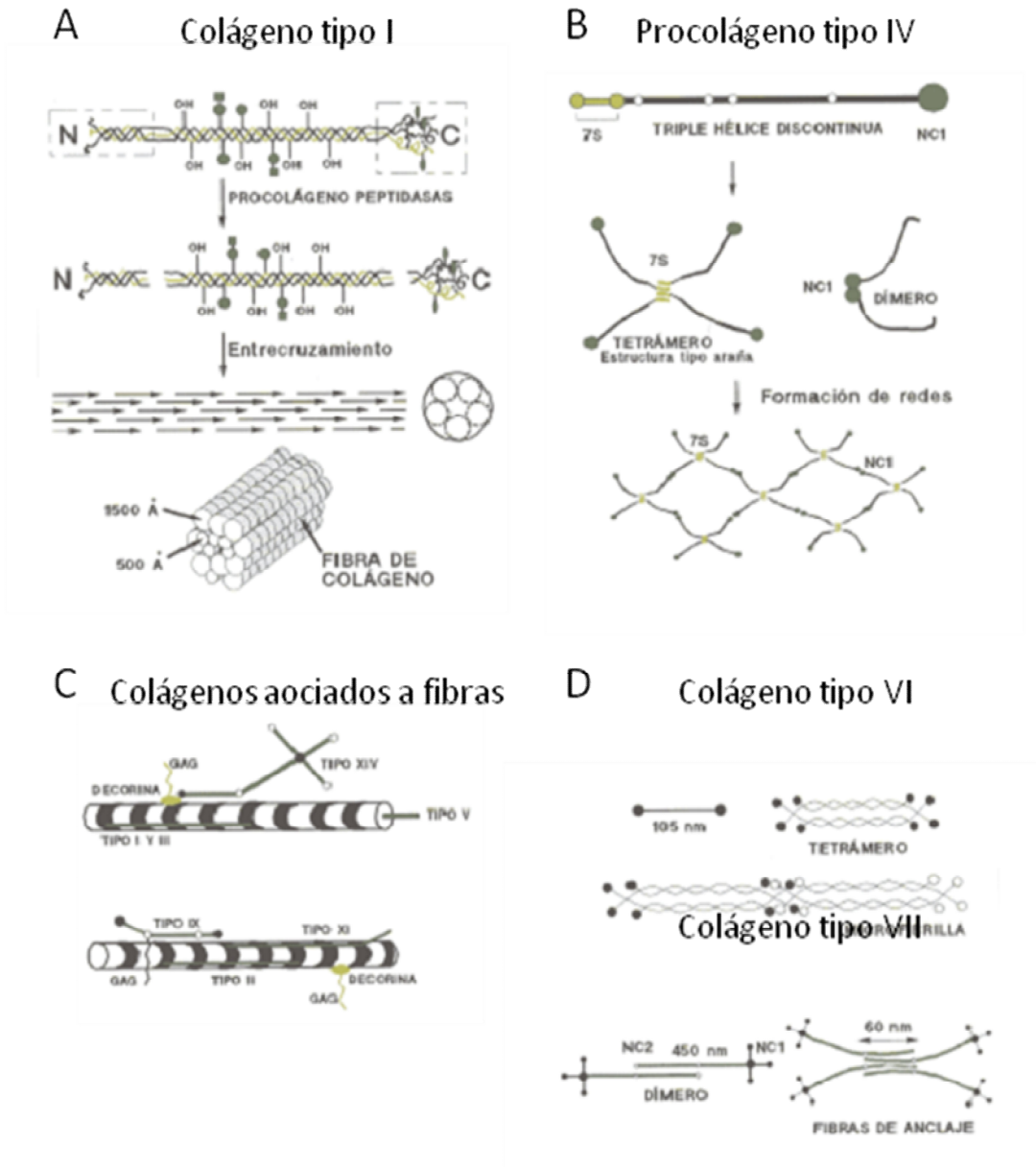


Figura A.9.- Formación de fibras y redes de colágeno en el espacio extracelular. Según el tipo de colágeno, el procesamiento extracelular de las moléculas de procolágeno es diferente y, por tanto, las estructuras supramoleculares que forman. (A) Proceso de formación y estabilización de las fibras de colágeno intersticial. Las procolágeno peptidasas actúan sobre el procolágeno, que pierde los dominios no colagenosos de los extremos, y la lisil oxidasa convierte ciertos

residuos de lisina e hidroxilisina en los correspondientes aldehídos. La triple hélice resultante se agrega lateralmente, formando microfibrillas que se estabilizan por la formación de enlaces de entrecruzamiento covalentes. (B). La interacción de moléculas de colágeno de tipo IV para formar estructuras en forma de red. La molécula de procolágeno de tipo IV no se procesa, es una molécula más flexible que la de los colágenos fibrilares, ya que contiene inclusiones y deleciones en la secuencia del triplete Gly-X-Y. El procolágeno de tipo IV no pierde los extremos no colagenosos por lo que no puede formar fibras. La asociación de las moléculas precursoras se establece a través de los extremos terminales, formando dímeros y tetrámeros y, en último término, una red tridimensional. Estas estructuras se estabilizan por enlaces covalentes de entrecruzamiento y por puentes disulfuro. (C y D) Otros tipos de asociaciones que muestran la versatilidad de esta superfamilia de moléculas de la matriz extracelular.

Aunque la principal función que desempeñan los colágenos es estructural, algunos de ellos, como los colágenos de tipo I, IV y VI, son a su vez miembros de la familia de las denominadas "glicoproteínas de adhesión", en la cual también se encuentran incluidos otros componentes de la ECM. Se caracterizan porque en la mayoría de los casos contienen distintas secuencias específicas de reconocimiento celular y, por tanto, son capaces de interactuar con las células a través de receptores de la superficie celular. Esto implica que dichos colágenos, dependiendo del tipo celular considerado, influyen en el comportamiento celular modulando procesos como adhesión, extensión, migración y proliferación celular. De hecho, en numerosos estudios se utiliza colágeno de tipo I o de tipo IV como sustratos adhesivos, analizando la respuesta de distintos tipos de células.

A.5.1. 2.- Síntesis de Colágeno

Los colágenos se sintetizan en los ribosomas unidos a la membrana del retículo endoplásmico como cadenas α de pre-pro-colágeno. Estas moléculas contienen un péptido señal, que determina su transporte en el retículo y mantienen sus dominios

terminales no-colágenos de sus extremos amino y carboxilo. Cada cadena de procolágeno se combina con otras dos en el lumen del retículo para dar la molécula de triple hélice. En este punto se produce una extensión de los péptidos, lo que permite una correcta formación de la estructura, y que sta continúe en el proceso de secreción. En la triple hélice, la cadena lateral de cada uno de los residuos de la tercera cadena se orienta hacia el centro de la hélice, desplazado 30° respecto al residuo anterior ¹³⁰. Estudios de impedimentos estéricos han demostrado que el centro de la cadena solo puede estar ocupado por residuos de glicina y que las cadenas laterales de otros aminoácidos perturban la conformación de la triple hélice. En modificaciones postranscripcionales posteriores, que ocurren en el lumen reticular, se produce la hidroxilación de los residuos de prolina de la posición Y. Esto estabiliza la molécula por la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares. De hecho, es necesario que se formen al menos 100 puentes de hidrógeno para que la triple hélice sea termodinámicamente estable a 37°C . La hidroxilación de los residuos de prolina la lleva a cabo la prolil 4-hidroxilasa, tetrámero con dos subunidades α y dos β ($\alpha_2 \beta_2$). En la que la subunidad α es la responsable de la hidroxilación y la β , que es una disulfuro isomerasa, se encarga de mantener las subunidades α en una conformación soluble y activa ¹³¹. Este enzima necesita Fe^{2+} , oxoglutarato, O_2 y ascorbato para realizar su función. Carencias de estos elementos producen patologías relacionadas con las síntesis de colágeno.

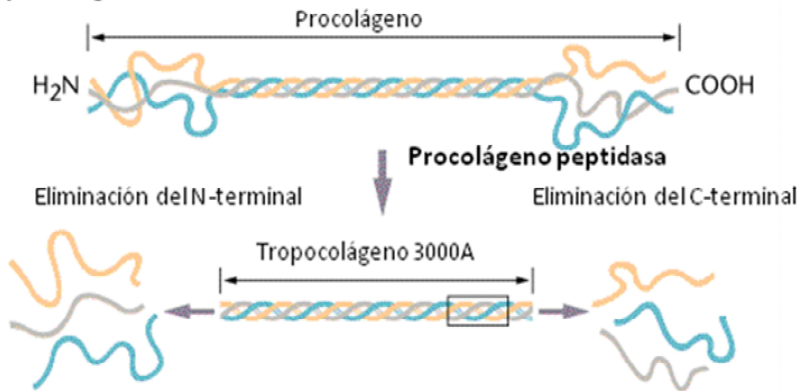
Otra de las modificaciones postranscripcionales cruciales en la síntesis de colágeno es la hidroxilación de residuos de lisina. Esta reacción ocurre también en el retículo y esta catalizada por la lisil hidroxilasa. Este enzima es un homodímero que necesita las mismas condiciones que el anterior para que se lleve a cabo la reacción. Los residuos de hidroxilisina son sitios de glicosilación esenciales para la estabilidad de las uniones intermoleculares entre colágenos, que ocurren en el espacio extracelular después de la secreción. La glicosilación de estos residuos es inusual y consiste en la unión de un residuo de galactosa o un glucosil-galactosil disacárido. El

número de glicosilaciones varía dependiendo del tipo de colágeno, y su función no está muy bien caracterizada.

Una vez secretado al exterior de la célula, se produce la hidrólisis de los extremos amino y carboxilo de las moléculas de pro-colágeno, mediante N y C peptidasas respectivamente. Estas enzimas son miembros de la familia de las metalopeptidasas zinc dependientes, y contienen dominios con la capacidad de interactuar con células y otros componentes de la matriz^{132, 133}. Una vez eliminados los extremos las moléculas de pro-colágenos se convierten en moléculas de tropocolágeno, que se unen en el espacio extracelular para dar las fibras colágenas. Este proceso, en parte, se debe a la tendencia de estas moléculas de autoensamblarse. No obstante, las fibras se unen en las cercanías de la célula, lo que hace pensar que es esta la que dirige los sitios y las tasas de unión.

Los colágenos no fibrilares sufren solo una proteólisis parcial antes de ensamblarse. Las fibras colágenas están fuertemente unidas mediante enlaces covalentes en las moléculas de tropocolágeno. El número de enlaces formados es específico del tejido y depende de los requerimientos de éste. Así por ejemplo en el tendón, donde la resistencia a tensiones es muy importante, hay muchísimos enlaces covalentes entre las moléculas de tropocolágeno que forman las fibras. Estos enlaces se producen por desaminación de residuos de lisina e hidroxilisina y la unión a grupos aldehído de otras moléculas. El enzima que cataliza esta reacción es la lisiloxidasas, y requiere cobre y oxígeno molecular para la reacción. La inhibición de este enzima produce que los tejidos se vuelven débiles y quebradizos (figura A.10).

A) Formación de tropocolágeno



B) Asociación en fibras colágenas

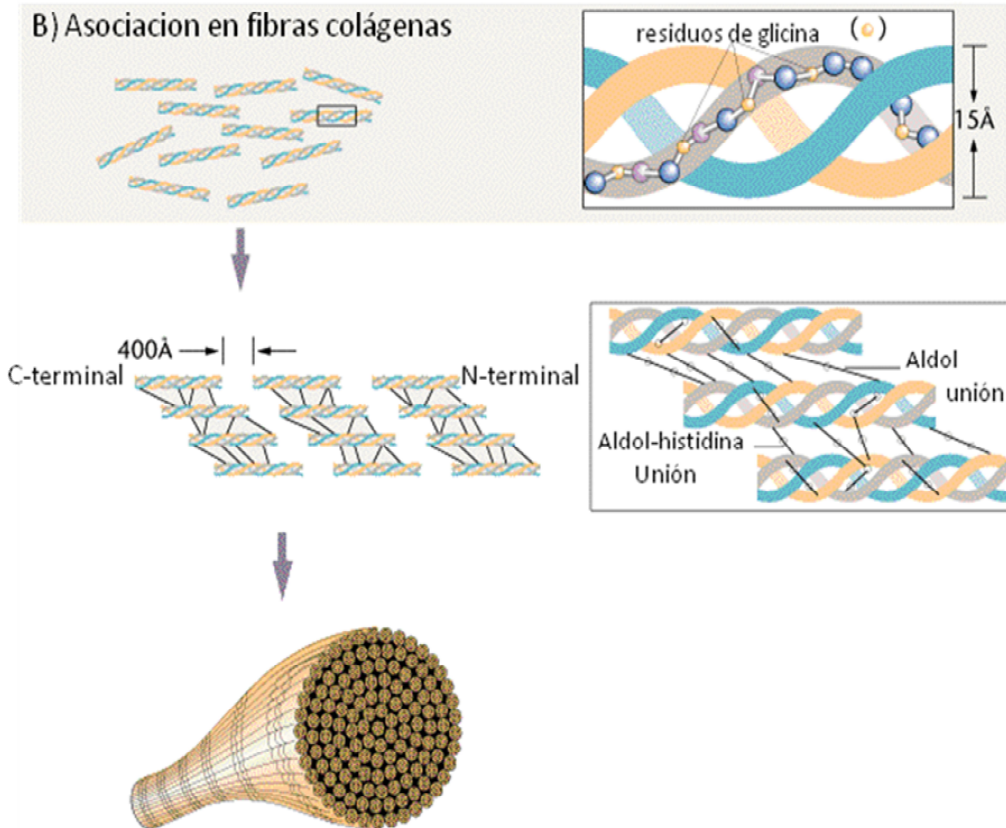


Figura A.10. Síntesis de cólagenos fibrilares.

A.5.1. 3.- Papel del colágeno en los vasos sanguíneos y en la aterosclerosis

En las arterias los colágenos fibrilares (especialmente el I y III) son los componentes principales y se ensamblan en redes fibrosas que le dan consistencia frente a tensiones a la pared de los vasos. Los colágenos no fibrilares (IV, VI, y VIII) rodean las SMC y forman redes tridimensionales que aumentan la consistencia y sirven de sustrato de anclaje para células vasculares ¹³⁴. Además, regulan la actividad de las SMC; así, el colágeno tipo IV en la lamina basal mantiene las células musculares lisas en su estado contráctil a través de la integrina $\alpha1\beta1$ y el colágeno I inhibe la proliferación. La principal fuente de colágeno en la íntima y en la media de las arterias son las células musculares lisas. La modulación de esta síntesis viene acompañada por cambios en el fenotipo asociados a alteraciones celulares. El cambio de fenotipo puede producir la rotura de la lamina basal a través de las MMPs ¹³⁵. La síntesis de colágeno por células musculares lisas está regulada por muchos factores, como los factores de crecimiento (como por ejemplo, TGF- β , EGF y PDGF) ¹³⁶, las citoquinas (como la IL-1), la endotelina I, la AII, las LDL y el colesterol, la naturaleza del sustrato de la ECM, la fase de crecimiento celular, entre otros ¹³⁶⁻¹⁴². Aunque su papel en la síntesis de colágenos no es tan importante, las CE vasculares también expresan genes que codifican para el colágeno tipo I, III, IV, y VIII ¹⁴³. El colágeno también juega un papel en la formación de nuevos vasos ¹⁴⁴ y reacciona con las plaquetas induciendo su agregación.

Defectos en la síntesis y deposición de colágeno vascular tipo I y III dan como resultado aneurismas y rotura de arterias musculares y elásticas ¹⁴⁵. En lo referente a los cambios en la ECM en el proceso aterosclerótico, se ha visto cómo las LDL y el colesterol alteran la composición de los colágenos de la matriz vascular interfiriendo en su síntesis y degradación ^{141, 142, 146, 147}. Otro factor de riesgo aterosclerótico que afecta a la síntesis de colágeno es la homocisteinemia ¹⁴⁸. Se ha visto que células tratadas con homocisteína, a concentraciones similares a las que presentan los pacientes con una homocisteinemia avanzada, presentan una expresión de colágeno tipo I superior en un 214% respecto a los controles ¹⁴⁹.

En la aterosclerosis la expresión de los colágenos no solo cambia en cuanto a cantidad, sino que también lo hace en cuanto a su localización. Así, la expresión de colágeno tipo I ocurre principalmente en la cubierta fibrosa y las regiones vascularizadas de las placas primarias. En el centro de la placa, donde la concentración de lípidos y macrófagos es mayor, la proporción de colágeno tipo I es menor. No obstante, el colágeno I y el III se unen a las LDL, especialmente a las oxidadas, lo que tiene un papel importante en la captación y la retención de estas moléculas en la pared arterial, y por tanto en la progresión de la enfermedad ¹⁵⁰. El colágeno de tipo IV se incrementa en la membrana basal y alrededor de las SMC ¹⁵¹, dando una membrana basal hipertrofiada que parece afectar a la permeabilidad y metabolismo de las células circundantes. También puede actuar reteniendo proteínas plasmáticas, lipoproteínas y factores de crecimiento y/o calcio. El colágeno tipo V también se incrementa en las placas avanzadas y su papel puede ser el de estabilizar la malla de colágeno durante la fibrosis ¹⁵². La expresión del colágeno VIII también se encuentra incrementada, y se restringe a la media y la íntima arterial conforme avanza la progresión de la placa ¹⁵³. Este hecho debe de estar relacionado con la migración de las SMC de la media a la íntima arterial en el proceso aterosclerótico, ya que se ha visto que este tipo de colágeno induce la migración de las SMC ¹⁵⁴.

La activación de las plaquetas por el colágeno es importante en la homeostasis vascular, pero también puede serlo en la trombosis, ya que al producirse la rotura de la placa se produce una exposición de colágeno que induce una activación de las plaquetas ¹⁵⁵. Estudios de ateroectomias humanas han demostrado una relación directa entre la expresión del colágeno tipo I y la formación de trombos murales ¹⁵⁶. La razón exacta de esta asociación no está muy clara, pero puede deberse a que los factores de crecimiento del trombo y sus constituyentes fibrilares inducen la migración de las SMC y la síntesis de colágeno por parte de éstas. No obstante, el colágeno estabiliza la placa y su pérdida en la región de los hombros es lo que desencadena la rotura de ésta. Este hecho se debe a la pérdida de SMC sintéticas en estas zonas, además de la degradación de los colágenos preexistentes ¹⁵⁷.

A.5.2.- Elastina y proteínas microfibrilares

Durante la evolución, con la aparición del sistema circulatorio se hace necesario acomodar la estructura del vaso al flujo del corazón. Así, en la pared de los vasos, donde los colágenos son muy rígidos, es donde estas proteínas ejercen su función de proporcionar elasticidad.

A.5.2.1.- Elastinas

La elastina es el componente fundamental de las fibras elásticas, que son especialmente importantes en aquellos órganos que tienen que modelar su forma en función de las necesidades, como los vasos sanguíneos, el pulmón o la piel.

A diferencia de la diversidad genética de la familia de los colágenos, las elastinas se codifican únicamente por un solo gen. Al igual que el colágeno, la maduración de la elastina conlleva la unión de moléculas precursoras solubles, tropoelastina, que forma un polímero con multitud de enlaces intermoleculares. El ensamblaje de la elastina es un proceso complejo que necesita numerosas proteínas que alineen los múltiples enlaces entre monómeros de tropoelastina ¹⁵⁸.

A lo largo de la tropoelastina se repiten dos dominios, uno es una α hélice rica en alanina y lisina, y el otro es un barril β rico en glicina, valina y prolina. Una vez formada, la elastina es extremadamente hidrofóbica e insoluble, lo que hace que sea una de las proteínas más estables dentro del organismo.

A.5.2.2.- Fibrilina

Las microfibras fueron los primeros componentes descritos de las fibras elásticas. Son muy abundantes en los tejidos elásticos y en las zonulas ciliares del ojo, aunque se expresan en todos los demás tejidos. Dentro de estas las más importantes son las fibrilina-1 y -2, que juegan un papel crucial en la arquitectura de los microfilamentos. Estas glicoproteínas de 350 kDa son casi homólogas, y su estructura consta de varios dominios de unión a calcio, similares a los del factor de crecimiento endotelial (EGF), intercalados entre 8 dominios ricos en cisteína, similares a los que se encuentran en la familia de proteínas de unión al TGF- β . Estos dominios se pliegan y forman puentes disulfuro entre ellos, que dan lugar a una estructura rígida, que además se estabiliza mediante interdominios de unión a calcio e interacciones hidrofóbicas ¹⁵⁹. La función de los microfilamentos no está muy clara, aunque el hecho de que se asocien a las fibras elásticas, cuando éstas se están ensamblando, hace pensar que juegan un papel importante en el ensamblaje de éstas. Además, la fibrilina-1 y la fibrilina-2 se unen a la integrina $\alpha\beta 3$ a través de un sitio de unión RGD (Arg-Gly-Asp).

A.5.2.3.- Papel de la elastina en los vasos sanguíneos y en la aterosclerosis

La elastina es un componente fundamental de la pared vascular, que forma fibras elásticas y proporciona la plasticidad necesaria para mantener la presión y el flujo sanguíneo ¹⁶⁰. La elastina constituye del 20-50% del peso seco de la arteria, proporción similar a la de todos los colágenos. Defectos en la formación de fibras elásticas o la fragmentación de éstas producen una debilitación de la pared vascular, dilatación y aneurismas ¹⁶¹. Ratones que carecen de elastina mueren por enfermedad obstructiva arterial producida por la proliferación de células subendoteliales y una reestructuración en las SMC ¹⁶². Los cambios celulares observados en estos ratones son

similares a los que suceden en la aterosclerosis; sin embargo, no se asocian a daño endotelial, trombosis, o inflamación, como ocurre en los modelos ateroscleróticos. Por tanto, la elastina tiene un papel fundamental en las arterias además del papel estructural, controlando la proliferación de las células que la forman. Cultivos de SMC procedentes de estos ratones presentan fenotipo sintético y una alta tasa de migración y proliferación. Además, al añadir tropoelastina al medio, estas células se comportan como las de ratones controles. Estos datos demuestran que la elastina tiene un papel fundamental en la modulación del fenotipo, la diferenciación, la proliferación y la migración de estas células ¹⁶³. Otros estudios demuestran que la expresión de elastina se ve incrementada cuando se añaden al medio inhibidores de la proliferación de las SMC, como el ácido retinoico ¹⁶⁴ o la heparina ¹⁶⁵. Por el contrario, cuando añadimos estimuladores de la proliferación de las SMC como el EGF ¹⁶⁶, la angiotensina II ¹⁶⁷ o altas dosis de K⁺ ¹⁶⁸, se reduce enormemente la expresión de elastinas. Además, en las arterias, las elastinas favorecen la unión de LDL mediante fuerzas hidrofóbicas especialmente en presencia de calcio ¹⁶⁹. Esta interacción se produce con las LDL plasmática, y tienen como resultado la transferencia de esteres de colesterol de las LDL a la elastina ¹⁷⁰. Esta interacción provoca además una reducción en la unión entre LDL y HDL, debida a la unión de los lípidos a la elastina ¹⁷¹. Estos hechos hacen que el colesterol en las arterias se distribuya preferentemente en zonas ricas en elastina¹⁷², jugando un papel fundamental en la modulación de la respuesta de las SMC a la hipercolesterolemia, incrementado la proliferación, la migración y favoreciendo la transformación de estas en células espumosas ¹⁷³. De este modo, el papel de la elastina cambia dependiendo de la entorno lipídico, de modo que en una situación normal inhibe la proliferación de las SMC y favorece su fenotipo contráctil. En cambio, en un estado de hipercolesterolemia favorece el cambio fenotípico de las SMC y con ello la migración y la proliferación de estas células.

A.5.3.- Glicoproteínas de adhesión

La mayoría de las células que crecen *in vitro* necesitan adherirse para sobrevivir y proliferar, y requieren factores de adhesión, sobre todo durante los estadios iniciales después de la siembra. El suero utilizado en cultivos celulares proporciona estos factores. Contiene al menos dos glicoproteínas no colágenas, fibronectina y vitronectina, que pueden, de manera individual, promover la adhesión celular. Las glicoproteínas no colágenas constituyen un grupo heterogéneo de macromoléculas de la ECM que desempeñan funciones como la regulación del ensamblaje de componentes de la matriz, proporcionan centros de interacción entre las macromoléculas y median en las interacciones con las células. Entre las proteínas que componen este grupo se encuentran algunas que forman parte de las glicoproteínas de adhesión. Éstas son proteínas multifuncionales que presentan diferentes dominios estructurales donde reside su capacidad de unión a células y a otros componentes de la matriz. En la mayoría de los casos contienen la secuencia RGD de reconocimiento celular e interactúan con las células a través de las integrinas. En este grupo se incluyen proteínas como la fibronectina, laminina, entactina, tenascina, trombospondina, vitronectina y al factor de von Willebrand, además de los ya comentados colágenos de tipo I, IV y VI.

A.5.3.1.- Fibronectina

La fibronectina es una glicoproteína multifuncional presente en la ECM, en forma insoluble, y en fluidos corporales, en forma soluble ¹⁷⁴⁻¹⁷⁶. Es fundamental en procesos de adhesión celular y migración, en el mantenimiento de la morfología celular normal, en la organización del citoesqueleto, en procesos de hemostasis y trombosis, en reparación de heridas, en la embriogénesis y también en la diferenciación celular.

La fibronectina contiene un 4-10% de hidratos de carbono, dependiendo del origen de la proteína. Se ha sugerido que los hidratos de carbono pueden protegerla frente a la proteólisis y controlan múltiples interacciones con células y con otras macromoléculas. La ausencia de hidratos de carbono incrementa la interacción de fibronectina con gelatina así como su capacidad para promover la adhesión y la extensión de fibroblastos.

A.5.3.1.1.-Estructura

La molécula de fibronectina está formada por dos cadenas polipeptídicas que se asocian por puentes disulfuro cerca del extremo carboxilo terminal formando un dímero de masa molecular aproximada de 500 kDa ¹⁷⁷. Está formada por repeticiones de tres tipos distintos de dominios que difieren en su estructura primaria y secundaria. Cada cadena está constituida por 12 dominios de tipo I, 2 dominios de tipo II, y un mínimo de 15 repeticiones de tipo III. Algunos de los elementos que se repiten en la fibronectina aparecen también en otras proteínas. Por ejemplo, las secuencias de tipo I se encuentran en el activador del plasminógeno de origen tisular y en el factor XIIIa; las de tipo II en el factor XIIa, y las de tipo III, entre otras, en los colágenos de tipos VI, XII y XIV, en la tenascina y en la cadena β 4 de las integrinas (figura A.11).

Fibronectina

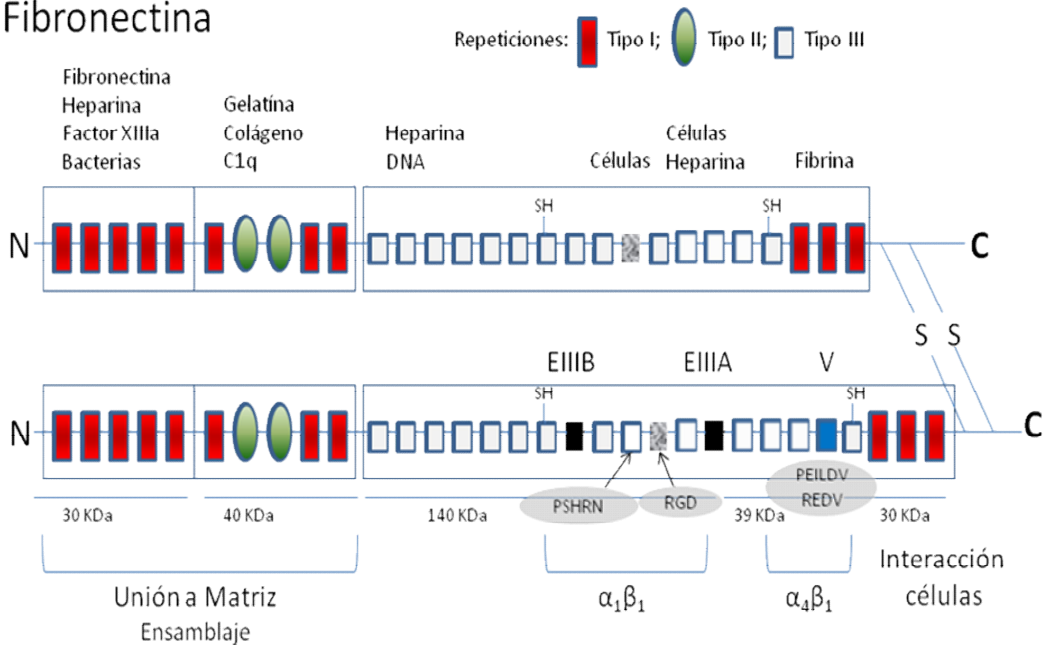


Figura A.11.- Estructura modular de la fibronectina; organización de dominios estructurales y funcionales. A lo largo de cada cadena polipeptídica que compone la fibronectina se repiten tres tipos de repeticiones estructurales diferentes (tipo I, II y III). La secuencia -RGD-, reconocida por las células, se encuentra en la décima repetición de tipo III. En la figura se muestra una molécula de fibronectina hipotética, con una cadena donde aparecen todos los dominios (se incluyen las regiones susceptibles de sufrir procesamiento alternativo: EIIIA, EIIIE3 y V) y otra carente de ellos. Los estudios con diferentes fragmentos de fibronectina que aparecen recuadrados en la figura, obtenidos por digestión proteolítica controlada, han permitido determinar las regiones funcionales y los lugares de unión específicos de diferentes moléculas y células. En la parte superior de una de las cadenas se detallan los ligandos que pueden interactuar con la fibronectina. Para la heparina y la fibrina se han descrito más de una localización de unión. La región amino-terminal parece implicada principalmente en la interacción con componentes de la matriz, mientras que la responsable de la interacción con células se localiza hacia el extremo carboxilo terminal de la molécula. La expresión del segmento variable V puede generar nuevos centros de interacción con células (-PEILDV-, REDV-).

Los principales dominios funcionales de esta molécula aparecen en la figura 8. Dentro de la porción amino terminal de 70 kDa se encuentran diferentes sitios de unión, entre ellos, sitios para la unión a fibrina, heparina, factor XIIA, *Staphylococcus aureus*, y centros implicados en el ensamblaje de la matriz, probablemente a través del autoensamblaje de la fibronectina. El dominio de unión a colágeno/gelatina se encuentra localizado también en esta región. La parte central de la molécula está compuesta por repeticiones de tipo III y contiene sitios para interactuar con heparina y con células a través de dominios específicos.

Las diferencias que existen entre las cadenas de fibronectina plasmáticas (sintetizada por hepatocitos) y las secretadas a la ECM por distintas células se deben a variaciones en el procesamiento postranscripcional del mRNA, lo que genera una variedad de isoformas derivadas del mismo gen. Se han identificado tres regiones susceptibles de sufrir un procesamiento alternativo (segmentos EIIIA, EIIIR y el conector V) cuya expresión puede modificar parcialmente la función de la fibronectina. Los segmentos EIIIA y EIIIR pueden estar presentes, como en la fibronectina sintetizada por diversos tipos celulares, o ser eliminados, como ocurre en la fibronectina plasmática ¹⁷⁶. Se pueden observar cinco variantes diferentes de fibronectina en función de que el segmento V sea eliminado, expresado parcial o completamente ¹⁷⁸. Estas modificaciones confieren a la fibronectina nuevos sitios de unión a células y le confieren propiedades diferentes, alterándose la solubilidad, la glicosilación y la sensibilidad a proteasas. Según la porción que se exprese del segmento V, se pueden introducir uno o dos sitios adicionales de unión a células y se puede afectar la actividad de unión a heparina. Además, este dominio contiene dos sitios de unión para O-oligosacáridos y uno para N-oligosacáridos, lo que puede modificar las propiedades de adhesión de la fibronectina. El procesamiento del segmento EIIIB, introduce una localización sensible a la degradación proteolítica. La expresión de EIIIA es mayor en células transformadas y en tumores que en células normales de mamífero, sin embargo esto no ocurre, por ejemplo, en células de pollo.

La estructura multidominio de la fibronectina, como muchas otras proteínas de la matriz extracelular, le permite establecer interacciones no sólo con las células sino también con un gran número de macromoléculas, entre las que se encuentran la gelatina, diversos tipos de colágenos nativos, heparina, fibrina, trombospondina, DNA y actina. Los sitios de unión para estas macromoléculas se encuentran en dominios separados, por lo que la fibronectina puede generar múltiples interacciones simultáneas con células y con otras moléculas ¹⁷⁵. Esto hace que la proteína pueda mediar en el control de distintas actividades biológicas (Tabla A.1).

Interacciones	Actividades biológicas
Colágenos, gelatina y poliaminas	Adhesión y extensión celular
Heparina	Proliferación y migración celular
Fibrina	Morfología celular y diferenciación
Autoensamblaje	Hemostasia y reparación de heridas
Interacción con células	Inflamación
Actina, DNA factor XIIa	Ensamblaje de la matriz de fibronectina
Bacterias	Metástasis de células tumorales

Tabla A.1. Interacciones y actividades biológicas en las que participa la fibronectina.

A.5.3.1.2.-Dominio de unión a células

La fibronectina presenta al menos dos regiones de adhesión celular que pueden interactuar independientemente con distintos receptores de la superficie celular. El primer sitio de adhesión celular de la fibronectina se localiza en la parte central de la proteína, en el décimo dominio de tipo III, en concreto en la secuencia -Gly-Arg-Gly-Asp-Ser- (GRGDS) ^{179, 180}. Además, existe una secuencia adicional que actúa de manera

sinérgica con el sitio RGD para promover la adhesión celular, la secuencia -Pro-His-Ser-Arg-Asn- (PHSRN) localizada en el dominio nueve de tipo III, que se conserva entre diferentes especies, lo que confirma su importancia funcional. El aminoácido crucial en dicha secuencia es la arginina, ya que incluso una sustitución conservativa de lisina por arginina da lugar a la pérdida de actividad adhesiva. Diversos estudios han indicado que los sitios PHSRN y RGD deben estar orientados o espaciados correctamente para favorecer al máximo la adhesión celular ¹⁸¹. Puesto que la secuencia RGD no es específica de fibronectina, se intenta explicar la especificidad de las interacciones celulares con varias glicoproteínas a través de la implicación de secuencias próximas, de elementos de adhesión distales o de diferencias conformacionales. Por experimentos de inhibición de anticuerpos se ha podido determinar que ambos sitios, el RGD y el sinérgico, participan en la migración celular y en la organización del citoesqueleto de células sembradas sobre fibronectina, indicando que los dos sitios se requieren para un gran número de actividades de esta glicoproteína.

Una segunda región de adhesión celular independiente se localiza cerca de la región carboxilo terminal, en el segmento conector o dominio V ¹⁷⁵. Esta región participa en la adhesión de células de la cresta neural, células de melanoma y ciertos leucocitos. Al menos dos secuencias dentro de este dominio contienen actividad adhesiva. Las secuencias mínimas de reconocimiento de esta región son -Leu-Asp-Val- (LDV) y -Arg-Glu-Asp-Val- (REDV). Al contrario que las secuencias centrales RGD y PHSRN, las secuencias LDV y REDV no actúan sinérgicamente, sino que tienen un efecto aditivo en la adhesión celular.

A.5.3.2.-Laminina

Como las fibronectinas, las lamininas son una proteínas modulares con varios dominios que interaccionan con las células y la ECM ¹⁸². Constituyen una familia de

glicoproteínas de la membrana basal que afectan a la proliferación, migración y diferenciación celular. Además, es la responsable del anclaje de las células a la membrana basal y del control de los estados diferenciados de las células que están asociadas a ésta ^{183, 184}. La laminina ejerce estas actividades en el desarrollo tisular, en condiciones patológicas y en la reparación de heridas ¹⁸⁵. Se han identificado once lamininas diferentes, cada una de ellas constituidas por tres cadenas (α , β y γ). La molécula de laminina presenta en microscopia electrónica una estructura extendida en forma de cruz latina, asimétrica, con tres brazos cortos aparentemente idénticos de 36 nm y un brazo largo de 77 nm, observándose elementos globulares en cada uno de los brazos ^{186, 187}. Dos de los brazos cortos contienen, cada uno, una región globular central y otra terminal, separadas por regiones en forma de varilla. El tercer brazo corto presenta una región globular adicional. El brazo largo de la laminina se muestra como una varilla flexible y está compuesto las cadenas α , β y γ , que se unen formando una α -hélice. Este brazo termina en un gran dominio glabular, formado por cinco subdominios homólogos de la región C-terminal de la cadena α .

Junto con el colágeno tipo IV, las lamininas son el mayor elemento estructural de la membrana basal ¹⁸⁸. La arquitectura de la membrana basal viene determinada por la unión específica de varios componentes. El esqueleto estructural está compuesto por cadenas de colágeno tipo IV que se unen covalentemente formando una red polimérica. Las moléculas de laminina se unen por sus extremos terminales formando otra red. El nidógeno se une a la lamina cerca del su centro, e interacciona con el colágeno tipo IV uniendo ambos ¹⁸⁹. A esta estructura se unen perlecanos que proporcionan carga a la lámina basal. Además, en la membrana basal se puede encontrar fibronectina, colágeno tipo V, fibulina, osteonectina y poteoglicanos ricos en condroitín sulfato. No obstante, estos últimos no son componentes intrínsecos de la lámina basal.

En la laminina existen varios sitios de unión a células. Así por ejemplo, en la región terminal del brazo largo hay un sitio de unión a neuronas y en los brazos cortos

hay sitios de unión y señalización celular que tienen actividad mitogénica. La unión de la laminina a las células se produce por unión a receptores celulares, que pueden ser o no integrinas ^{190, 191}. A la laminina se unen las integrinas de la familia $\beta 1$ ($\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ y $\alpha 9\beta 1$) y las $\alpha 5\beta 3$ and $\alpha 6\beta 4$. La membrana basal puede tener un efecto indirecto en la célula, ya que se une factores de crecimiento y diferenciación (como FGF, PDGF y TGF- β) secuestrándolos del medio.

Existen varias isoformas distintas de laminina, que según su composición se clasifican en: lamininas con subunidades completas (lamininas 1, 2, 3 y 4), y lamininas que contienen una o más subunidades truncadas (lamininas 5-9) ¹⁸⁵. Cada una de estas isoformas tiene una función específica. Así, la laminina-I rodea al epitelio, mientras que la laminina-2 se encuentra asociada con fibras musculares ¹⁹². La laminina-I induce la adhesión y el crecimiento de muchos tipos de neuronas; la laminina-3 es adhesiva para neuronas motoras, pero impide el crecimiento de axones que es promovido por la laminina-I ¹⁹³. Los filamentos de anclaje en las uniones epidermis-dermis contienen un complejo unido por puentes disulfuro de laminina-5 y laminina-6 ¹²³, mientras que otras lamininas están presentes en la lamina densa. La existencia de diferentes isoformas puede indicar una evolución compleja y una adaptación a funciones diferentes con gran especificidad.

A.5.3.2.1.-Papel de las lamininas en los vasos sanguíneos y en la aterosclerosis

Las glicoproteínas de adhesión son otro grupo importante dentro de la ECM vascular, son las encargadas de conectar la ECM con las células por medio de las integrinas. Dentro de ellas las más importantes en las paredes de los vasos son la fibronectina y la laminina. La fibronectina se une a colágenos, fibrina y proteoglicanos mediante dominios específicos de unión, y a las SMC mediante integrinas específicas ¹⁹⁴. La laminina es más grande y abundante que la fibronectina, y también se une a las

células por medio de integrinas específicas y con otras moléculas de la ECM como colágeno IV y heparan sulfato ¹⁹⁵.

La distribución de glicoproteínas, también se ve afectada en la aterosclerosis. Estas proteínas tienen un efecto directo en la modulación del fenotipo en las SMC. La fibronectina acelera los cambios morfológicos que sufren las SMC al pasar del estado contráctil a sintético ^{196, 197}. La fibronectina interacciona con las LDL plasmáticas favoreciendo su captación por las SMC y los macrófagos y, por tanto, el desarrollo de la placa aterosclerótica ¹⁹⁸. En las fases iniciales de la aterosclerosis, se producen nuevos depósitos de fibronectina asociados formando una red fibrilar que se une a las SMC ^{135, 199-201}. En fases avanzadas de la enfermedad se pierde la distribución característica de fibras continuas de la fibronectina, apareciendo en estos estadios en bandas discontinuas, incluso llegando a su pérdida total en regiones en las que el proceso esclerótico es completo ¹⁹⁹. La laminina presenta el efecto contrario, se expresa más en arterias sanas ²⁰² y favorece el mantenimiento del estado contráctil de las SMC ^{197, 203}.

A.5.4.-Proteínas matricelulares

Este término se aplica a un grupo de proteínas extracelulares cuya función es unir proteínas de la matriz con los receptores de la superficie celular, aunque no contribuyen a la integridad estructural de la matriz ²⁰⁴. A ese grupo pertenecen la trombospodina, la tenascina, la osteospodina y la osteonectina. Estas proteínas también se conocen como proteínas antiadhesivas, ya que tienen la propiedad de que las células en cultivo se redondeen y se despeguen de la placa ²⁰⁵.

A.5.4.1.-Trombospodina

Existen cinco proteínas de secreción que forman la familia de las trombospodinas (TSP). La TSP-1 y TSP-2 son homotrímeros unidos por puentes disulfuros con estructuras idénticas. Las TSP-3, TSP-4 y TSP-5 son pentámeros y su expresión es más reducida que las anteriores. La TSP-1 se une a perlecanos, varias integrinas, CD36, plasminogeno, fibrinógeno, fibronectina, urokinasa y TGF- β . Esta proteína promueve la proliferación de células de musculo liso e inhibe la de CE ²⁰⁴. La TSP es muy abundante en las plaquetas y su expresión aumenta aún más cuando éstas se activan.

A.5.4.2.-Tenascina

Las tenascinas constituyen una familia de proteínas formada por 4 miembros: Tenascina-C, -R, -X e -Y ²⁰⁶. Estas proteínas se encuentran formando hexámeros unidos por puentes disulfuro. Cada subunidad constituida por un extremo amino terminal rico en cisteína (por donde se unen las subunidades), varias repeticiones similares a EGF ("EGF-like"), varias repeticiones similares a las de la fibronectina III ("fibronectin type III-like"), y un dominio fibrilar similar al del fibrinógeno. Las tenascinas, dependiendo del tipo célula, intervienen en la estimulación y en la inhibición de la proliferación celular. Inhiben el anclaje de las células a materiales de cultivo, e incluso la unión de la célula con otras proteínas de la matriz, como la fibronectina y la laminina.

A.5.4.3.- Papel de las proteínas matricelulares en los vasos sanguíneos y en la aterosclerosis

Los miembros de la familia de la trombospodina se han visto relacionados con la aterosclerosis y la restenosis ^{207, 208}. Uno de los miembros más estudiados de esta

familia es la TSP-1, que promueve la migración y la proliferación de las SMC. Esta proteína se sobre expresa en las lesiones ateroscleróticas y está involucrada en la hiperplasia íntima ²⁰⁹⁻²¹². Las tenacinas intervienen en la adhesión, migración, diferenciación y proliferación celular. Su expresión en arterias normales es muy baja, pero incrementa en respuestas a roturas de los vasos o procesos patológicos como la atherosclerosis. Así, la tenascina-C se sobre expresa en la hiperplasia intimal y se asocia al fenotipo sintético de las SMC ^{213, 214}. Además, la tenascina-C juega un papel fundamental en la respuesta a factores de crecimiento como el EGF, el FGF y es un efector de las MMP ²¹⁵. Por tanto, las proteínas matricelulares son fundamentales en el desarrollo de la atherosclerosis, influyendo en la hiperplasia intimal, la remodelación vascular y el fenotipo de las SMC ²¹⁶.

A.5.5.-Proteoglicanos

Unos de los componentes más importantes de la ECM y que se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos animales, son los PGs ²¹⁷. Los PGs son macromoléculas constituidas por un núcleo proteico al que se unen covalentemente distintas cadenas de hidratos de carbono sulfatadas denominadas glicosaminoglicanos. Los glicosaminoglicanos son cadenas polianiónicas, de longitud variable, generadas por la repetición de un disacárido, donde un residuo siempre es una hexosamina (D-glucosamina o D-galactosamina) y el otro un ácido hexurónico (D-glucurónico o L-idurónico). Según la naturaleza del disacárido presente se obtienen distintos tipos de glicosaminoglicanos:

- Condroitín sulfatos (CS): (*GlcA-GalN*).
- Dermatán sulfatos (DS): (*GlcA-GalN*) o (*IdoA-GalN*)
- Heparán sulfatos, heparina (HS):(*GlcA-GlcN*) o (*IdoA-GlcN*).
- Keratán sulfatos (KS): (*Gal-GlcN*).

Con excepción del ácido hialurónico, que es el único GAG que se presenta como polisacárido libre sin unión a proteína, todos los GAGs se sintetizan como PGs, es decir, con unión covalente a una proteína. Estos polisacáridos forman estructuras grandes y extendidas, con alta densidad de carga negativa debido a los grupos sulfato y carboxilo de los restos de ácido hexurónico. Algunos PGs contienen distintos tipos de cadenas de GAG, en las que su longitud y la relación entre ellas puede cambiar durante el desarrollo, la edad y en estados patológicos. Los PGs pueden presentar oligosacáridos unidos a la cadena proteica a través de enlaces N- y O-glicosídicos. Los CS, DS, HS y heparina se unen a la proteína a través de un puente Gal-Gal-Xyl-O-serina de la proteína núcleo. La unión de los KS a la proteína núcleo puede ser de tipo O-serina o O-threonina (cartílago) o de tipo N-asparagina (córnea). El núcleo proteico, además del dominio de unión a GAG, puede presentar otros dominios hidrofóbicos que permitan el anclaje del PG a la membrana plasmática u otros dominios específicos de interacción con macromoléculas de la matriz extracelular. Algunas proteínas núcleo se unen a la membrana plasmática a través de un grupo glicosil-fosfatidilinositol (GPI) como en el caso de los glipicanos (HSPGs). Aparte de una función estrictamente mecánica, los dominios intracelulares pueden participar mediando respuestas celulares tales como la reorganización del citoesqueleto de actina o interaccionando con proteínas de señalización intracelular.

La nomenclatura de los PGs es compleja, ya que suelen reconocerse por su nombre trivial (agrecano, decorina, serglicina, etc.) que hace mención a sus características estructurales o funcionales. Se clasifican en tres grupos según su estructura, distribución y función que tengan en la célula (Tabla 2). El primer grupo está constituido por los que se depositan en la ECM (agrecano, versicano, decorina, etc.). En un segundo grupo se incluyen los proteoglicanos anclados a la membrana plasmática (fibroglicano, sindecano, glipicano, etc.). Los proteoglicanos localizados intracelularmente en gránulos secretores (serglicina) constituyen el tercer grupo.

Antecedentes

Nombre	Fuente	Tamaño de la nucleoproteína(KDa)	Cadenas GAG	Función
--------	--------	----------------------------------	-------------	---------

EXTRACELULARES

Familia a: proteoglicanos intersticiales grandes o hialeotanos

Agercano	Cartílago	220	≥100 CS/KS	Soporte mecánico, une ácido hialurónico
Versicano	Fibroblastos	265	10-30 CS/DS	Une ácido hialurónico y leptinas, migración celular

Familia b: proteoglicanos intersticiales pequeños (ricos en leucina)

Decorina	Tejido conetivo	40	1 DS/CS	Fibrogénesis de colágeno, adhesión celular, unión a TGF-β
Biglicano	Tejido conectivo	40	2DC/CS	Adeshión celular
Fibromodulina	Tejido conectivo	42	2-3 KS	Fibrinogénesis de colágeno adhesión celular
Lumicano	Cornea	38	3-4 KS	Fibrinogénesis de colágeno

Familia o: Proteoglicanos de membrana basal

Antecedentes

Perlecano	Membrana basal	457	3HS/CS	Mantenimiento del epitelio y tejidos mesenquimales
Agrina	Unión neuromuscular	250	3HS	Agrega receptores de acetilcolina
Bamacano	Membrana basal	138	3CS	Estabilización de membranas basales

SUPERFICIE CELULAR

Familia d: Proteoglicanos de la superficie celular

Sindecano-1	Epitelio	31	1-3CS/1-2HS	Morfogénesis, adhesión celular
Glipicano	Endotelio	62	3-4HS	Unión a VEGF y anti-trobina III
Trombomodulina	Endotelio	60	1CS	Regula la coagulación
Betaglicano	Fibroblastos	110	1-4CS, HS	Unión a TGF- β
NG2	Células nerviosas	251	2-3CS	Adhesión celular
CD44	Linfocitos y Fibroblastos	32-49	0-5 CS/HS	Une ácido hialurónico

INTRACELULARES

Familia e: Proteoglicanos intracelulares

Serglicina	Plaquetas, Macrófagos, Eosinófilos,	10-19	10-15CS/DS, HS/Heparina	Modula proteasas, Inhibbe la coagulación
------------	-------------------------------------	-------	-------------------------	--

Basófilos

Tabla A.2. Clasificación de proteoglicanos según su estructura, distribución y función celular.

Los PGs participan en la organización de la ECM y son responsables de mantener su hidratación. Una propiedad física de los geles de PGs es que son permeables a solutos de baja masa molecular pero no a macromoléculas, formando barreras de permeabilidad. Además de ser un soporte estructural, las funciones de los proteoglicanos son más amplias, influyendo en procesos celulares como adhesión, motilidad, proliferación, diferenciación y morfogénesis ²¹⁷. Una de las funciones más sobresalientes de este grupo de componentes de la ECM es la de actuar como reservorio de moléculas con actividades biológicas diversas, pudiendo a su vez, controlar la actividad y prolongar la vida media de las mismas. Diferentes factores de crecimiento se asocian con PGs de tipo heparán sulfato ²¹⁸. Este tipo de proteoglicanos interacciona con el FGF a través de los GAG, incrementando la unión de éste a su receptor y su actividad mitogénica ²¹⁹. Otro ejemplo lo constituye el TGF- β , que interacciona con el núcleo proteico del betaglicano y la decorina, inhibiéndose su actividad ²²⁰.

A.5.5.1.- Papel de los proteoglicanos en los vasos sanguíneos y en la aterosclerosis

Los PGs de los vasos sanguíneos mayoritarios son los versicano, la decorina, el biglicano, el lumicano y los perlecanos. Todos los PGs se asocian con otros componentes de la ECM de los vasos. Por ejemplo, la decorina se distribuye junto con las fibras de colágeno y regula el diámetro de las fibras de colágeno y su organización

Antecedentes

²²¹. Los versicanos está presentes en todo el espacio intersticial de la matriz donde no se encuentran los componentes fibrilares de la ECME interacciona con el ácido hialurónico y otras proteínas de unión ^{222, 223}. Los perlecanos se insertan en las membranas basales y proporciona permeabilidad, sirven como sustrato para las células de los vasos y retiene factores de crecimiento ^{224, 225}. Los PGs más abundantes se representan en la Tabla A.3.

Familia (ubicación)	Nombre común	Nucleoproteína (kDa)	Cadenas GAG	Función
intersticiales grandes	Versicano	263	CS(15-17)	Resistencia compresiva
intersticiales pequeños (ricos en leucina)	Decorina	36	1 DS	Organización de colágeno
	Biglicano	38	2DS	Adhesión celular
	Lumicano	35	3-4KS	Organización de colágeno
membrana basal	Perlecano	467	3HS	Unión de factores de crecimiento
membrana celular	Sindecano-1	31	3-5HS/CS	Receptores de MEC, lipasas, factores de crecimiento, citoquinas, enzimas, etc. Adhesión celular
	Fibroglicano	20	3HS	Desarrollo de neuritas
	N-sindecano	35	3HS/CS	Adhesión en contactos focales

Antecedentes

Riudocano	20	3HS	Une VEGF y aumenta su actividad
Glipicano	62	3HS	

TABLA A.3. Algunos de los PGs presentes en la ECM de los vasos sanguíneos.

La distribución de los PGs a través del vaso sanguíneo es variable. Así, la íntima presenta mayor cantidad de PGs que la media y la adventicia ^{221, 226, 227}. Los complejos de versicano, ácido hialurónico y el biglicano son prominentes en la íntima y en la media, y la decorina se concentra en la adventicia que contiene colágeno. El perleciano está presente en las membranas basales de la íntima y de la media. Los PGs también están presentes en la membrana de las células de los vasos sanguíneos. Estos son PGs que presentan un dominio hidrofóbico en la proteína núcleo que les permite el anclaje a la membrana, como el caso de familia de los sindecanos ^{228, 229}. También se encuentran los glipicanos, que se asocian a la membrana a través de un grupo GPI ²³⁰. Los PGs de membrana presentan una variedad de funciones tales como la unión de enzimas que intervienen en el metabolismo de lípidos y en la coagulación sanguínea, unión de factores de crecimiento y citocinas y el anclaje de las células a la ECM.

La SMC es la principal fuente de PGs y de ácido hialurónico, y modulan la síntesis de PGs en los diferentes estadios fenotípicos. Se ha descrito que los PGs aislados de las células musculares lisas en fase de proliferación presentan cadenas de GAGs más largas y unen con mayor afinidad a las LDL que los PGs aislados de células musculares lisas no proliferativas ²³¹. *In vitro*, las células musculares lisas humanas en fase de proliferación, aumentan la síntesis de PGs (sobre todo HS y CS) comparado con las mismas células en estado de quiescencia ^{232, 233}. Además, la síntesis de estas moléculas está regulada de forma diferencial por factores de crecimiento y citoquinas tales como el PDGF, el TGF- β 1 y la IL-1 ²³⁴⁻²³⁶. Así, se ha descrito que el PDGF y el TGF- β

aumentan la síntesis de los versicanos ^{235, 237} y del biglicano ²³⁸ por parte de las células musculares lisas. El PDGF estimula la síntesis de versicanos y ácido hialurónico que forman agregados y facilitan la migración y proliferación de las células musculares lisas ^{239, 240}.

Las CE también varían la expresión de PGs según su estadio fenotípico. Así, cuando las CE se vuelven migratorias, disminuye la síntesis de HS y aumenta la síntesis de DS ²⁴¹. Las células derivadas de la sangre, tales como las plaquetas, mastocitos, linfocitos y monocitos también sintetizan PGs. Los mastocitos sintetizan heparina y la diferenciación de los monocitos a macrófagos también es acompañada de un incremento en la síntesis de HS y CS que contienen un elevado número de grupos sulfato ²⁴².

El contenido y distribución de los PGs de los vasos sanguíneos cambia cuando la ECM de los vasos es remodelada en la hipertensión, diabetes, aterosclerosis y restenosis. En general, la síntesis de PGs y ácido hialurónico aumentan en la fase temprana y media de la enfermedad vascular, y disminuye cuando las lesiones son más avanzadas y fibróticas. No obstante, la ECM se va acumulando, lo que produce una disminución en el diámetro del lumen del vaso. Se observan cambios en la distribución de los diferentes tipos de PGs en el desarrollo de las lesiones ²⁴³ (Tabla 4). Así, en lesiones de primates con hipercolesterolemia se observa un fuerte marcaje de decorina, biglicano, versicano y ácido hialurónico en lesiones intermedias y avanzadas. La decorina se localiza básicamente en regiones ricas en macrófagos ²⁴⁴ y el versicano está presente en áreas en las que prevalecen las células musculares lisas ²⁴⁵. También se observan depósitos de versicano ²⁴⁶ y biglicano ²⁴⁷ en la ECM de vasos sanguíneos humanos en restenosis.

Los depósitos de PGs se distribuyen de forma similar a algunos factores de crecimiento, lo cual sugiere una interrelación entre ellos. Así, la decorina y el biglicano colocalizan con el TGF- β 1 en la región rica en macrófagos mientras que el versicano y el ácido hialurónico son abundantes en la ECM de las células que producen PDGF y TGF- β 1 ²⁴⁵. En lesiones avanzadas, el perlecano aumenta su expresión en la neointima,

donde presenta un papel inhibitorio de la proliferación de las SMC inducida por el PDGF entre otros factores ²⁴⁸. Se ha descrito también que los PGs de superficie celular: el sindecano-1 y el sindecano-4 aumentan en la lesión vascular ²⁴⁹. A nivel molecular, se han descrito cambios relacionados con la edad en la estructura de los HS de la aorta humana.

	Capa media normal		Aterosclerosis	
		SMC	Macrófagos	Cubierta fibrosa
Porteoglicano				
Biglicano	++	+++	+	+
Decorina	++	+	+++	+
Glipicano	+	-	-	-
Ácido hialurónico	+	+++	+++	+++
Perlecano	++	+++	++	+
Sindecano	+	+	-	
Versicano	++	+++	-	+++

Tabla A.4. Perfil de expresión de algunos de los PGs más importantes en los vasos, durante la aterosclerosis.

Los cambios en la ECM afectan a la permeabilidad de los vasos sanguíneos ya que se crea una red con cargas negativas que interaccionan con macromoléculas como las lipoproteínas y que provocan su acumulación en los vasos sanguíneos. Además, se observa que los PGs de la ECM de los vasos sanguíneos tienen un papel de vital importancia en la retención de las lipoproteínas ^{250, 251}. El biglicano es el PG que presenta mayor colocalización con las Apo-E, A-I y B ²⁵². Se ha descrito que aumentos en la longitud de las cadenas de GAGs y el grado de sulfatación incrementan la interacción de los PGs con las lipoproteínas ²³¹. Así, estudios *in vitro* indican que el

versicano, que contiene largas cadenas de GAGs, presenta mayor afinidad por la LDL (mayor número de sitios de unión) que la decorina y el biglicano ²⁵³. Los complejos de lipoproteínas y PGs son internalizados por macrófagos ²⁵⁴ y SMC ²⁵⁵ lo que permite su transformación en células espumosas que contribuyen a la evolución de la lesión.

Algunos PGs pueden servir como agentes protectores de la aterosclerosis y trombosis. Por ejemplo, algunas formas de heparina, el HS y DS son potentes anticoagulantes y previenen la generación de fibrina y por tanto el desarrollo de la trombosis. De esta manera, se han utilizado terapéuticamente en la prevención de la trombosis y la embolia ^{256, 257}. También se ha descrito que la heparina ²²¹ y los HS ²⁵⁸ bloquean la migración y proliferación de las células musculares lisas en la formación de la neoíntima que aparece después de la angioplastia en modelos experimentales con animales. Los cambios en la ECM de los vasos pueden a su vez generar cambios fenotípicos en las células que forman parte de estos vasos, ya sea promoviendo la desadhesión de las células de la ECM, favoreciendo que las células puedan migrar y proliferar, induciendo la unión de las células a otras proteínas de la ECM ^{239, 240}.

A.6.-Remodelación de la ECM

La remodelación de la ECM tiene lugar durante todas las fases de la aterosclerosis humana. Para que la placa ateromatosa evolucione es necesario que se produzca una modificación de la ECM; este proceso está regulado por la síntesis y la degradación de los componentes que la constituyen, lo que permite la migración celular y la remodelación tisular. La inestabilidad de la placa se pone de manifiesto por la ulceración de la cubierta fibrosa, la rotura de la placa o una hemorragia intraplaca y es la responsable de los síntomas clínicos de la angina inestable, el infarto de miocardio y los accidentes cerebrovasculares ²⁵⁹. En el desarrollo de la lesión aterosclerótica, que puede durar décadas, están implicados la infiltración de células

inflamatorias, la migración de células musculares lisas, el grosor de la íntima, un acumulo de componentes de la ECM, la formación de una cubierta fibrosa y la angiogénesis ⁹.

A.6.1-Metaloproteasas (MMPs)

Las células vasculares producen enzimas de la familia de las MMPs, que juegan un papel crucial en la remodelación vascular durante el desarrollo, el crecimiento y en los procesos patológicos ^{260, 261}. Estos enzimas pueden degradar la mayoría de componentes de la ECM. Además, tienen un papel importante en la activación y procesamiento de citoquinas o factores de crecimiento ²⁶², en la exposición de receptores de membrana ²⁶³, en la liberación del ligando Fas ²⁶⁴ o en la inactivación del TNF- α ²⁶⁵. La familia de las MMPs está formado por más de 20 metaloendopeptidasas Zn^{2+} - Ca^{2+} dependientes, que poseen una actividad catalítica sobre componentes de la ECM²⁶⁶. Estos enzimas comparten una estructura común, formada por los siguientes dominios:

- ***Péptido señal:*** es la secuencia responsable de la secreción de la molécula, no está presente en la forma inactiva del enzima.

- ***Dominio proteolítico o catalítico:*** contiene 2 iones de zinc y al menos un ion de calcio. Uno de los Zn^{2+} está presente en el centro activo y está implicado en el proceso catalítico de las MMPs. El segundo ion de Zn^{2+} , también denominado zinc estructural, y el ion de calcio están presentes en el dominio catalítico a unos 12 Å del zinc catalítico. El zinc catalítico es esencial para la actividad proteolítica de las MMPs, por lo que está conservado en todas las MMPs. Además del Zn^{2+} , en el centro activo existen tres residuos de histidina, fundamentales para la función de la proteína, y que también están muy conservados. Menos conocido es el papel del segundo ion de zinc y el del ion de calcio.

- **Dominio propéptido:** este dominio consiste en 80-90 aminoácidos que contienen un residuo de cisteína el cual interactúa con el átomo de zinc del dominio catalítico a través de un grupo tiol. En este dominio hay una secuencia altamente conservada (PRCGXPD). La proteólisis de este pro-péptido da como resultado la activación del zimógeno. La activación puede darse por la acción de enzimas proteolíticas, agentes mercuriales o el calor ²⁶⁷⁻²⁶⁹.

- **Dominio hemopexina/vitronectina:** está altamente conservado y muestra una secuencia similar a la proteína plasmática hemopexina. Se ha demostrado que este dominio juega un papel funcional en la unión al sustrato y/o en las interacciones con los reguladores específicos de las MMP, los "TIMPs".

Las MMPs se clasifican en los siguientes subgrupos (Tabla A.5): Colagenasas, gelatinasas, estreptomelisinias, y MMPs de membrana.

Subgrupo	Nombre común	Nº de MMP	Peso molecular(KDa)		Sustrato
			Latente	activa	
Colagenasas	Colagenasa intersticial	1	55	45	Colágenos I, II, III, VII, VIII, X. Agrecano, gelatina, proteoglicanos unidos a proteínas, α 2- macroglobulina, MMP-2, MMP9 .
	Colagenasa de neutrófilo	8	75	58	Colágenos I, II, III, V, VII, VIII, X. Agrecano, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, α 2-aminoplasmina.
	Colagenasa 3	13	60	48	Colágenos I, II, III, IV, IX, X, XIV. Agrecano, gelatina, PAI-2,

Antecedentes

					perlecano, fibronectina, MMP-9
Gelatinasas	Gelatinasa A	2	72	66	Colágenos I, II, III, IV, V, VII, X, XI, XIV. Gelatina, agrecano, elastina, fibronectina, laminina, decorina, PGs unidos a proteínas, osteonectina, MMP-1, 9 y 13.
	Gelatinasa B	9	92	85	Colágenos VI, V, VII, X, XIV. Gelatina, agrecano, elastina, fibronectina, Osteonectina y plasminógeno.
Estromelisinina	Estromelisinina1	3	57	45	Colágenos II, III, IV, V, IX, X, XI. Agrecano, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, antitrombina, MMP-7, 8, 9 y 13
	Estromelisinina2	10	57	44	Colágenos III, IV, V. Agrecano, elastina, fibronectina, gelatina, caseína, laminina, MMP-1 y 8.
	Estromelisinina3	11	51	44	α 2- macroglobulina, caseína, agrecano, fibronectina, laminina.
MMPs de membrana	MT1-MMP	14	66	56	Colágenos I, II, III, IV. Agrecano, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, vitronectina, α 2-

Antecedentes

					macroglobulina, MMP-2 y 13.
	MT2-MMP	15	72	60	Colágenos I, III, IV. Fibronectina, gelatina, agregano, perlecano, tenascina, MMP-2.
	MT3-MMP	16	64	52	Colágenos I, III, IV. Gelatina, caseína, fibronectina, MMP-2.
	MT4-MMP	17	57	53	Colágeno IV. Gelatina.
	MT5-MMP	24	63	28	PGs
	MT6-MMP, Leucolisina	25	34	28	Gelatina, MMP-2.
Otras	Matrilisina	7	28	19	Colágenos IV y X. Agregano, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, decorina, MMP-1 ,2 y 9.
	Metaloproteasa de macrófagos	12	54	45	Gelatina, laminina, fibronectina, elastina, caseína, fibrina, fibrinógeno, plasminógeno.
	RASI-1				

Antecedentes

	19	54	45	Gelatina.
Enamelisina				
	20	54	22	Amelogenina
Endometasa humana				
	23			Gelatina

Tabla A.5. Clasificación de las MMPs.

En conjunto tienen la capacidad de degradar todos los componentes de la pared arterial y además juegan un papel importante en los sucesos fisiológicos y patológicos que dan lugar a la degradación de la ECM. Con excepción de la MMP-11, todas la demás MMPs son solubles y se secretan como zimógenos inactivos, siendo la activación uno de los puntos más importantes en su regulación.

En tejidos no lesionados se detecta una actividad muy baja de MMPs. Su expresión está regulada transcripcionalmente por citoquinas inflamatorias, factores de transformación celular, hormonas y factores de crecimiento. Su actividad está regulada a tres niveles: inducción de la expresión, activación de las formas latentes y regulación por inhibidores endógenos. En las formas zimógenas secretadas, el pro-dominio (N-terminal) se pliega de forma que la cisteína interactúa con el zinc catalítico y actúa como escudo del centro catalítico. Esta conformación se mantiene gracias a las interacciones tiol entre los residuos de cisteína del prodominio y el átomo de zinc presente en el centro catalítico de todas las MMPs. La activación de los proenzimas se produce de forma secuencial como se muestra en la siguiente figura.

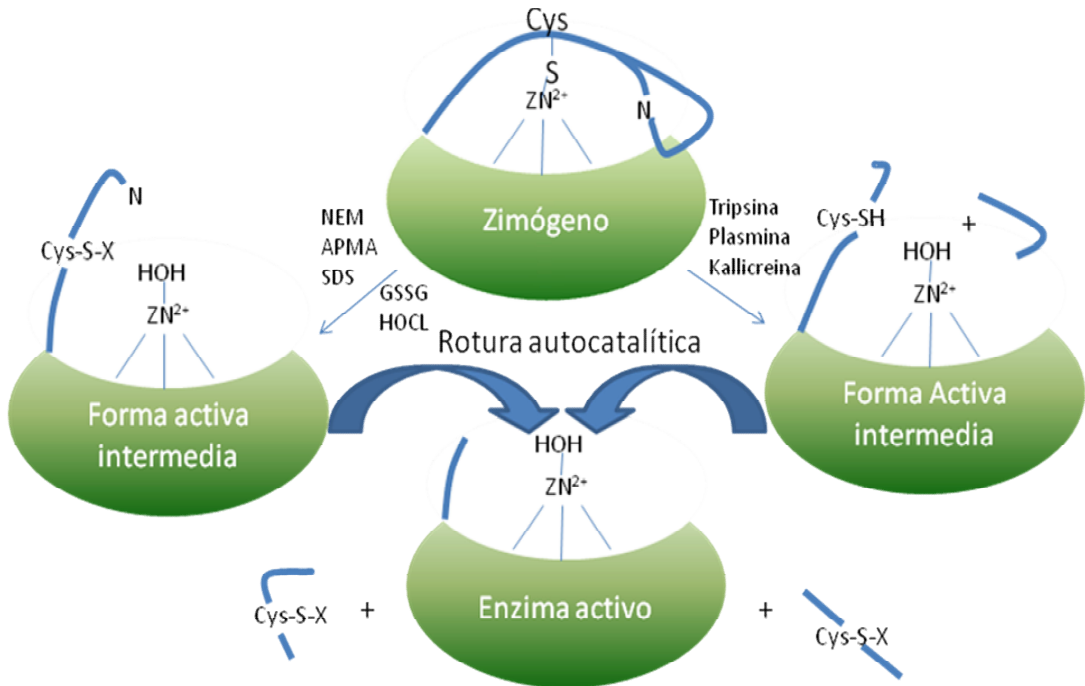


Figura A.12. Activación de las pro-MMPs.

Se puede producir una activación parcial cuando el prodominio es atrapado por otras proteasas como la plasmina, tripsina, callicreina, triptasa, quimasa y algunas MMPs ²⁷⁰, o cuando la unión entre la cisteína y el zinc es interrumpida por componentes no proteolíticos como agentes reactivos del tiol y desnaturalizantes o por tratamiento con calor ²⁷¹. Esta activación parcial induce cambios conformacionales que inducen la susceptibilidad del enzima para la rotura autocatalítica ²⁷². Existen otros mecanismos en los que se produce una cascada de activación proteolítica entre las distintas MMPs y otras proteasas, que son mucho más complejos.

Además de su activación proteolítica, las MMPs se regulan por inhibidores específicos, los TIMPs. La expresión de los TIMPs en los tejidos también se controla durante la remodelación para mantener el balance en el metabolismo de la matriz extracelular. La rotura de este equilibrio induce un descontrol en la organización de la

matriz que produce patologías (artritis, cáncer, enfermedad cardiovascular, nefritis, desordenes neurológicos, ulceración y fibrosis de tejidos) ²⁷³.

A.6.1.1.-Papel de las MMPs en la aterosclerosis

Las CE activadas expresan moléculas de adhesión como VCAM-1 que promueven la infiltración de monocitos circulantes y de linfocitos T. La adhesión de linfocitos T a las CE a través de receptor VCAM-1 induce la producción de MMP-2. Esta metaloproteasa facilita la degradación de la ECM, que es necesaria para la migración a través de la capa endotelial y la membrana basal de los linfocitos T y de los monocitos ²⁷⁴. Durante la migración de los monocitos su interacción con los componentes de la ECM, especialmente con el colágeno tipo I, predominante en la pared arterial normal ²⁷⁵, también estimula la degradación de esta matriz. El contacto con colágeno tipo I ²⁷⁶ y la laminina incrementa la expresión de MMP-9 por estas células. La interacción de los monocitos con el colágeno tipo I también induce la proteólisis favoreciendo la producción de superóxido ²⁷⁷ y la secreción de IL-1 que puede activar a la pro-MMP-2 y 9 producidas por las células musculares ²⁷⁸ e incrementar la producción de MMP-9, 1 y 3 las SMC. Aunque no se conoce claramente como la composición de la matriz induce la producción de MMPs, sí se sabe que es necesaria la presencia de MMPs para que se produzca la infiltración de monocitos y linfocitos T a través de la matriz durante el desarrollo de la placa aterosclerótica. El papel de las MMPs en la migración desde la media a la íntima de las SMC y su proliferación es importante, ya que éstas degradan la ECM que rodea a las células y la membrana basal que separa la media de la íntima. La interrelación de estos dos procesos se ha estudiado tanto "in vitro" como "in vivo". En estudios "in vitro" llevados a cabo con cultivos de SMC estimuladas con IL-1 o TNF- α ²⁷⁹, se observa que hay un incremento de la secreción y de la actividad de la MMP-1, 3 y 9. La MMP-2, es sintetizada por estas células, tanto antes como después de ser estimuladas y su concentración no se ve alterada por el estímulo. Sin embargo, aunque

la concentración de MMP-2 no se incrementa después del estímulo con IL-1 o TNF- α , aparece una forma con un peso molecular menor y más activa después del estímulo ²⁸⁰. Estos estudios demuestran que la invasión de las células musculares lisas a través de la membrana basal depende de la producción de MMP-2 y puede ser inhibida por los inhibidores de esta proteína.

Estudios "in vivo" también ponen de manifiesto la conexión entre el sistema MMPs y el proceso aterosclerótico. Se han utilizado principalmente modelos en ratas a las que se les producía lesión en carótida ²⁸¹. En algunos de estos trabajos, se estudia el papel que juegan el sistema plasminógeno/plasmina y el sistema de MMP en la formación de neointima, después de inducir una lesión vascular que degrada la ECM y permite la migración de células musculares lisas ²⁸². En estos modelos se pone de manifiesto un incremento de la actividad de MMP-9, 2 y 3 durante el periodo de migración y proliferación de células musculares lisas ²⁸³. El efecto de la lesión sobre los TIMPs es menos claro. Se aprecian incrementos de TIMP-2 por algunos autores ²⁸⁴ y otros sin embargo no aprecian cambios en TIMP-1, 2 o 3 ²⁸³.

La expresión de mRNA para MT1-MMP, tanto en modelos de rata como de conejo se ha visto que coincide con la activación de MMP-2 en neointima ²⁸⁵, sugiriendo el papel activador que ejerce MT1-MMP sobre MMP-2 en la fase de engrosamiento de la íntima. Concentraciones elevadas de trombina a nivel local, como las que se producen por la adhesión plaquetar y la activación de la cascada de la coagulación después de la lesión vascular, pueden provocar una activación de la proMMP-2 ²⁸⁶. En modelos de rata a las que se le induce una lesión en carótida, los incrementos de los niveles de PAI-1 y TIMP-2 sugieren cambios en el balance proteolítico que puede jugar un papel importante en la migración de las células musculares lisas, después del daño arterial ²⁸⁴. Esto vendría reforzado por la observación de que la migración de las células musculares lisas, estaría inhibida por la administración de un inhibidor de la plasmina como es el ácido traxenámico ²⁸⁷. Para la migración de las células musculares lisas, en este modelo se necesita la presencia de

activadores del plasminógeno, MMP-2, MMP-9, bFGF y PDGF. La migración inducida por PDGF se ha demostrado que depende de la presencia de MMP-2, y la inducida por FGF de MMP-2 y MMP-9 ²⁸⁸. Otros estudios con el mismo modelo sugieren que la MMP-2 facilitaría la migración de células musculares lisas de la media a la íntima, pero no la proliferación ²⁸¹. Estudios realizados con aortas humanas con lesión aterosclerótica ponen de manifiesto que la reacción inflamatoria del vaso, determinada por la expresión de Cox-2 (ciclooxigenasa-2), puede influenciar la remodelación de la ECM coactivando las MMPs y facilitando el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis ²⁸⁹.

A.7.- Rutas de señalización implicadas en la aterosclerosis

A.7.1.-Vía del mevalonato y proteínas G de membrana

A.7.1.1.-Ruta biosintética del mevalonato

La mayor parte del colesterol transportado en plasma, procede de la síntesis a nivel hepático. La síntesis de colesterol a partir de acetil-CoA se produce a través de un gran número reacciones enzimáticas en la denominada vía del mevalonato. Entre estas reacciones destaca la conversión del HMG-CoA a mevalonato, reacción catalizada por el enzima HMG-CoA reductasa ²⁹⁰(Fig. 10). Este enzima es clave en esta ruta biosintética, ya que es el principal regulador de la vía mediante un mecanismo de retroalimentación negativa. El aumento de colesterol intracelular inhibe la HMG-CoA reductasa, lo que hace que se reduzca su síntesis. Además del colesterol, existen otros productos de la vía como la ubiquinona, el dolicol, el farnesilpírofosfato y el geranilgeranilpírofosfato que son necesarios para la activación de las proteínas farnesiladas y geranilgeraniladas, y la isopentenil adenosina. Estos productos de la vía son esenciales para la célula y su síntesis se ve afectada por la regulación de la HMG-CoA reductasa.

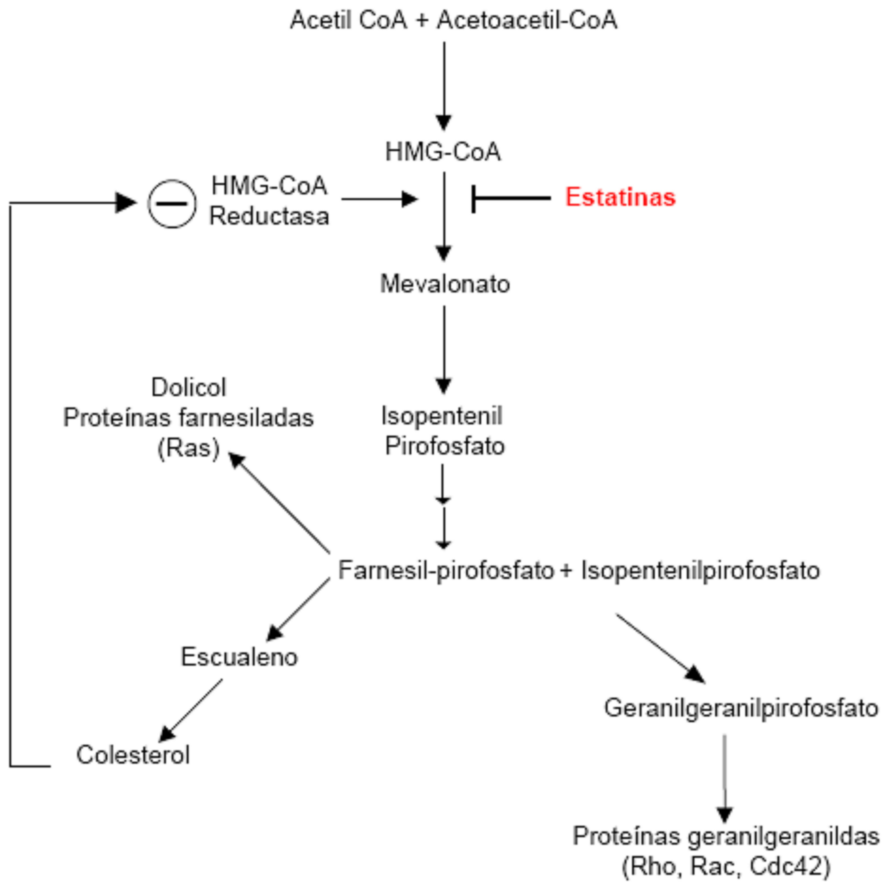


Figura A.13. Ruta biosintética del mevalonato. Síntesis de colesterol e isoprenoides. Inhibición de la HMG-CoA reductasa por estatinas y colesterol.

A.7.1.2.-Proteínas Isopreniladas: GTPasas pequeñas (Ras, Rho).

La superfamilia de las GTPasas pequeñas Ras está formada por más de 150 miembros con una estructura y función conservados durante la evolución ²⁹¹. Según su secuencia y su función se subdividen en las subfamilias Ras (p21Ras clásicas), Rho, Arf (factor de ribosilación de ADP), Ran y Rab. Estas proteínas juegan un papel

fundamental en las vías de señalización que controlan la proliferación, la apoptosis, la adhesión a la matriz y la migración celular ²⁹²⁻²⁹⁵. Dada la importancia de estos procesos en la fisiología y el desarrollo normal del organismo, la desregulación de las vías en las que están involucradas estas proteínas desencadena en multitud de procesos patológicos, como el cáncer ²⁹⁶, el retraso mental ²⁹⁷, y la aterosclerosis ²⁹⁸.

Estas proteínas presentan un estado activo unidas a GTP, y uno inactivo unidas a GDP. De este modo actúan como "interruptores" moleculares para controlar procesos celulares complejos ²⁹⁹. Todos los miembros de las familias de proteínas G presentan una gran homología, especialmente en su extremo amino terminal. El extremo carboxilo es muy diferente y representa la región hipervariable de estas proteínas ³⁰⁰.

A.7.1.2.1-Regulación de la activación de proteínas G

El estado de activación de las proteínas G está regulado por tres proteínas, que son:

- GEF (*Guanine nucleotide Exchange Factor*): factor de intercambio de nucleótido guanina. Esta proteína cataliza el intercambio de nucleótidos GDP por GTP. Se conocen alrededor de 69 GEFs en mamíferos, que son los responsables directos de la activación de estas proteínas en respuesta a diferentes estímulos extracelulares ³⁰¹.
- GAP (*GTPase-Activating Protein*): proteína que activa la capacidad intrínseca de estas proteínas para hidrolizar GTP. Actualmente se conocen 70 proteínas GAPs en mamíferos.
- GDI (*Guanine nucleotide exchange Inhibitor*): Inhibidor del intercambio de nucleótido guanina. Impide que se produzca el intercambio GDP/GTP y también el traslado de la proteína a membrana. Se han encontrado 4 GDIs en mamíferos.

En una situación general, en células no estimuladas, la mayoría de proteínas G se encuentran distribuidas en el citoplasma unidas a GDI. Cuando se estimula la célula, la proteína se separa de GDI, requisito indispensable para translocarse a la membrana ³⁰² y activarse gracias a la acción de GEF, que cataliza el intercambio entre GDP-GTP. Unido a GTP la proteína es activa y capaz de interactuar con sus efectores transmitiendo la señal. Cuando interviene GAP, se pone en marcha la actividad hidrolasa intrínseca de estas proteínas, obteniendo el estado unido GDP inactivo (figura A.14).

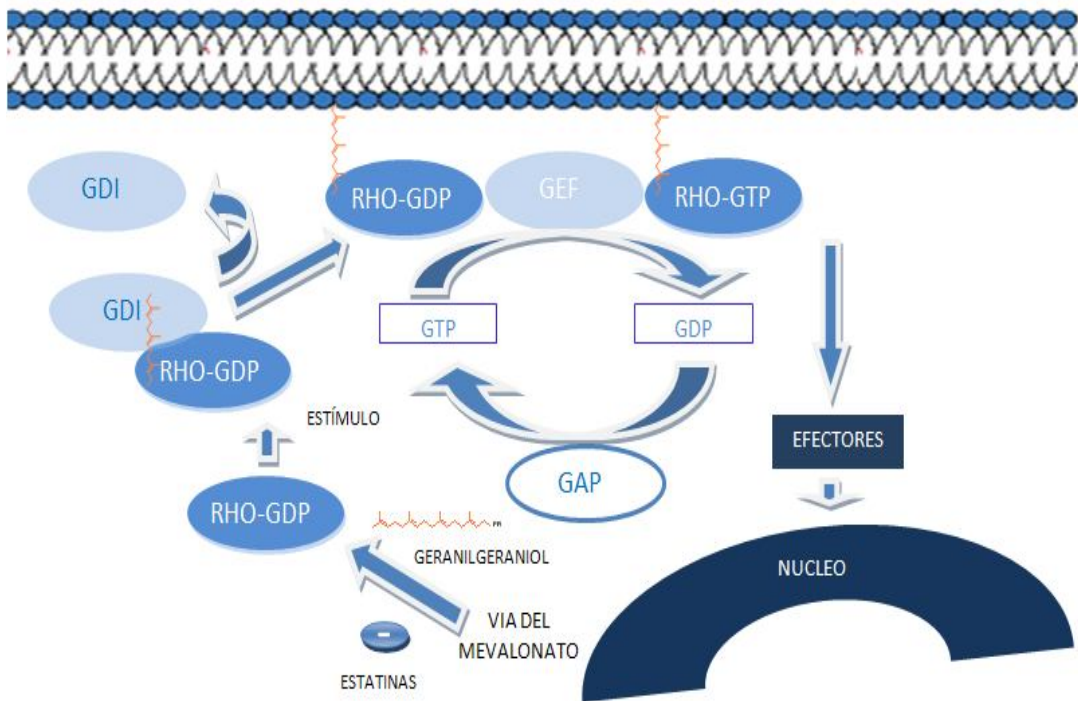


Figura A.14. Esquema de la activación e inactivación de Rho.

A.7.1.2.2.-Modificaciones lipídicas y localización subcelular.

Las proteínas Ras de mamíferos están localizadas en la cara interna de la membrana plasmática como homodímeros o heterodímeros ³⁰³. Para la unión de estas proteínas a la membrana son necesarias una serie de señales moleculares que determinan la ruta por la cual se ancla en la membrana y su localización en islotes lipídicos (*rafts* o caveolas, regiones ricas en colesterol) o en zonas desorganizadas de la membrana ³⁰⁴. Los miembros de esta superfamilia presentan un motivo carboxilo terminal CAAX (donde la Cys-186 va seguida de dos residuos alifáticos y un aminoácido aleatorio), conocido como motivo de isoprenilación. Esta secuencia es una señal para preniltransferasas, que añaden un grupo prenilo (farnesilo en el caso de proteínas p21, Ras o geranilgeranilo en el caso de proteínas Rho), facilitándose así el anclaje de la proteína Ras a la membrana. Posteriormente, se produce una rotura proteolítica de los residuos AAX y una carboxi-metilación del extremo C-terminal ³⁰⁵. Estas modificaciones aumentan la hidrofobicidad del extremo carboxilo de la proteína, aunque son insuficientes para el anclaje funcional a la membrana ³⁰⁴. Para ello es necesaria una segunda transformación en el extremo C-terminal, como S-acilación (palmitoilación) en H-Ras, N-Ras y K-Ras4A en residuos de cisteína de la región heterogénea, o la unión de una cola polibásica rica en lisina en el caso de K-Ras4B. La cadena de grupos S-acilo aumenta la hidrofobicidad de la proteína y confieren una unión estrecha a la membrana ^{304, 306} (figura A.15).

La palmitoilación de H-Ras y N-Ras permite su transporte hacia la membrana plasmática a través del aparato de Golgi ^{307, 308}. Sin embargo, el segmento carboxilo terminal polibásico enriquecido en lisina de K-Ras4B probablemente interacciona electrostáticamente con fosfolípidos ³⁰⁹ y dirige su transporte a la membrana mediante la unión con microtúbulos ^{307, 310}. Por otro lado, la localización de Ras en la membrana también depende de estas modificaciones postraduccionales. Así, se sabe que H-Ras está localizada en islotes lipídicos, mientras que K-Ras se localiza en zonas desorganizadas de la membrana ^{311, 312}. Esta localización puede regular la proximidad de diferentes tipos de receptores y de GEFs, provocando que existan diferencias en la susceptibilidad de activación por distintos estímulos. Además, en caso de estimulación

por factores de crecimiento, la diferente localización también determina la activación de distintos efectores. Por ejemplo, se ha observado que la localización de H-Ras en islotes lipídicos es esencial para la activación de efectores como Raf 1 y PI3K ^{312, 313} (figura A15).

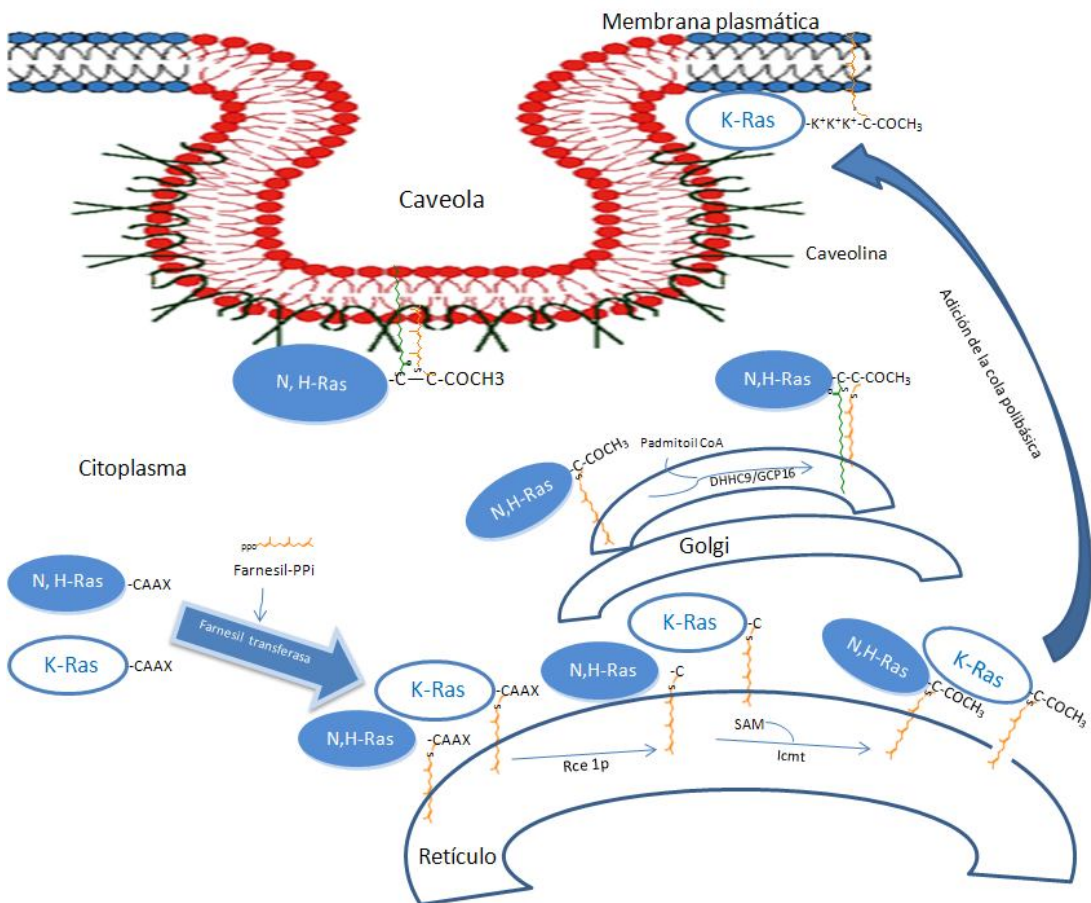


Figura A.15. Modificaciones postraduccionales y transporte de Ras a la membrana. El procesamiento del motivo carboxilo terminal CAAX de Ras es un proceso secuencial. En el citosol la farnesiltransferasa añade un grupo farnesilo (farnesil-PPI) a la cisteína 186. El procesamiento prosigue en el retículo, donde los enzimas Rce1 (“Ras converting enzyme”) e Icmt (“isoprenylcysteine carboxyl methyltransferase”) eliminan el tripeptido AAX y metilan la

cisteína con S-adenosilmetionina (SAM), respectivamente. K-Ras4B sale del retículo y se le unen una serie de residuos de lisina, que le confieren carga positiva, lo que le confiere la capacidad de unirse a la membrana mediante interacciones electrostáticas con fosfolípidos. H-Ras y N-Ras, se palmitoilan con palmitoil CoA (palm-CoA) en uno o dos residuos de cisteína (próximos a la Cys186) por las palmitoiltransferasa DHHC9 y GCP16 en el Golgi. Tras esto se transportan por vesículas a la membrana.

Estas modificaciones “postprenilación” son necesarias para la correcta localización de proteínas de la familia Ras, pero no en el caso de las proteínas Rho ³¹⁴. Existen proteínas de la familia Rho que no son geranilgeraniladas, sino que como en el caso de RhoB pueden sufrir las dos modificaciones lipídicas o ser farnesiladas como en el caso de TC10 y RhoD ³¹⁵.

A.7.1.2.3.- Subfamilia Ras.

Esta subfamilia está compuesta por 36 proto-oncogenes que codifican proteínas GTPasas pequeñas ³¹⁶. Los genes *ras* se descubrieron en los años 60 como elementos de virus que producían sarcomas en roedores recién nacidos ^{317, 318}. Los genes codificantes de los distintos miembros de la familia Ras están muy conservados evolutivamente, lo que sugiere que estas proteínas son muy importantes en los procesos celulares. En mamíferos hay tres genes cuya estructura y función es muy parecida: H-ras, K-ras y N-ras. Están compuestos por cinco exones codificantes y un exón 5' no codificante, y difieren en el tamaño y en la secuencia de intrones. Los genes K-ras tienen dos alternativas de ajuste para el cuarto exón codificante: 4A y 4B, dando lugar a dos proteínas que difieren en 25 aminoácidos del extremo carboxilo terminal ^{300, 316}. Los genes *ras* se expresan en todos los tipos celulares y órganos, aunque existen diferencias en cuanto a expresión pre- y postnatal, y en ciertos tejidos adultos se

expresan preferentemente uno u otro miembro de la familia. Así, *H-ras* se expresa mayoritariamente en cerebro, músculo y piel; *K-ras* se expresa mayoritariamente en estómago, pulmón y timo; y *N-ras* se expresa mayoritariamente en testículos y timo.

Los genes *ras* codifican proteínas de 189 aminoácidos (N-Ras y H-Ras) y 188 aminoácidos, (K-Ras4B y K-Ras4A). Las proteínas Ras tienen un alto grado de homología en sus primeros 164 aminoácidos, siendo idénticas en los primeros 86 aminoácidos y con un 79% de homología en los 78 residuos restantes. Sin embargo, entre los aminoácidos 165 y 185 (región heterogénea) son completamente, a excepción de la Cys186³¹⁹. Estas proteínas presentan dos regiones importantes para su activación y su función llamadas: "*switch I*" y "*switch II*", con residuos hidrofílicos localizados en la cara externa de la molécula³²⁰. El *switch I*, aminoácidos 32-40, es el principal sitio de unión del efector y también es el responsable, en parte, de la interacción con GAPs. El *switch II*, aminoácidos 60-72, se encarga en parte de la interacción con los GEFs. Las regiones switch están cercanas al fosfato y del GTP y exhiben distintas conformaciones según estén unidas a GTP o GDP. De este modo, los cambios conformacionales de estas regiones están implicados en la unión a las proteínas reguladoras y en la transmisión de la señal a los efectores de Ras³²¹.

A diferencia de las proteínas Rho y Rab, las GTPasas Ras no se unen a GDI, y no depende de geraniltransferasas en su unión a membrana sino de farnesiltransferasas³²².

[A.7.1.2.3.1.-Vías de señalización de Ras](#)

Las proteínas Ras son nodulos de activación en respuesta a estímulos. Las Ras activas interactúan con múltiples efectores, los cuales regulan las respuestas citoplasmáticas que controlan la expresión génica, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia de la célula³²³ (figura A.16).

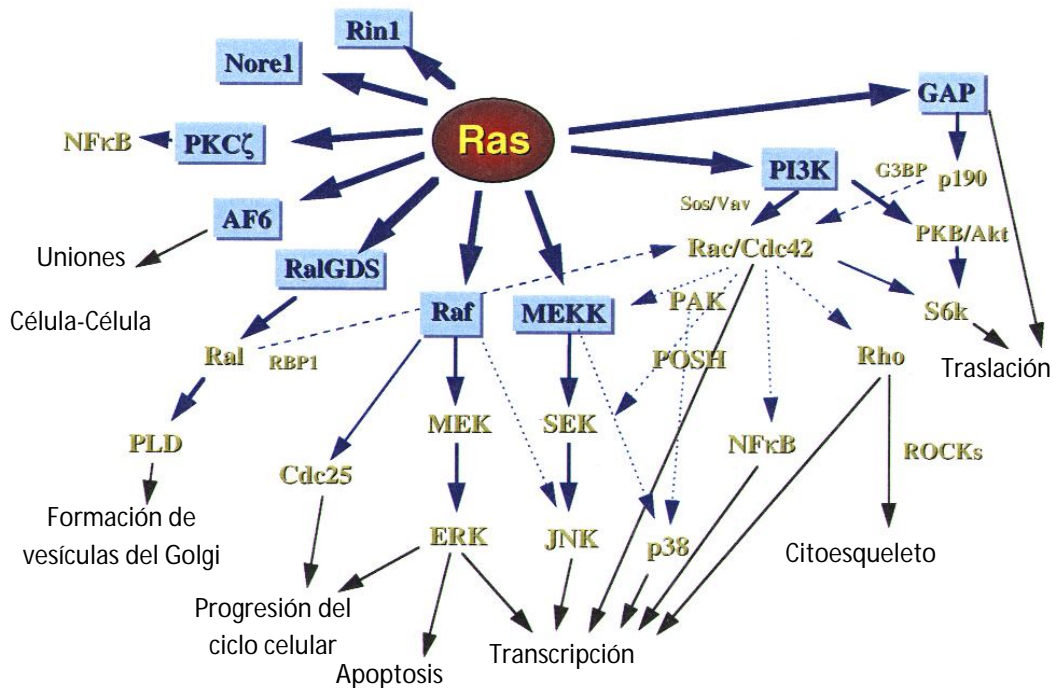


Figura A.16. Efectores de Ras.

Dentro de estas vías de activación mediadas por Ras, los efectores más importantes son la proteína quinasa Raf y la proteína-inositol-3 quinasa (PI3K).

A.6.1.2.3.1.1-Cascada MAPKs (mitogen activator protein kinases)

Las proteínas kinasas de la familia Raf, son los primeros efectores de Ras identificados en células de mamíferos. Ras-GTP se une al efector citoplasmático clásico de Ras, Raf-1³²⁴, y lo trasloca a la membrana plasmática, donde Raf se activa por un mecanismo que parece independiente de Ras³²⁵ (figura A.17). Raf activado fosforila MEK1 y MEK2, que a su vez fosforilan ERK1 y ERK2. La fosforilación de ERK1 y 2 promueve su homodimerización y su translocación al núcleo, donde activa por

fosforilación directa la transcripción de factores como Elk-1. La activación de la kinasa Raf es necesaria y suficiente para la activación de la cascada de kinasas MEK y ERK iniciada por Ras ³²⁶, constituyendo una de las vías clave de señalización a través de la cual Ras ejerce su efecto proliferativo.

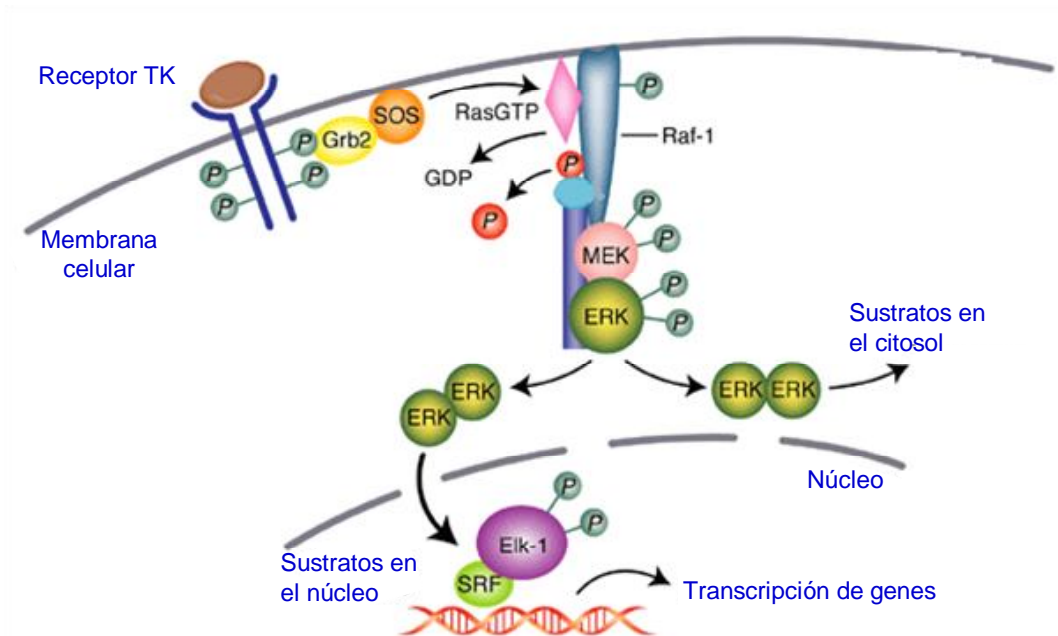


Figura A.17. Esquema de la organización de la cascada Ras-MAPS.

A.6.1.2.3.1.2-Cascada de PI3K

Otro de los efectores mejor conocidos de Ras es la kinasa lipídica PI3K, que cataliza específicamente la fosforilación en la posición 3 del proteína-inositol (PI) en

presencia de numerosos factores de crecimiento y citoquinas ³²¹. Esta enzima está constituida por las subunidades p110, con actividad catalítica, y p85, con actividad reguladora. En respuesta a estímulos, la subunidad reguladora p85 de PI3K es reclutada en la membrana plasmática, donde interacciona directamente con residuos de tirosina fosforilados ³²⁷ (figura A.18). La subunidad catalítica p110 media la generación de PIP₂ e IP₃. Ras se une directamente y activa la subunidad p110 de manera GTP dependiente ³²⁸, dando niveles elevados de IP₃ y PIP₂. Estos productos lipídicos intervienen como segundos mensajeros en vías que controlan la síntesis de ADN, la inhibición de la apoptosis, el tráfico intracelular y secreción de vesículas, y los cambios metabólicos a través de la fosforilación de dos proteína kinasas: Akt y p70^{S6K}. La unión de IP₃ a Akt recluta a esta kinasa a la membrana, donde es fosforilada por las kinasas PDK1 y 2.

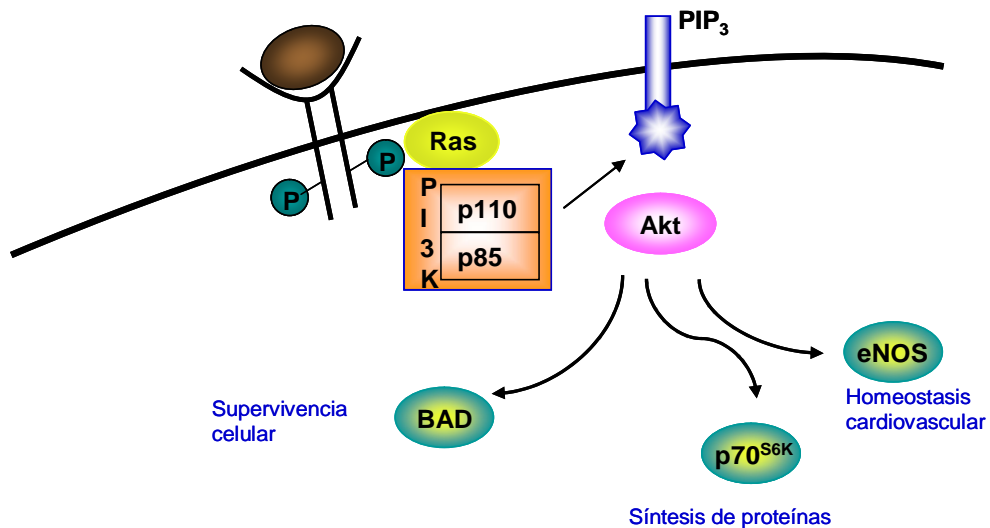


Figura A.18. Esquema de la organización de la cascada Ras-PI3K-Akt/PKB.

La vía PI3K/Akt controla diversos procesos celulares entre los que se encuentra la estimulación de la supervivencia celular ³²⁹. Akt es una serina-treonina

quinasa con un dominio quinasa amino terminal y un dominio regulador carboxilo terminal. Para la completa activación de la proteína es necesaria la fosforilación de los residuos treonina 308 en el dominio quinasa, y serina 473 en el dominio carboxilo terminal ³³⁰. Para una máxima activación es necesaria una segunda fosforilación en el residuo serina 473. Esta última fosforilación se desconoce quién la lleva a cabo, pudiendo ser PDK1 o un proceso de autofosforilación del propio Akt ³³¹. Tras su activación, Akt puede fosforilar un gran número de sustratos, tanto en el citoplasma como en el núcleo, relacionados con la regulación de funciones celulares que incluyen el crecimiento celular, la supervivencia, el metabolismo de la glucosa y la traducción de proteínas ³³².

[A.7.1.2.3.2.-Papel de estas rutas de señalización en las células vasculares](#)

Muchas de las vías de transducción de señales producidas por estímulos extracelulares en las células vasculares convergen en las proteínas Ras. Así, factores aterogénicos tan importantes como el PDGF, TGF- β , VEGF y FGF ejercen su función a través de las vías de activación de Ras ^{291, 333-336}. De todos ellos, el mecanismo mejor caracterizado es PDGF. Este factor de crecimiento a través de su receptor activa a Ras, que traduce la señal a través de la cascada de MAPKs hasta ERK que se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes involucrados en el crecimiento como *c-jun* y *c-fos*. PDGF activa también la ruta de PI3K, que a su vez regula a otras GTPasas pequeñas, Rho y Rac³³⁷. Entre estas dos vías de actuación del PDGF existen efectos sinérgicos y de retro regulación, lo que hace que estas vías estén muy bien reguladas ^{338, 339}. Estudios con animales y cultivos de células transgénicos, en los que se expresan variantes constitutivamente activas e inactivas de las proteínas Ras, demuestran que estas proteínas juegan un papel fundamental en la proliferación, la migración, la supervivencia y el fenotipo de las células vasculares; así como en la angiogénesis, la

hiperplasia vascular y otros procesos involucrados en el desarrollo de la aterosclerosis ^{336, 340-342}. Además, estudios en los que se tratan estas células con estatinas o inhibidores específicos de la farnesil- transferasas, encuentran efectos similares, que revierten al añadir al añadir el sustrato del enzima ³⁴³⁻³⁴⁵.

A.7.1.2.4.-Subfamilia Rho

La familia de proteínas Rho está constituida por seis subfamilias diferentes: las proteínas relacionadas con Rho A y las relacionadas con Rac-1, Cdc42, Rnd, RhoBTB y Miro ³¹⁵. Rho A fue descubierta en 1985 como una proteína relacionada con la superfamilia de proteínas Ras ³⁴⁶. A partir de ese momento diferentes estudios demostraron que Rho, Cdc42 y Rac estaban involucradas en vías de señalización a través de las cuales receptores de membrana modifican la organización de filamentos de actina. Por tanto, las proteínas Rho están involucradas en procesos celulares relacionados con el citoesqueleto como son la polaridad celular, el dinamismo microtubular y el transporte vesicular. Además, Rho también participa en diferentes procesos enzimáticos y en la regulación de la expresión génica.

A.7.1.2.4.1.- Rho A

Rho A es el miembro prototipo de la subfamilia de proteínas que lleva su nombre. Esta subfamilia la integran tres isoformas: Rho A, RhoB y RhoC. Estas tres proteínas se encargan, entre otras cosas, de la regulación del citoesqueleto y del ensamblaje de las fibras de estrés de actina ³⁴⁷. La secuencia de aminoácidos de Rho A, Rho B y Rho C es altamente homóloga (85% de identidad), y difieren principalmente en C-terminal.

A.7.1.2.4.1.1.- *Rho A y células musculares lisas*

Rho A tiene una gran importancia en la fisiología vascular. En las SMC, Rho A participa en la contracción, la diferenciación, la migración y proliferación celular. En la contracción de SMC, Rho A es reconocida hoy en día como el principal regulador de la sensibilización al calcio de las proteínas contráctiles ³⁴⁸. Esto le permite regular la contracción a través de una de sus proteínas diana, como la quinasa asociada a Rho (*Rho-associated kinase*, RHOCK/Rho kinase/ROK) que actúa sobre la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (*myosin light chain*, MLC).

Rho A es una proteína crítica en el control de la diferenciación de las SMC a través de la regulación de la transcripción dependiente del factor de respuesta a suero (*serum response factor*, SRF). La diferenciación de las SMC está marcada por la expresión de proteínas del citoesqueleto y contráctiles. Esta expresión está coordinada por SRF ³⁴⁹, cuya localización celular es regulada por Rho A, que de este modo modifica la expresión de genes involucrados en la diferenciación celular ³⁵⁰. Diferentes estudios han demostrado que una inhibición de Rho A produce una disminución de la expresión de genes de marcadores de la diferenciación de las SMC ³⁵¹.

La inhibición directa de Rho A o de su efector RHOCK inhibe la migración de las SMC inducida por el PDGF, el ácido lisofosfatídico o la trombina. Este efecto se produce mediante mecanismos dependientes e independientes de la fosforilación de SMC ^{352, 353}. Además, también está involucrada la fosforilación de proteínas asociadas a las adhesiones focales ³⁵⁴. Rho A está involucrada en la proliferación de las SMC inhibiendo proteínas que regulan el tránsito del ciclo celular como p27Kip1 y la p21cip1/waf1 ³⁵⁵⁻³⁵⁷. Además, Rho A activa diferentes factores de transcripción como CREB y SRF ^{358, 359} y vías de señalización como la p38 MAPK ³⁵⁸, e induce la expresión de genes como *c-fos* y *c-jun* ³⁶⁰. La inhibición de la isoprenilación de las proteínas Rho

y Ras por estatinas, inhibe la proliferación de las SMC. Este proceso es revertido por el geranilgeraniol, lo que subraya la importancia que tienen las proteínas Rho en la proliferación celular.

A.7.1.2.4.1.2.- Rho A y RHOCK

La quinasa asociada a Rho (RHOCK/*Rho-Kinase*/ROK) es una proteína efectora de Rho A a la cual se une para realizar la mayoría de sus funciones biológicas. RHOCK es una proteína quinasa de residuos Ser/Thr que presenta dos isoformas (ROK α /RHOCK2 y ROK β /RHOCK1) que se expresan diferencialmente en los tejidos. Rho A unida a GTP interactúa con la región C-terminal de RHOCK donde encontramos un dominio de unión a Rho A (RB). En esta misma zona, pero más hacia el extremo C-terminal, encontramos un dominio con homología a la plecstrina (PH) que interactúa con la zona catalítica de la propia proteína, inhibiendo así la función transfosforilasa de RHOCK. Cuando Rho A interactúa con el dominio RB de RHOCK, produce un cambio conformacional que libera el dominio PH y activa la proteína (figura A.19).

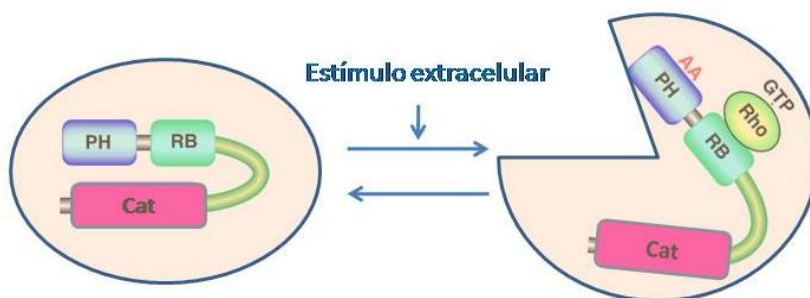


Figura A.19. Regulación de la actividad de RHOCK.

El principal sustrato de RHOCK es la fosfatasa de la MLC. Este es un enzima que en estado activo desfosforila la MLC, de forma que inhibe la contracción celular. Cuando Rho A se une a RHOCK, ésta se activa y puede fosforilar la fosfatasa de la MLC, que queda inactiva y no puede desfosforilar a la MLC. Cuando RHOCK está activa también fosforila a MLC directamente aumentando así la respuesta contráctil ³⁶¹ (figura A.20). Mediante este mecanismo Rho A interviene en la formación de fibras de estrés y las adhesiones focales.

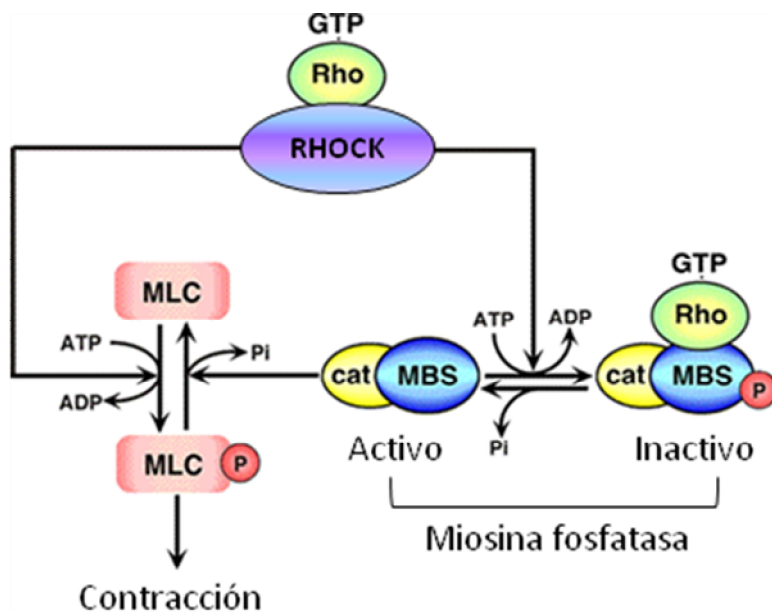


Figura 20. Modelo de regulación de fosforilación de MLC por Rho, RHOCK y miosina fosfatasa. cat, subunidad catalítica; MBS, subunidad de unión a miosina de la miosina fosfatasa. Modificado de Fukata *et al* 2001 ³⁶².

Utilizando inhibidores de RHOCK (como por ejemplo Y-27632), se ha estudiado el papel de este enzima en diferentes vías de señalización (figura A.21). Así, se ha descrito el papel crítico de RHOCK en la síntesis de DNA y la estimulación de la

migración en las SMC ³⁵³. RHOCK también participa en los procesos de activación celular regulados por Rho A.

RHOCK puede ser activada por otros medios, como por ejemplo la caspasa 3 durante la apoptosis. Esta proteína es capaz de cortar el extremo C-terminal de RHOCK, produciendo su activación y como resultado cambios en membrana y citoesqueleto ³⁶³.

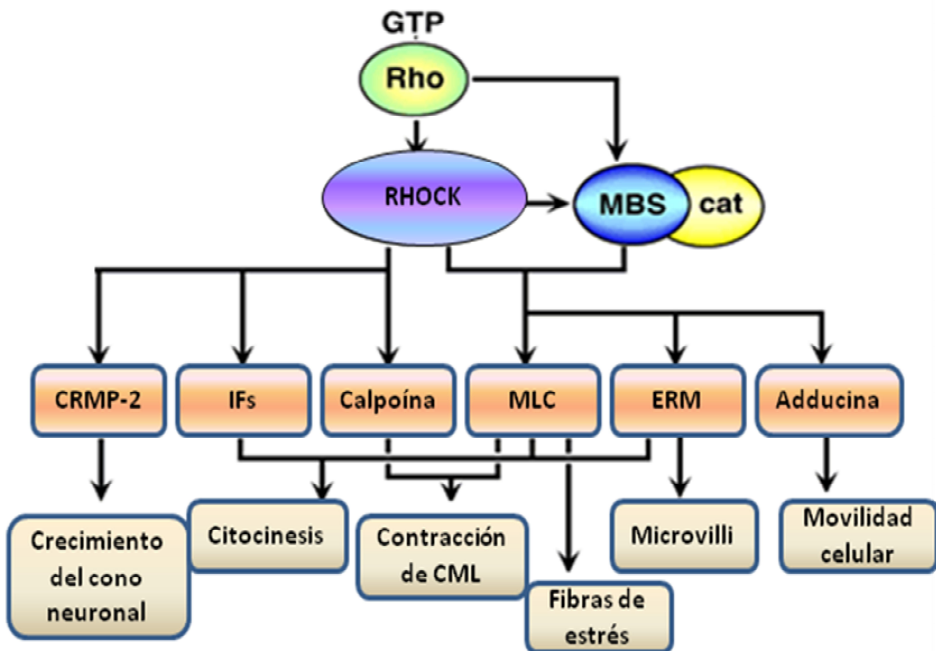


Figura A.21. Sustratos de RHOCK (Cat, subunidad catalítica; Ifs, filamentos intermedios; ERM, familia de proteínas ezrina/raixina/moesina; MBS, subunidad de unión a miosina de la miosina fosfatasa).RHOCK fosforila la MBS de la miosina fosfatasa y MLC. La familia da proteínas ERM, adducina, filamentos intermedios, CRMP-2, and calponina tambien son sustratos de RHOCK, y el estado de fosforilación de estas proteínas esta asociado a funciones específicas en la célula. Además, MLC, ERM y adducina son tambien sustratos de la miosina fosfatasa, de modo que

entre ambas se encargan, de un modo cooperativo, de controlar el estado de fosforilación de estos sustratos y así regulan la organización del cito esqueleto. Modificado de Fukata *et al* 2001³⁶².

A.7.2.- PPAR

En mamíferos el sistema endocrino regula la respuesta fisiológica a la ingesta de ácidos grasos. Una de las moléculas más importantes en la regulación de metabolismo lipídico son los receptores de proliferación activados por peroxisomas (PPARs). Los PPARs se caracterizaron a principios de los años 90³⁶⁴, y se vio que eran una familia de receptores nucleares que inducían a los receptores de hormonas esteroideas, retinoideas y tiroideas^{365, 366}.

Existen tres subtipos de estas moléculas, que se designan comúnmente como PPAR α , PPAR γ , y PPAR δ ³⁶⁷. Los PPARs poseen una estructura modular con diferentes dominios, similar a la de otros receptores nucleares, compuesta por tres dominios principales³⁶⁸ (figura A22A):

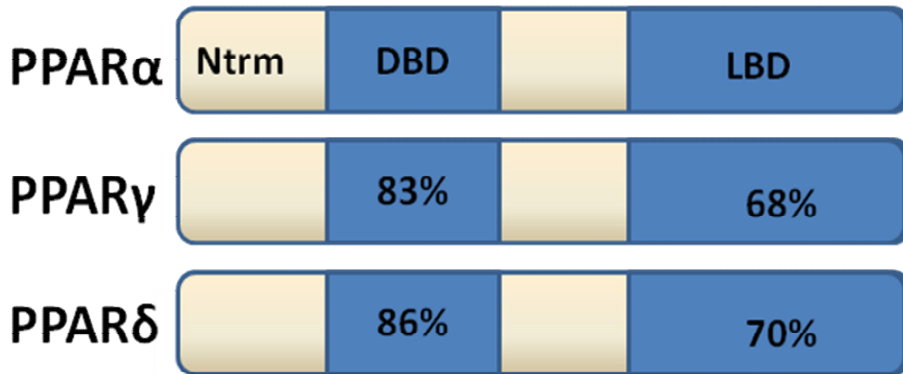
- Región A/B: Situada en el extremo N -terminal, es la región que presenta más variabilidad entre los diferentes receptores nucleares, y la peor caracterizada, aunque parece que interviene en las diferencias en las funciones biológicas de estas moléculas³⁶⁹. Además, en este dominio son fosforilados por las MAPKs, lo que regula su transcripción³⁷⁰ y la unión de ligandos al receptor³⁷¹.
- Dominio de unión a DNA (DBD) o región C: Es el dominio más conservado entre los receptores nucleares y permite reconocer secuencias diana en el DNA y activar la transcripción de genes.

- Dominio de unión al ligando (LBD) o Región E/F: Este es un dominio multifuncional que además de encargarse de la unión a ligando, media en la homo- y la heterodimerización, en la interacción con proteínas de choque térmico, en la actividad transcripcional dependiente de ligando, y en algunos casos, en la represión transcripcional reversible de hormonas. Este dominio está poco conservado, y solo se mantienen unos pocos aminoácidos cruciales en las funciones de transducción de señales de estos receptores.

Los PPARs forman heterodímeros con otro factor nuclear, el receptor del ácido 9-*cis*-retinoico (RXR). Este heterodímero se une a secuencias de DNA que contienen repeticiones AGGTCA separadas por un nucleótido, conocidas como secuencias DR-1³⁷², que se encuentra en todos los promotores regulados por la acción de PPARs (Figura A.22B).

Los PPARs son factores de transcripción dependientes de ligando, de modo que la unión de ligandos específicos es necesaria para su función. Además de estas moléculas, hay otra serie de proteínas que se unen a PPAR de manera específica y regulan su función, son los llamados coactivadores. Estas proteínas inducen la iniciación de la transcripción mediada por PPAR, y se clasifican en tres grupos: proteínas con actividad histona acetilasa (SRC1 y CBP/p300)^{373, 374} que remodelan la cromatina, los complejos DRIP/TRAP que interactúan con la maquinaria transcripcional (PBP/TRAP220)³⁷⁵ y otras proteínas cuya función no está bien caracterizada (PGC1, RIP140, and ARA70)³⁷⁶⁻³⁷⁸.

A)



B)

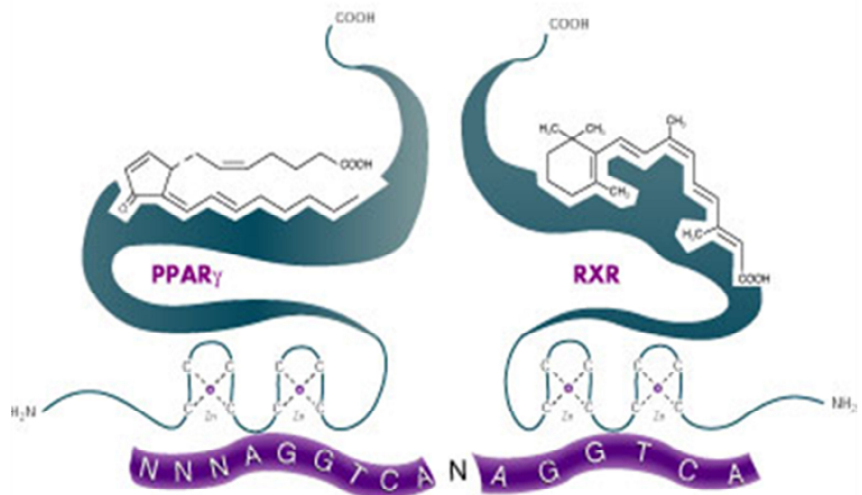


Figura A.22. A) Dominios funcionales de PPARs: N^{trm}, N-terminal; DBD, dominio de unión a DNA; LBD, dominio de unión a ligando. Los números representan el porcentaje de homología entre los distintos subtipos humanos. **B)** Heterodímero de PPAR/RXR unido al elemento de respuesta DR-1 de la región reguladora del gen diana.

A.7.2.1.- PPAR γ

El PPAR γ es el mejor caracterizado de los tres subtipos de PPARs. Esta proteína presenta una gran homología interespecífica, con un 95% de identidad entre los aminoácidos que la componen. Esto refleja la gran importancia de esta molécula en la homeostasis celular. Existen tres isoformas de PPAR γ (PPAR γ 1, PPAR γ 2 y PPAR γ 3) que son el resultado del uso de distintos promotores del mismo gen ³⁷⁹. PPAR γ 1 y PPAR γ 3 tienen la misma secuencia, mientras que PPAR γ 2 tiene 28 aminoácidos más en su extremo amino. PPAR γ 1 se expresa en casi todos los tejidos, mientras que PPAR γ 2 y PPAR γ 3 presentan una expresión tejido específica. De este modo, PPAR γ 2 se expresa exclusivamente en tejido adiposo, y PPAR γ 3 en tejido adiposo, macrófagos y epitelio ^{380, 381}. No obstante el significado funcional de la presencia de cada isoforma no es está muy claro ^{382, 383}.

El PPAR γ es un factor de transcripción fundamental en el metabolismo lipídico, y en la diferenciación del tejido adiposo. Este efecto es tan importante que la sobreexpresión de PPAR γ en otros tipos celulares produce la transdiferenciación de estas células a adipocitos ³⁸⁴. Así, el tratamiento de animales hiperlipémicos con agonistas de PPAR γ disminuyen los niveles de triglicéridos, colesterol y ácidos grasos no esterificados en suero ³⁸⁵. Además del papel de PPAR γ en el metabolismo lipídico, también está involucrado en procesos proateroscleróticos tan importantes como la hipertensión y la inflamación. De este modo, los agonistas de PPAR γ disminuyen la presión arterial en animales hipertensos ³⁸⁶, regulan la contractilidad vascular ³⁸⁶ y la expresión de moléculas cruciales en el mantenimiento del tono vascular, como el péptido natriuretico tipo C, la endotelina y PAI-1³⁸⁷⁻³⁸⁹. En lo referente a la inflamación, PPAR γ inhibe la diferenciación de monocitos a macrófagos, e induce la apoptosis de macrófagos activos ³⁹⁰. Además, inhibe la producción de moléculas proinflamatorias tan importantes como NF- κ B, interleuquinas y TNF- α ³⁹¹; inhibe la expresión de la oxidonítrico sintasa y de receptores "scavenger" A en macrófagos ³⁹², y

de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1 en la pared vascular ³⁹³; hechos que condicionan el papel de los macrófagos en la inflamación proaterogénica.

Además de en los macrófagos, esta molécula está involucrada en la regulación de las demás células vasculares, especialmente en la migración y proliferación de las SMC ^{381, 394, 395} (figura A.23.). Esto, en parte, se debe a la inhibición del efecto nuclear de la ruta de las MAPKs, como la activación de los factores de transcripción Ets que inducen la proliferación y la migración celular ³⁹⁶. Esta inhibición de la transducción de señales por MAMPKs afecta directamente a la respuesta a moléculas como PDGF y AII ³⁹⁷⁻³⁹⁹. Además, inhibe la fosforilación de la proteína Rb y otras moléculas importantes en la progresión del ciclo celular como p27 Kip1 y p21Cip1³⁹⁶.

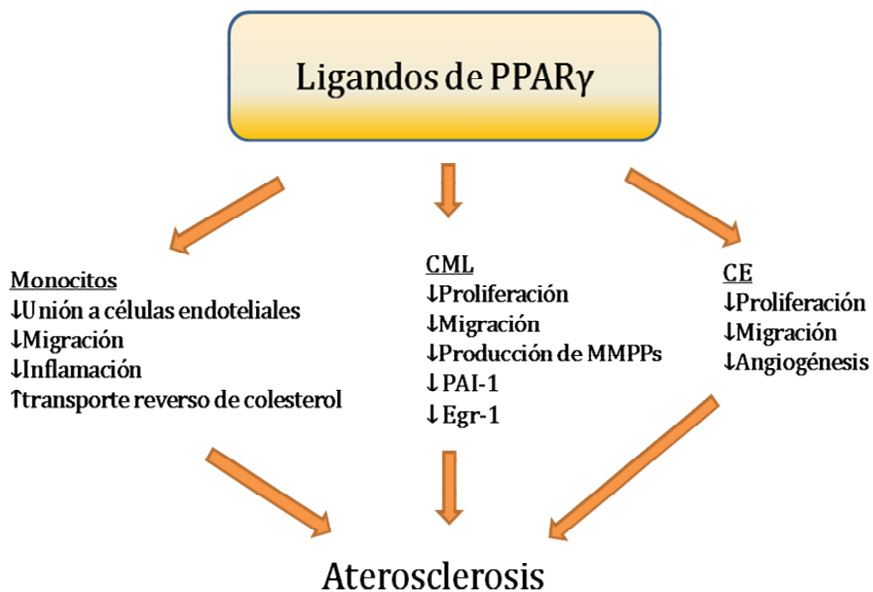


Figura 22. Esquema de los efectos de PPAR γ sobre las células vasculares y el desarrollo de la aterosclerosis.

A.7.3.- SERBP

Las proteínas SREBPs se identificaron por primera vez 1993^{400, 401}. Existen tres isoformas de estas proteínas, que están codificadas por dos genes diferentes, y que forman la familia de proteínas de regulación transcripcional bHLHLZ. Dos de estas isoformas están codificadas por el gen *SREBP-1* (SREBP-1a y SREBP-1c) que contiene dos promotores, de modo que la isoforma obtenida depende del promotor que se use⁴⁰². Estas dos isoformas difieren únicamente en su extremo amino terminal, el cual en SREBP-1a contiene un segmento de 29aa con gran carga negativa, lo que le da mayor capacidad de inducción de la transcripción que el SREBP-1c⁴⁰³. La cantidad en la que se expresa cada una de estas isoformas en cada tejido depende del tipo y del momento en el que se encuentre este. De este modo, en aquellos órganos con mayor demanda de colesterol, o que se encuentre en una situación de alta demanda (como en procesos hiperproliferativos), se expresará más SREBP-1a, que presenta mayor actividad. La otra isoforma conocida la codifica el gen *SREBP-2*⁴⁰³.

Estas proteínas se sintetizan como precursores anclados a la membrana del retículo endoplásmico. Los tres tienen una estructura similar dividida en tres dominios: (1) dominio amino con capacidad de unión a DNA de unos 480 aa; (2) dominio central hidrofóbico de unos 80 aa con dos segmentos transmembrana; (3) dominio carboxilo que es la porción reguladora y consta de unos 590 aa. Los dominios amino y carboxilo se orientan hacia el citoplasma formando una horquilla. El extremo amino terminal es sensible a la concentración de colesterol en la célula, de modo que en respuesta a una bajada en la concentración de colesterol intracelular se produce una proteólisis de este dominio, que se transloca al núcleo e induce la expresión de sus genes diana, lo que produce un incremento del colesterol en la célula³⁷⁰. Existen dos sitios de proteólisis en la molécula, SP1 Y SP2 (sitio de corte de proteasas, "SP"). SP1 se encuentra en el dominio central y al romperse separa los dos extremos, que no

obstante siguen unidos a la membrana. Para que el factor de transcripción del dominio amino terminal se libere de la membrana y salga del retículo hacia el núcleo, donde ejerce su función, es necesaria un segundo corte en SP2, que se encuentra en el primer segmento transmembrana ³⁷⁰(figura A.23).

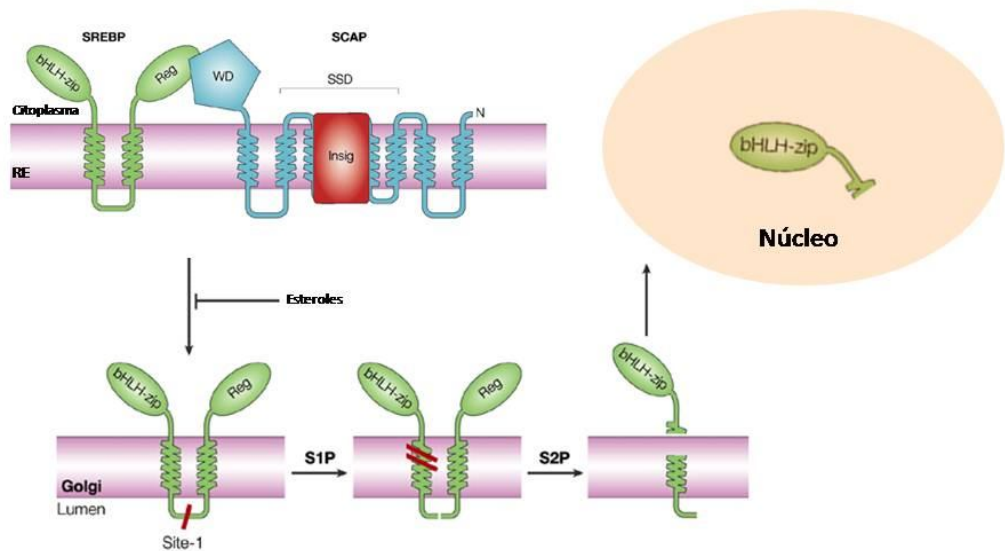
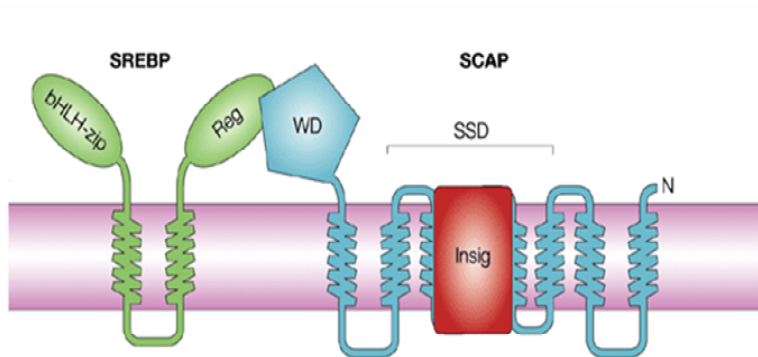


Figura A.23. Ruta de activación de SREBPs. Modificado de Rawson, R.B. 2003 ⁴⁰⁴.

La proteólisis y el transporte de los SREBPs están dirigidos por dos proteínas, SCAP (**SREBP cleavage-activating protein**) e INSIG. SCAP es una proteína transmembrana, que actúa como chaperona en el transporte de SREBPs desde el retículo hasta compartimentos del Golgi donde se encuentran las proteasas SP1. ⁴⁰⁵, ⁴⁰⁶. Esto depende de la interacción entre los dominios carboxilo terminal de las dos

proteínas ^{406, 407}. Una vez en el Golgi, las proteasas SP1 rompen el dominio central y separan el SREBP en dos moléculas unidas a membrana y SCAP vuelve al retículo. La proteólisis de SP1 está regulada por esteroides ^{370, 408}, de modo que una bajada de esteroides en la célula induce el transporte de SREBPs al Golgi y la proteólisis de SP1. Por el contrario, un incremento de esteroides produce un fallo en este mecanismo ⁴⁰⁵. Esto está dirigido por la proteína INSIG, la cual cuando hay esteroides en el medio se une a SCAP e impide el papel de chaperona de SCAP. Cuando la concentración de esteroides baja, INSIG suelta a SCAP y este transporta los SREBPs al Golgi. La proteólisis de SP2 no está regulada por esteroides, pero depende de que se haya producido con anterioridad el corte en SP1 (figura A.24).

A) Niveles altos de colesterol



B) Niveles bajos de colesterol

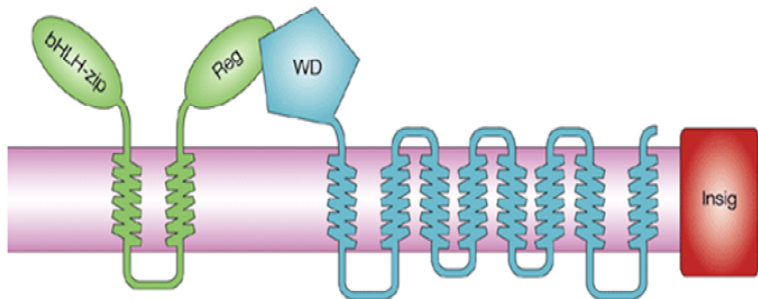


Figura A.24. Regulación de la activación de SREBP por esteroides. bHLH-zip, basic helix-loop-helix leucine-zipper; Reg, reguladora; SSD, sterol-sensing domain; WD, motivo asp-tryp. Modificado de Rawson, R.B. 2003 ⁴⁰⁴.

Para que estas proteínas estimulen la expresión de sus genes diana es necesario que se unan a sus coactivadores transcripcionales, CBP y P300 ^{409, 410}. En el caso de SREBP-1c la eficiencia de unión con estos coactivadores es muy baja y el mecanismo por el cual activa la síntesis de sus genes diana no está bien caracterizado.

Los SREBPs forman dímeros que reconocen secuencias de unión específicas 5'-CANNTG-3' (caja E) y su secuencia en sentido contrario 5'-TCACNCCAC-3' (elementos de respuesta a esteroides, SRE). Esta flexibilidad en el reconocimiento de secuencia se debe a un residuo de tirosina de su centro activo ⁴¹¹, y le confiere una especificidad respecto a sus genes diana, ya que las repeticiones SRE solo están presentes en los promotores inducidos por SREBPs ⁴¹². Esto maximiza la respuesta y las diferencias entre el estado inducido y no inducido y, por tanto, que la respuesta a una depleción de colesterol en la célula sea alta y específica.

Los SREBPs tienen por tanto un papel fundamental en la homeostasis de colesterol y ácidos grasos ⁴¹³⁻⁴¹⁵ (figura A.25).

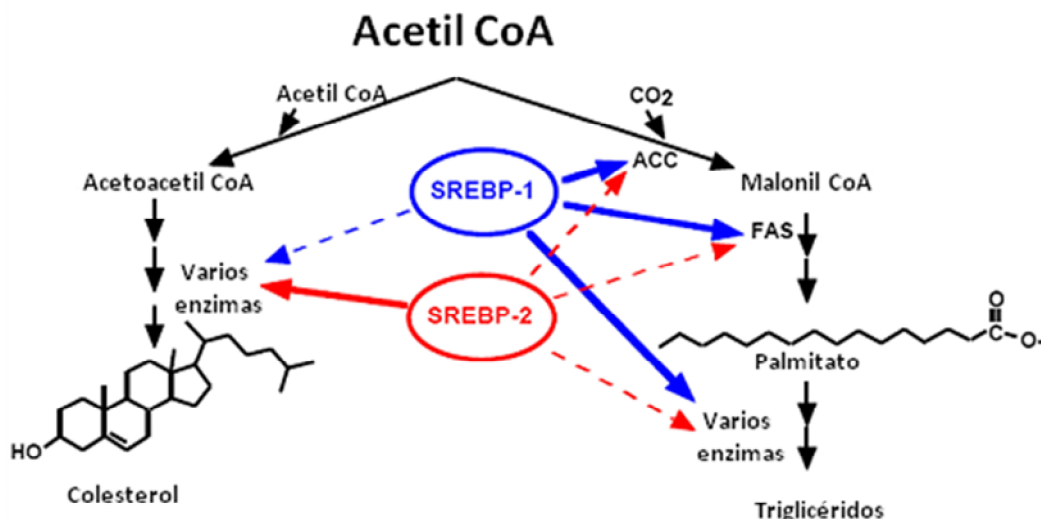


Figura A.25. Esquema de las rutas activadas selectivamente por SREBP-1 y SREBP-2. Las líneas más gruesas y continuas muestran los sitios de mayor influencia de los SREBPs, y las discontinuas delgadas los de menor influencia.

Los SREBP-1 regulan la activación de los genes implicados en el metabolismo de lipídico y la síntesis de *novo* de colesterol, y el SREBP-2 la de aquellos que regulan la homeostasis de colesterol ^{416, 417}. De este modo, una sobreexpresión de SREBPs en ratones induce síndromes metabólicos con efectos fisiológicos similares a patológicas específicas del metabolismo lipídico en humanos ⁴¹⁸.

A.7.4.- Receptor hepático X

El receptor hepático X (LXR) es un miembro de la familia de los receptores nucleares de factores de transcripción. Está involucrado en la regulación de la homeostasis de colesterol, ácidos grasos y glucosa. Existen dos isoformas denominadas

LXR α y LXR β , las cuales se describieron por primera vez en 1994⁴¹⁹ y 1995⁴²⁰ respectivamente. Estas moléculas tienen secuencia, estructura y función muy parecidas, e interactúan con los mismos ligandos. No obstante su distribución es muy diferente, de modo que LXR α se expresa en tejidos específicos (hígado, tejido adiposo y macrófagos) y LXR β en todos los tejidos⁴²¹. Estas proteínas contienen un dominio de unión a DNA del tipo “dedos de zinc”, y un dominio hidrofóbico de unión a ligando donde interactúan pequeñas moléculas de carácter lipídico (esteroles). La unión del ligando a este último dominio produce un cambio conformacional que permite la interacción de estas proteínas con coactivadores, lo que favorece la activación de los genes diana. Los LXRs se unen a sus genes diana formando un heterodímero con el receptor retinoico X (RXR)^{420,422}.

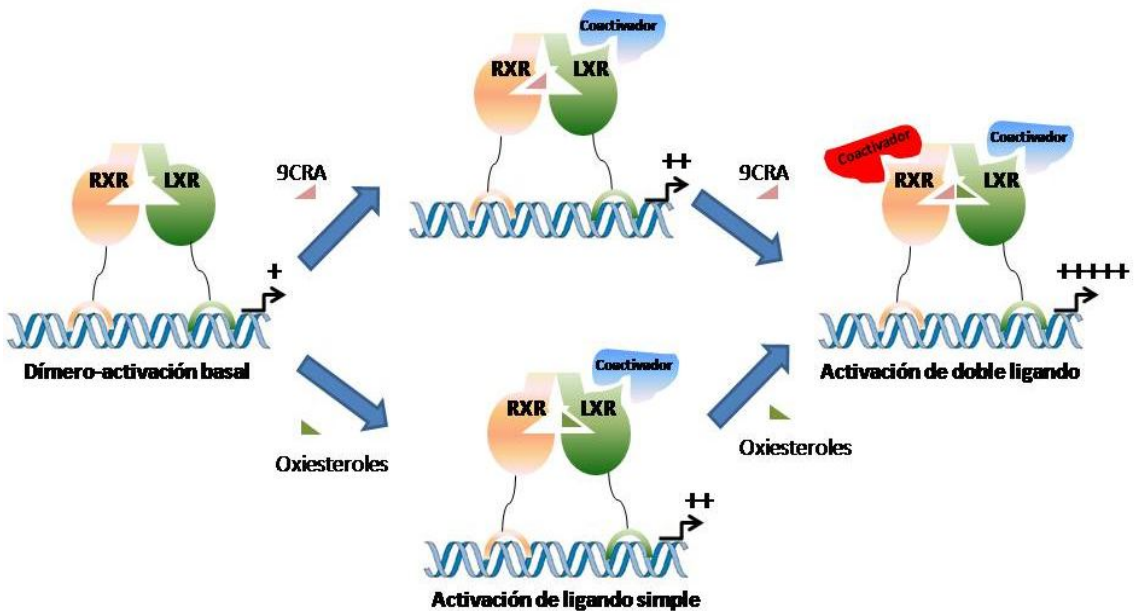


Figura A.26. Activación de la transcripción por LXR. LXR necesita obligatoriamente formar un dímero con RXR para unirse al DNA y realizar su función. A diferencia de otros receptores nucleares, en ausencia de sus ligandos el dímero LXR/RXR no se une a corepresores, por lo que

una vez formado el dímero produce una inducción de la transcripción a nivel basal. La unión de sus ligandos específicos (ácido 9-cis-retinoico para RXR y oxisteroles para LXR) produce cambios conformacionales en el heterodímero que permiten la unión de proteínas coactivadoras, lo que conlleva un incremento sustancial en la inducción de la transcripción de los genes diana. La unión de ambos ligandos produce un efecto sinérgico. Una cualidad inusual de este heterodímero es que la unión del ligando de RXR induce la unión de los coactivadores de LXR, y solo cuando se unen ambos ligandos se une el coactivador de RXR (9CRA, ácido 9-cis-retinoico).

Los LXR juegan un papel fundamental en la eliminación de colesterol en forma de ácidos biliares ⁴²³ (es un modulador directo de CYP7A, enzima principal en la regulación de esta ruta) y en el transporte de colesterol sobrante de los tejidos periféricos al hígado mediante transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) ⁴²⁴, así como en la absorción intestinal de colesterol. Por tanto, en la homeostasis de colesterol están involucrados directamente los SREBPs y el LXR. De este modo, una bajada de colesterol intracelular produce la estimulación de los SREBPs y cuando la concentración baja, se inhibe esta ruta y se activa LXR, que inhibe la absorción de colesterol de la dieta, e induce el transporte del colesterol sobrante al hígado y su eliminación en forma de ácidos biliares (figura A.27)

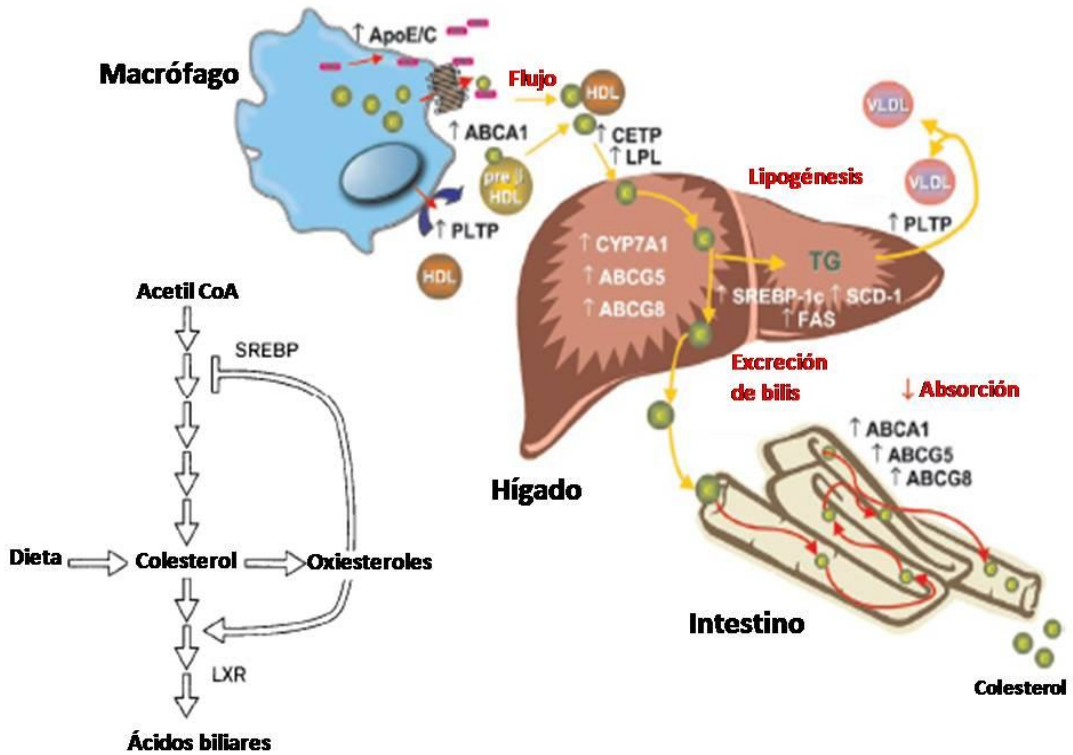


Figura A.27. Papel de LXR y sus genes diana en la homeostasis de colesterol y la lipogénesis (TG, triglicéridos).

Los LXR tienen además otras funciones extrahepáticas, como la regulación del metabolismo lipídico y de colesterol en macrófagos, fundamental en el desarrollo de la aterosclerosis ⁴²⁵. Además, los LXRs inhiben la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en macrófagos activos ⁴²⁶ y la expresión de MMPs en aorta ateroscleróticas ⁴²⁷. De este modo, los LXR tienen un efecto antiaterogénico debido no solo a su papel en la homeostasis de colesterol, sino que también inhiben la producción de mediadores inflamatorios en la pared arterial.

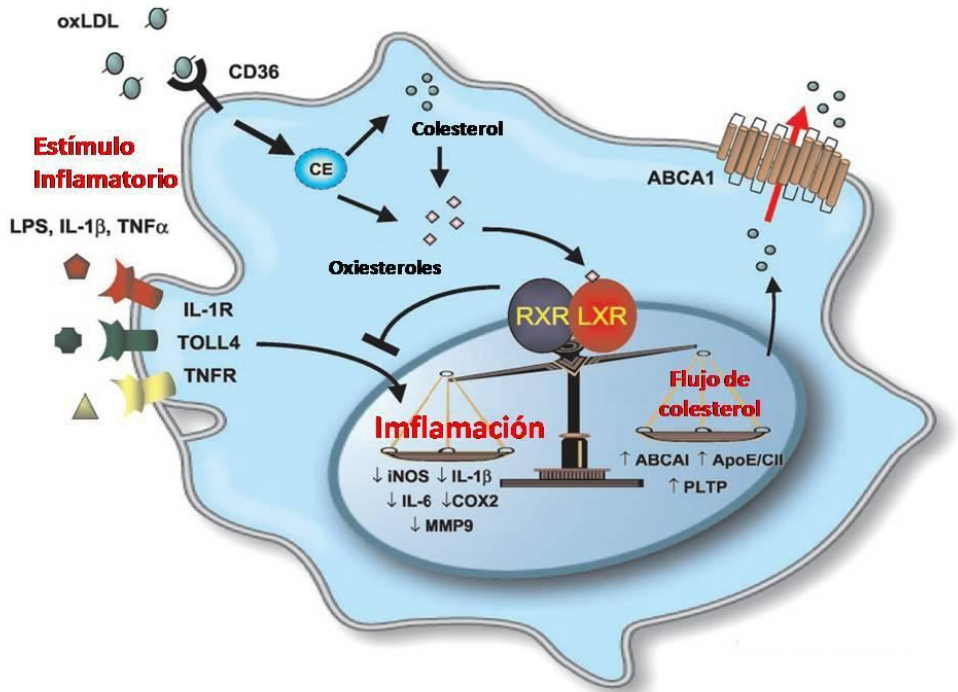


Figura A.29. La ruta de señalización de LXR está implicada en la regulación del metabolismo lipídico y el flujo de colesterol, y la represión de genes proinflamatorios en macrófagos. Modificado de Freeman, M.W. & More, K.J. 2003 ⁴²⁸

Además, PPAR γ regula la expresión de LXR, en cuyo promotor existen secuencias específicas de unión para este factor de transcripción ^{429, 430}. De este modo, una activación de PPAR γ desencadena un incremento de la expresión de los LXR, lo que produce un efecto sinérgico entre ambas rutas en la activación de los transportadores ABC. Así, LXR debe de ser un importante mediador en las rutas antiaterogénicas.

A.8.- Estrategias terapéuticas destinadas al tratamiento de la aterosclerosis.

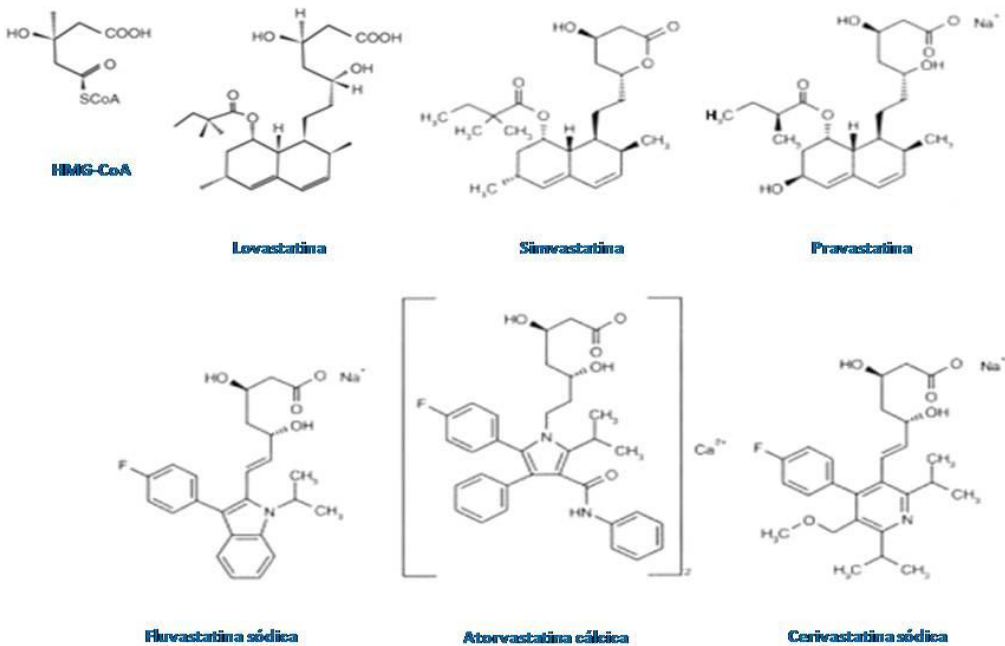
Debido a la complejidad y los numerosos procesos que intervienen en la patología aterosclerótica, se han desarrollado un gran número estrategias farmacológicas destinadas a su tratamiento. Éstas se podrían dividir en dos grandes líneas, la reducción del proceso agudo mediante terapia antitrombótica y la prevención del proceso aterosclerótico mediante la reducción de los factores de riesgo. A continuación se explican algunos de los grupos farmacológicos y las rutas metabólicas sobre las que actúan, teniendo en cuenta su importancia en esta tesis doctoral.

A.8.1.- Inhibidores de la HMG-coA reductasa, estatinas

Múltiples estudios angiográficos y clínicos han demostrado que el uso de fármacos hipolipemiantes (estatinas, fibratos, ácido nicotínico, etc.) inhiben la progresión de la aterosclerosis, reducen los infartos de miocardio y los eventos coronarios. De entre estos fármacos las estatinas han demostrado ser fármacos seguros, fáciles de usar y se han convertido en los más recetados para disminuir el colesterol plasmático y con ello favorecer la estabilización y regresión de la placa aterosclerótica. Estos compuestos inhiben la actividad de la HMG-CoA reductasa y han revolucionado el tratamiento de la hipercolesterolemia. Son los fármacos más eficientes y más utilizados para reducir los niveles de colesterol en plasma. Las estatinas fueron descritas por primera vez en 1976 por Endo y Kuroda ⁴³¹. Estos autores detectaron la presencia de compuestos activos procedentes de *Penicillium citrinum* que inhibían la HMG-CoA reductasa. El primer compuesto identificado fue la mevastatina ⁴³². Desde su descubrimiento, la investigación farmacéutica ha

evolucionado produciendo diferentes compuestos: mevastatina, lovastatina (producto natural), simvastatina (derivado semisintético de la lovastatina), pravastatina (bioderivado de la mevastatina), fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina y rosuvastatina (todas de origen sintético) (figura A.30).

Estatinas derivadas de fermentación



Estatinas sintéticas

Figura A.30. Inhibidores de la HMG-CoA reductasa (estatinas) que se emplean actualmente en la clínica. La lovastatina, simvastatina y pravastatina se obtienen de la fermentación de cultivos de hongos, y la fluvastatina, atorvastatina y cerivastatina son sintéticas. La lovastatina, simvastatina y pravastatina se obtienen de la fermentación de cultivos de hongos, y la fluvastatina, atorvastatina y cerivastatina son sintéticas.

Antecedentes

Respecto a la actividad de cada una de las estatinas, según estudios de inhibición en varios tipos celulares, la pravastatina es la menos potente en lo que respecta a la inhibición de la HMG-CoA reductasa, pero es la que presenta mayor selectividad hepática. Las seis estatinas siguen el siguiente orden de magnitud en función de su actividad: cerivastatina > atorvastatina = fluvastatina = lovastatina = simvastatina > pravastatina ^{433, 434}.

Características	Lovastatina	Pravastatina	Simvastatina	Atorvastatina	Fluvastatina
Dosis máx (mg/día)	80	40	80	80	40
% reducción max LDL col	40	34	47	60	24
% reducción trig. en %	16	24	18	29	10
Aumento HDL en %	8.6	12	12	6	8
Vida media en plasma	2	2.2	1.2	14	1.2
Penerea SNC	si	no	si	no	no
Porcentaje de excreción renal	10	20	13	2	<6
Mecanismo de metabolismo hepático	Citocromo P450	Sulfatación	Citocromo P450	Citocromo P450	Citocromo P450

Tabla A.6. Características de algunas estatinas utilizadas en clínica.

Estos compuestos son inhibidores competitivos de la HMG-CoA ($K_i \approx 0,5-10$ nM), actúan por interacción con dos zonas del centro activo del enzima: la región de unión del hidroximetilglutarilo y un bolsillo hidrófobo al que se unen los anillos aromáticos o hidrófobos. La forma farmacológicamente activa de las estatinas es la

hidroxiácida y no lactónica, ya que ésta mimetiza la estructura de transición en la reducción de HMG-CoA por HMG-CoA reductasa, es lo que se denomina un análogo del estado de transición ⁴³⁵. Por lo tanto, la atorvastatina y la pravastatina se administran en forma hidroxiácida activa, mientras que la simvastatina y la lovastatina requieren la metabolización del anillo lactónico al hidroxiácido.

Múltiples estudios angiográficos y clínicos han demostrado que el uso de estos fármacos hipolipemiantes inhibe la progresión de la aterosclerosis, reduce los infartos de miocardio y los eventos coronarios. Así, el uso de simvastatina en el estudio 4S ⁴³⁶ y pravastatina en los estudios CARE ⁴³⁷, LIPID ⁴³⁸ y WOSCOPS ⁴³⁹, demostraron que estas estatinas disminuyen el colesterol y a la vez proporcionan un beneficio terapéutico tanto en prevención secundaria (4S y CARE) como primaria (WOSCOPS). En el ensayo 4S una dosis media diaria de 27 mg de simvastatina indujo un descenso del 35% de los niveles de colesterol LDL y una disminución del 34% de las muertes por causa cardiovascular y en el número de infartos definidos. El estudio WOSCOPS fue el primero en evaluar los beneficios de la reducción de los niveles de colesterol con un inhibidor de la HMG-CoA reductasa en prevención primaria. En el grupo de pacientes al que se administró una dosis de 40 mg/día de pravastatina se observó una reducción del número de infartos de miocardio y de muertes por enfermedad cardiovascular (31%). Sin embargo, el beneficio terapéutico que se observa se produce antes de que pueda haberse producido regresión de la placa aterosclerótica. Así, el estudio MAAS halló que se producía un efecto significativo en la mejora de la morfología arterial sólo tras 4 años de tratamiento con estatinas ⁴⁴⁰. Por otro lado, fueron necesarios 9 años en el estudio POSCH para obtener beneficio clínico mediante una intervención que reducía únicamente el colesterol plasmático a una concentración similar a la de las estatinas ⁴⁴¹. Los beneficios clínicos del estudio 4S empezaron a observarse a partir de los dos años ⁴³⁶, mientras que en el estudio HPS ⁴⁴² el tratamiento con simvastatina produjo beneficios en pacientes de elevado riesgo cardiovascular, de manera independiente a las concentraciones de colesterol plasmático. En los estudios MIRACL ⁴⁴³ y ASCOT ⁴⁴⁴ la atorvastatina redujo los eventos isquémicos antes de finalizar el

primer año de tratamiento, periodo de tiempo insuficiente para obtener cambios significativos en las lesiones vasculares. Estos hechos hacen suponer que el efecto beneficioso de las estatinas provenga de actividades colaterales a nivel de la célula periférica, este tipo de efectos se denominan efectos pleiotrópicos. Por lo tanto, existe una serie de factores que participan directamente en el proceso aterosclerótico que pueden verse afectados por el tratamiento con los inhibidores de la HMG-CoA reductasa. Es por ello que hay un gran interés en su investigación con el fin de determinar aquellos efectos diferenciales que provienen de cada uno de ellos. En este sentido, tal como se ha mencionado previamente, los metabolitos del mevalonato participan en muchas funciones celulares, por lo que su inhibición mediante estatinas puede motivar la alteración de otras actividades además de la reducción de los niveles de colesterol. A nivel cardiovascular se ha descrito que las estatinas tienen los siguientes efectos:

- *Pared arterial:* mediante su acción hipolipemiante, las estatinas inducen una modesta regresión del tamaño de la lesión y significativos cambios en su composición que hacen la lesión más estable ^{445, 446}. Estos cambios de composición se basan en la reducción de la acumulación de lípidos, macrófagos y de su producción de MMP y TF ⁴⁴⁷. Las estatinas inhiben la expresión de MMP y TF mediante mecanismos dependientes e independientes de la reducción del colesterol ⁴⁴⁶⁻⁴⁴⁸. Las estatinas también inhiben la proliferación de las SMC ⁴⁴⁹⁻⁴⁵¹, lo cual frena la progresión de la lesión. Este mecanismo es independiente de los niveles de colesterol y se produce mediante la inhibición de la isoprenalización de Rho, el cual es el mediador de la inducción de la proliferación de SMC a través de PDGF ⁴⁵². Estudios recientes sugieren propiedades antiinflamatorias de estos compuestos, ya que reducen el contenido de células inflamatorias en la placa aterosclerótica ⁴⁵³. Se ha descrito que las estatinas inhiben la activación del factor de transcripción NF- κ B, factor implicado en la transcripción de diferentes mediadores de la inflamación, ya que impiden la isoprenalización necesaria para su activación ^{454, 455}.

Finalmente, se ha descrito que las estatinas mejoran la disfunción endotelial, ya que reducen el estrés oxidativo ⁴⁵⁶ y aumentan la producción de NO a través de la inducción de eNOS y la estabilización de su RNA mensajero (mRNA) ^{457, 458}. El mecanismo mediante el cual inducen eNOS también es independiente de su acción hipolipemiente y se produce a través de la inhibición de Rho ⁴⁵⁹.

- *Trombosis*: la hipercolesterolemia aumenta la reactividad plaquetar *in vivo* ⁴⁶⁰ e *in vitro* ⁴⁶¹, y se ha sugerido que la disminución de los niveles de lípidos por medios farmacológicos reduce la reactividad plaquetar. Varios estudios mostraron una menor deposición plaquetaria en modelos de trombosis *ex vivo* con varias estatinas ⁴⁶²⁻⁴⁶⁶. Los mecanismos sugeridos se basan en la reducción de la producción de TXA2 ⁴⁶⁷ y la modificación del contenido en colesterol de la membrana plaquetaria ^{468, 469}. También se han descrito efectos sobre los factores de coagulación. Las estatinas inhiben el factor tisular en macrófagos ⁴⁴⁷, lo que implica una reducción de la trombogenicidad de la pared vascular. Hay estudios que demuestran una reducción de la producción de trombina y de varios factores de coagulación en pacientes hipercolesterolémicos tratados con estatinas, en los que se redujo la coagulación sanguínea ^{470, 471}. Se han obtenido reducciones de los niveles de PAI-1 con estatinas y otros hipolipemiantes, potenciándose así la fibrinólisis. El efecto sobre el fibrinógeno es contradictorio, ya que se han descrito reducciones e incrementos ⁴⁴⁵.

A.8.2.- Tetraciclinas

Las tetraciclinas son antibióticos de amplio espectro, derivados de la naftacenocarboxamida policíclica. Actúan inhibiendo la síntesis proteica al unirse a la subunidad 16S del Ribosoma y no permitir la unión del RNA de transferencia (tRNA) a este. El papel potencial de los agentes infecciosos comunes en la patogénesis y la progresión de la aterosclerosis, ha sido estudiado en numerosos artículos en la última década ⁴⁷². Entre ellos, la *Chlamydia pneumoniae* se ha asociado con la enfermedad, ya que se ha visto que se encuentra en una proporción mucho mayor en las placas

ateroscleróticas (70% de las muestras) comparada con el tejido no aterosclerótico (4%). La *Chlamydia pneumoniae* llega a los tejidos a través de una infección respiratoria, de modo que coloniza los macrófagos alveolares y con ello llegan a la sangre dañando los vasos y diseminándose a otros tejidos. El papel anti aterosclerótico de las tetraciclinas se achacaba a la eliminación de estos patógenos. No obstante, las tetraciclinas tienen otras propiedades que no son inherentes a su actividad bactericida y que se han visto asociadas a la aterosclerosis ⁴⁷³. Así, inhiben la actividad de las MMPs por lo que se usan como fármacos en enfermedades en las que se produce destrucción de tejido, como las enfermedades peridontales ⁴⁷⁴ y la artritis ⁴⁷⁵, y se han visto que inhiben la degradación de la matriz en la formación de aneurismas aórticos abdominales ^{476, 477}. Además, las tetraciclinas inhiben la proliferación y la migración celular ^{478, 479}, así como la síntesis de ECM y la hiperplasia de la intima ^{480, 481}. La inhibición de estos factores se ha achacado a la capacidad quelante de iones divalentes de las tetraciclinas ⁴⁷³, no obstante esto solo explica la inhibición, en parte, de la actividad de las MMPs al secuestrar el Zn^{2+} necesario para su función. Estudios recientes han demostrado que las tetraciclinas inhiben las rutas de señalización de las MAPKs kinasas y de la PI3K ^{479, 482} dos de las rutas de señalización más importantes en el desarrollo de la aterosclerosis y que podrían explicar el mecanismo de acción de las tetraciclinas en estos procesos. El mecanismo de acción de estos compuestos en la aterosclerosis no está bien caracterizado y es uno de los objetivos de esta tesis doctoral.

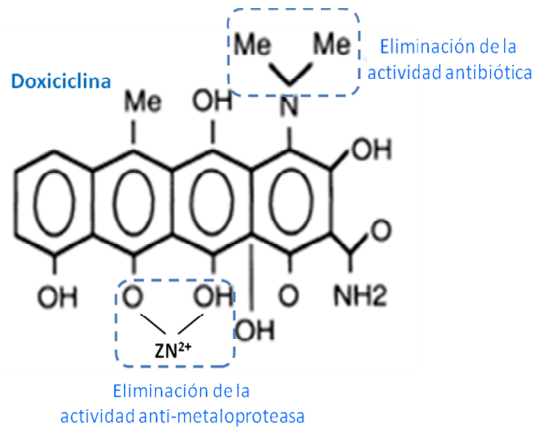


Figura A.31. Estructura de la doxiciclina.

A.8.3.- Ácidos grasos poli-insaturados (AGPI)

Existen dos familias de AGPI: la familia n-6 y la familia n-3. La familia de AGPI n-6 deriva del ácido linoleico, con dos dobles enlaces, y se caracteriza por tener su primer doble enlace en el carbono número 6 de la cadena, contado desde el metilo del extremo de la misma. La familia de AGPI n-3 deriva del ácido α -linolénico (ALA), con tres dobles enlaces, cuyos ácidos grasos tienen su primer doble enlace en carbono número 3 de la cadena (figura A.32).



Ácido α -Linolénico (C 18:3)
(ALA)



Ácido Ecosapentaenoico (C 20:5)
(EPA)



Ácido Docosahexaenoico (C 22:6)
(DHA)

Figura A.32. Estructura química del ALA, ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosaheptaenoico (DHA).

Tanto el linoleico como el ALA son ácidos grasos esenciales, ya que no pueden ser sintetizados por el organismo y, por tanto, deben ser aportados en la dieta ⁴⁸³. Los diferentes números y posiciones de los dobles enlaces de la cadena confieren a los ácidos grasos diferentes propiedades fisiológicas derivadas de su metabolismo, lo que hace que la relación entre los ácidos grasos n-3 y n-6 de la dieta sea muy importante. El ácido linoleico se metaboliza a ácido araquidónico y el α -linolénico da lugar al ácido eicosapentaenoico (EPA) y al ácido docosaheptaenoico (DHA). Todos ellos emplean las mismas rutas metabólicas y compiten por las mismas enzimas elongasas y desaturasas. Además de ser una fuente de energía, las familias de AGPI n-6 y n-3 se incorporan a las membranas de las células, donde son precursores de los eicosanoides (prostaglandinas, prostaciclina, TX y leucotrienos), que intervienen en numerosos procesos fisiológicos tales como la coagulación de la sangre o la respuesta inflamatoria e inmunológica. En general, los eicosanoides sintetizados a partir de la familia de AGPI n-3 son menos activos (por ejemplo, tienen menor actividad antiinflamatoria) que los eicosanoides derivados de la familia n-6. Al aumentar el consumo de AGPI n-3 en la dieta, también puede incrementarse la producción de eicosanoides de estas formas menos activas. El consumo de ácidos grasos n-6 y n-3 determina los tipos y cantidades de eicosanoides en el organismo, lo cual influye potencialmente en todos los procesos

en los que intervienen. (figura A.33).

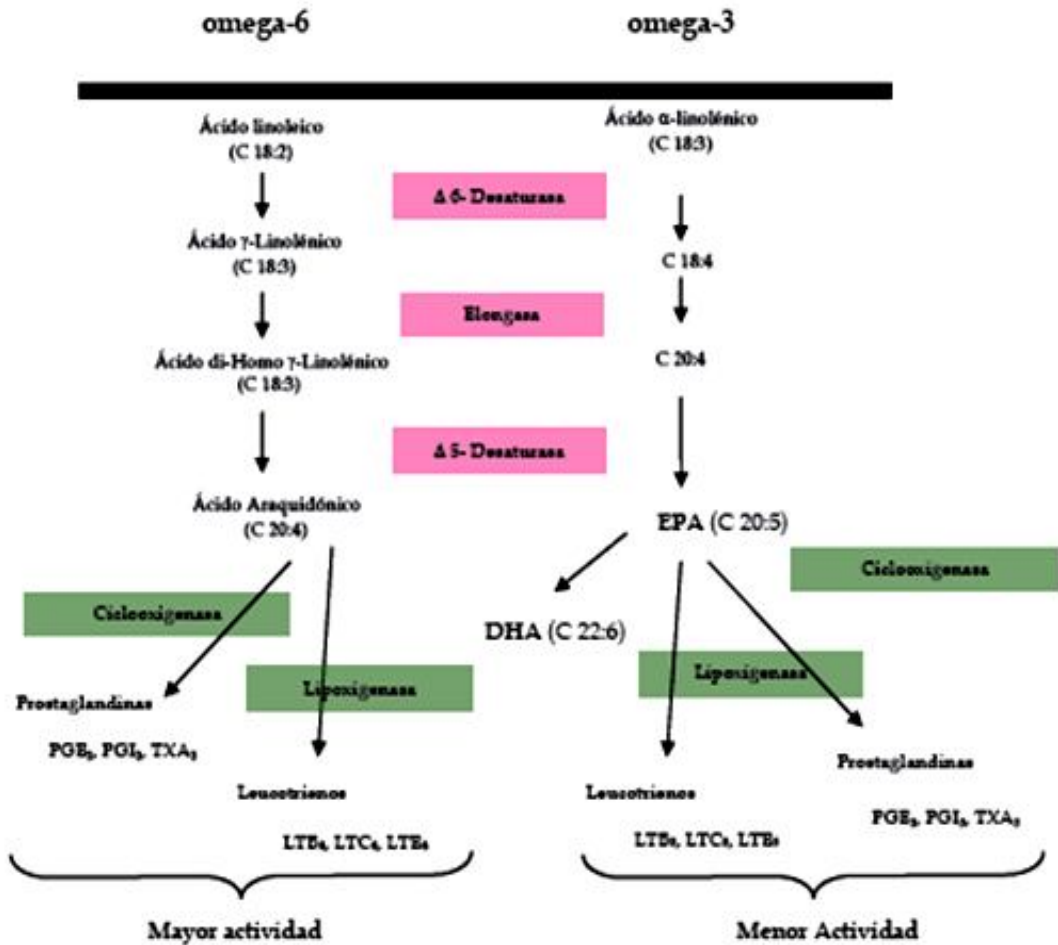


Figura A.33. Biosíntesis de los ácidos grasos poliinsaturados (PG, prostaglandina; TX, tromboxanos; LT, leucotrieno).

Diversos estudios epidemiológicos han determinado que un consumo discreto de pescado se asocia a una clara reducción en el riesgo de mortalidad de causa cardiovascular en diversas poblaciones no mediterráneas ⁴⁸⁴⁻⁴⁸⁶. Sin embargo, el consumo de pescado no protege contra la enfermedad coronaria en aquellas poblaciones en que el consumo de grasas saturadas es elevado ⁴⁸⁷.

Aunque aún no está claro, el mecanismo exacto mediante el cual los ácidos grasos n-3 ejercen su efecto protector, se han propuesto varios mecanismos posibles. Entre ellos se ha descrito la capacidad que tienen los ácidos grasos n-3 para influenciar la coagulación sanguínea y la trombosis, el perfil de los lípidos plasmáticos, en la inflamación y la presión sanguínea.

Los efectos ateroprotectores derivados de la ingesta de AGPI n-3 provienen principalmente de su incorporación a los fosfolípidos de las membranas de las células, sustituyendo parcialmente el ácido araquidónico como sustrato inicial para la producción de eicosanoides ⁴⁸⁸. Cuando las células vasculares sufren algún tipo de daño, se desencadena el proceso de agregación plaquetaria. Los intermediarios derivados del metabolismo de los AGPI n-3 son menos protrombóticos y vasoconstrictores que los derivados procedentes del araquidónico (n-6). El contenido en ácidos grasos de las plaquetas origina la producción de tromboxano A2 a partir de la familia n-6, o de TXA3 a partir de la familia n-3. Este último posee un efecto proagregante menor que el TXA2, reduciendo, por tanto, la agregación plaquetaria y la trombosis ⁴⁸⁹.

El efecto más conocido derivado del consumo de ácidos grasos n-3 es el hipolipemiente ⁴⁹⁰, en concreto el efecto reductor sobre los triglicéridos del plasma. Los triglicéridos elevados son un factor de riesgo ateroesclerótico, especialmente en individuos con valores reducidos de colesterol HDL. Otros estudios también han demostrado que el consumo de cantidades considerables de pescado o de aceites de pescado como tal, o administrado en cápsulas, puede disminuir los niveles de triglicéridos en sujetos sanos e hiperlipémicos ⁴⁹¹⁻⁴⁹³. Con respecto a los efectos de los AGPI n-3 sobre el colesterol sanguíneo, en la mayoría de los estudios llevados a cabo hasta ahora no se han encontrado efectos significativos sobre el colesterol total ^{494, 495}. En cambio, los aceites de pescado suelen producir un aumento en el colesterol HDL de un 10%, aunque éste depende del alimento y de las cantidades de n-3 ingeridas ⁴⁸⁸.

Los ácidos grasos n-3 de cadena larga tienen un efecto antiinflamatorio muy importante, disminuyendo significativamente la expresión de las moléculas de adhesión intracelulares, de factores de crecimiento y citoquinas proinflamatorias ^{496, 497}. La adhesión de los leucocitos circulantes al endotelio vascular y la posterior infiltración de estas células en la pared vascular están reguladas por diferentes proteínas de adhesión expresadas tanto en los leucocitos como en el endotelio. Una reducción en la expresión de estas moléculas de adhesión disminuiría significativamente la infiltración de monocitos/macrófagos. Estudios *in vitro* han demostrado que el DHA reduce la expresión de la molécula ICAM-1, la VCAM-1 y la molécula de adhesión de células endoteliales-1 (ELAM-1/E-selectina) en la superficie de las CE ⁴⁹⁸. Este efecto se ha asociado con una reducción en la adhesión de monocitos a las CE activadas ⁴⁹⁸. La menor infiltración de células inflamatorias en la placa de ateroma se ha correlacionado con una mayor estabilidad de ésta. En este sentido, se ha demostrado que los ácidos grasos de cadena larga n-3 pueden estabilizar la placa de ateroma reduciendo la infiltración de células inflamatorias e inmunitarias en ella y/o mediante la reducción de la actividad de estas células una vez que se han infiltrado en la placa. En esta misma línea, se ha observado que los ácidos grasos de cadena larga n-3 se incorporan a la placa de ateroma tras la administración de aceite de pescado y que esta incorporación se asocia con cambios estructurales que incrementan la estabilidad de la placa ⁴⁹⁹. Como ya hemos señalado, los PUFA omega-3 afectan al número de leucocitos contenido en la placa al reducir la expresión de moléculas de adhesión en ellas; sin embargo, también pueden afectar directamente a la expresión de moléculas de adhesión en los propios leucocitos. Así, la administración de aceite de pescado en ratas redujo la expresión de ICAM-1 en sus linfocitos. Efectos similares se han observado en macrófagos de ratón y en linfocitos humanos ^{500, 501}. Sin embargo, también hay resultados contradictorios en cuanto a la disminución de proteínas de adhesión inducidas por los ácidos grasos omega-3. De este modo, algunos estudios a pesar de observar una reducción en el contenido de leucocitos en la placa de ateroma, no encontraron una reducción de ICAM-1 o VCAM-1 en las placas de sujetos a los que

se administró aceite de pescado ⁵⁰². Esto apoya la idea de que la reducción en la expresión de estas moléculas de adhesión no sea probablemente el único mecanismo por el que el consumo de aceite de pescado reduce la infiltración de células proinflamatorias en la placa de ateroma.

Otro mecanismo por el que las células circulantes proinflamatorias pueden introducirse en la placa de ateroma es la acción de agentes quimiostáticos. Estas moléculas, como el RANTES, el PF4 o el leucotrieno B₄, atraen a monocitos y macrófagos a sitios específicos, en este caso a la placa de ateroma. La dieta enriquecida con ácidos grasos n-3 reduce la producción de leucotrieno B₄ ^{503, 504} y MCP-1 ⁵⁰¹. De un modo similar, se ha visto que la incubación de CE humanas con ácidos grasos n-3 (DHA) reduce la adhesión de monocitos al endotelio en cultivo y disminuye la formación de PAF por el propio endotelio ⁵⁰⁵. Esta molécula es un fosfolípido que interviene en la adhesión de los leucocitos a la pared vascular y también posee efecto quimiotáctico. El PAF, una vez sintetizado, permanece adherido a la pared del vaso a través de su parte hidrofóbica y la unión del PAF contenida en la superficie endotelial con su receptor expresado en la superficie de los leucocitos contribuye a la adhesión de éstos a la pared vascular ⁵⁰⁶. Además, AGPI inhibe la producción de PDGF ⁵⁰⁷ cuyo papel en la aterosclerosis ya hemos comentado con anterioridad.

La apoptosis, además de la necrosis, puede ser un mecanismo de modulación de las células constituyentes de la placa de ateroma, en concreto del número de leucocitos que la constituyen. En este sentido, se ha demostrado que tanto el EPA como el DHA aumentan la apoptosis de monocitos humanos y líneas celulares de monocitos en cultivo ^{508, 509}.

Un punto que podría tener gran influencia en el efecto antiinflamatorio de los ácidos grasos n-3 es, probablemente, la propia estructura de estas moléculas. En este sentido, se ha demostrado que la actividad antiinflamatoria de los ácidos grasos n-3 está directamente relacionada con la presencia o ausencia de dobles enlaces en su

molécula mejor que con el tipo de insaturación ⁵¹⁰, e incluso se cree que podría haber receptores específicos de los ácidos grasos n-3 a través de cuya activación estas moléculas ejercerían el efecto antiinflamatorio.

Un hecho interesante, recientemente demostrado, es que los ácidos grasos n-3 actúan como activadores de los PPAR- γ ³⁹⁵. La activación de los PPAR- γ en los monocitos inhibe la producción de MMPs ⁵¹¹ que, como se expuso con anterioridad, tienen una implicación directa en la inestabilidad de la placa, por lo que la acción de los ácidos grasos omega-3 sobre el PPAR- γ podría ser un mecanismo adicional por el que los PUFA n-3 mejoran la estabilidad de la placa.

La hipertensión es uno de los factores más importantes en el desarrollo de la aterosclerosis. Entre otros efectos, la hipertensión provoca la activación del endotelio ⁵¹², lo que a su vez origina la producción endotelial de moléculas de adhesión y la infiltración de células sanguíneas a la pared vascular, contribuyendo al engrosamiento de la arteria y al desarrollo de la aterosclerosis. Los ácidos grasos n-3 pueden estimular la producción endotelial de NO ^{513, 514}. Esta molécula provoca la relajación de las células del músculo liso permitiendo la dilatación de los vasos sanguíneos, que reduce a su vez la presión sanguínea y la activación endotelial. Se ha demostrado que sólo cantidades elevadas de aceites de pescado (un mínimo de 3 g/día) producen un descenso significativo, aunque moderado, de la presión sanguínea ^{515, 516}. Sin embargo, para obtener estos efectos las cantidades de pescado que habría que consumir para obtener estas dosis efectivas son tan elevadas que en la práctica sólo se alcanzan mediante el consumo de suplementos o alimentos enriquecidos con AGPI n-3.

A pesar del aparente efecto beneficioso que los ácidos grasos n-3 pueden tener sobre la actividad plaquetaria y la reducción de la inflamación, los ácidos grasos n-3 pueden aumentar el índice de insaturación debido a la incorporación de EPA y DHA en membranas y lipoproteínas, favoreciendo un aumento de la peroxidación lipídica ⁵¹⁷.

Quedan muchas preguntas sin respuesta sobre los mecanismos involucrados en el efecto antiaterogénico de los ácidos grasos n-3. Una de las preguntas más evidentes es cómo se promueve este efecto, ya que la mayoría de los estudios se ha limitado a detectar una serie de biomarcadores, sin profundizar en los mecanismos celulares y moleculares que producen estos efectos. Además, en los estudios de intervención en humanos estos efectos no se observan de forma consistente. Probablemente, el efecto antitrombótico y antiinflamatorio están afectados por muchos factores que justifican esta variabilidad en los resultados observados.

Objetivos

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, han dado lugar al desarrollo de un modelo celular de aterosclerosis temprana. Dicho modelo está basado en el estudio a nivel molecular de los cambios experimentados en las SMC arteriales tras una dieta rica en colesterol. El modelo 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 rica en colesterol sobre la producción y remodelación de la ECM en el modelo celular SMC-C/SMC-Ch, así como el mecanismo por el cual se producen estos cambios. Además, pretendimos estudiar los efectos de la lovastatina, la doxiciclina y los PUFAs, cuyo efecto beneficioso en la aterosclerosis está ampliamente contrastado, sobre la producción y remodelación de la ECM en este modelo. A continuación se detalla cada uno de los objetivos:

- 1.- Determinar el efecto que tiene un aporte de colesterol en la producción de proteínas que forman y remodelan la ECM, en las SMC de aorta. Así como estudiar el mecanismo por el cual se producen estos efectos a nivel de:
 - a. las vías de isoprenilación de proteínas.
 - b. la activación de proteínas G de membrana.
 - c. los factores de transcripción implicados en la homeostasis de colesterol.

2.- Determinar el efecto de las estatinas sobre la producción de ECM en cultivos de SMC, estudiando el mecanismo por el cual se producen estos efectos a nivel de:

- a. las vías de isoprenilación de proteínas.
- b. la activación de proteínas G de membrana.
- c. los factores de transcripción implicados en la homeostasis de colesterol.

3.- Determinar el efecto de la doxiciclina sobre la producción de ECM en cultivos de SMC, estudiando el mecanismo por el cual se producen estos efectos a nivel de:

- a. las vías de isoprenilación de proteínas
- b. la activación de proteínas G de membrana
- c. los factores de transcripción implicados en la homeostasis de colesterol.

4.- Determinar el efecto de la ácidos grasos poliinsaturados sobre la producción de ECM en las SMC, estudiando el mecanismo por el cual se producen estos efectos a nivel de:

- a. las vías de isoprenilación de proteínas.
- b. la activación de proteínas G de membrana.

Objetivos

- c. los factores de transcripción implicados en la homeostasis de colesterol.

Material y Métodos

B.1.- Animales y dietas

Se utilizaron 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 D3.....	2000 UI / Kg
Vitamina E.....	20 mg / Kg

Se hicieron dos grupos de pollos, uno alimentado con dieta control, y otro con dieta control suplementada con un 5 % de colesterol.

Las SMC utilizadas en los cultivos se extrajeron de las aortas de dichos animales a los diez días del nacimiento.

B.2.- Cultivos celulares

Para todos los experimentos en los que fue posible se trabajo con cultivos primarios de SMC procedentes de pollo. Para ciertas pruebas, la utilización de cultivos primarios de SMC hacía que los experimentos no fuesen viables, en cuyo caso se utilizo la línea celular de SMC A10 de rata. Así por ejemplo, para obtener mutantes dominantes positivos y negativos de Rho-A y H-RAS, se requiere utilizar métodos de transfección que producen una muerte masiva en las células primarias y además, es necesario un gran intervalo de tiempo para la obtención de mutantes estables (1-2 meses) lo que produce fuertes cambios debido a la senescencia celular en las SMC. Todo ello, no permitió la utilización de los cultivos primarios de SMC.

B.2.1.- Obtención de cultivos primarios de células de músculo liso de aorta.

Las SMC se obtuvieron a partir del arco aórtico de los pollo mediante el método de los explantes ⁵¹⁸, con pequeñas modificaciones realizadas en nuestro laboratorio ^{60, 519}. Así, a los diez días del nacimiento los animales se sacrificaron mediante decapitación, e inmediatamente se extrajeron las aortas en condiciones de esterilidad 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 y antimicóticos (Penicilina G 10.000 U/ml, estreptomicina sulfato 10 mg/ml y 25 µg/ml anfotericina B, disuelto en PBS; A5955, Sigma, St. Louis, MO) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente, se lavaron tres veces con PBS, se sometieron a una digestión con colagenasa (1 mg/ml en PBS, C0130 Sigma) durante 20 minutos a 37 °C. Después se lavaron nuevamente con PBS, se cortaron en fragmentos de $\approx 1 \text{ mm}^2$ y se distribuyeron sobre en las placas de cultivo, donde se dejaron 15 minutos para que los explantes se adhieran a la superficie de cultivo. Una

vez adheridos los explantes, se añadió 4 ml de medio de cultivo [DMEM rico en glucosa (D5796, Sigma), con piruvato sódico 100mM y 20% de FBS) y se incubaron en una estufa de cultivo a 95% de humedad, 37 °C y con una atmósfera de 5% de CO₂.

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

Las células procedentes de la aorta de pollos alimentados con dieta control las nombramos como SMC-C y las procedentes de la aorta de pollos con dieta suplementada con colesterol, SMC-Ch.

B.2.2.- Línea celular de A10 de rata.

La línea celular A10 (ATCC número CRL-1476) deriva de aortas de embriones BDIX de rata ⁸³ y se ha usado ampliamente como modelo celular de SMC. La designación de esta línea celular se basa en su origen anatómico, sus características electrofisiológicas y estructurales, a la presencia de creatina posfoquinasa y mioquinasa ⁸⁴, y la ausencia de citoqueratina y proteínas específicas de neuronas ⁵²⁰. Estas células expresan además α -actina, SM22 α , calpoína de músculo liso y viementina, que son específicas de las SMC *in vivo*. Las células SMC A10 presentan un fenotipo similar a las SMC desdiferenciadas (sintéticas) lo que se evidencia por su forma epiteloide, la ausencia de expresión de receptores funcionales de PDGF- α y de PDG- β , y la expresión de miosina no muscular en lugar de la cadena pesada de miosina propia de músculo liso ⁵²¹. Estos hechos hacen que esta línea celular sea idónea para nuestros experimentos.

Las células se obtuvieron de la ATCC (*American Type Culture Collection*) a través del Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada. Todos los experimentos se realizaron entre los 5-10 pases tras su recepción.

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

Tanto los cultivos primarios de SCM-C y SMC-Ch procedentes de los distintos grupos de animales, como los cultivos de la línea celular A10, se mantuvieron en placas de 60mm con 4 ml de medio de cultivo (DMEM, piruvato sódico 100mM y 10% FBS) cambiándose este antes de que su color se tornara amarillento (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 (0,02 % de EDTA y 0,05 % de tripsina en PBS) y se sembraron diluidas en nuevas placas. 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+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. Todas las células utilizadas en los experimentos se encontraban entre el tercer y el cuarto pase.

B.3. - Tratamientos *in vitro*

Todos los tratamientos *in vitro* se llevaron a cabo en cultivos de SMC al 90% de confluencia, momento en el cual observamos que la síntesis de ECM en las SMC empezaba a ser evidente. Los tratamientos consistieron en la incubación de los distintos compuestos en el medio de cultivo durante 48h.

Lovastatina (M2147, Sigma): Es un inhibidor específico de la HMG-CoA reductasa, ampliamente utilizado como fármaco hipolipemiante y en la prevención de eventos cardiovasculares. Este compuesto se diluyó en etanol absoluto (solución madre) y esta se diluyó en el medio de cultivo hasta obtener una concentración final de 5mM, concentración a la cual este fármaco no presenta ningún tipo de toxicidad en cultivos primarios de SMC procedentes de distintas especies y sus efectos sobre la proliferación celular son mínimos⁵²². 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.

Mevalonato: Este metabolito intermediario de la síntesis de colesterol e isoprenoides, es el producto directo de la reacción catalizada por la HMG-Co A reductasa. Este compuesto se obtuvo mediante la hidrólisis básica de su forma lactónica (mevalonolactona, M4667 Sigma) con NaOH 1M durante 1h a 37°C, tras lo que se neutralizó con clorhídrico 1M y hepes 100µM a PH 7.4. El mevalonato se añadió al medio de cultivo para los tratamientos a una concentración final de 100 µM.

Geranilgeranil pirofosfato (GGPP, G6025 Sigma): Este compuesto es el producto obtenido en la reacción catalizada por la geranilgeranil pirofosfato sintetasa (también llamada transpreniltransferasa) y es el sustrato de la geranilgeranil transferasa, isoprenil transferasa encargada de la geranilgeranilación de proteínas. Para los experimentos se añadió directamente al medio a una concentración final de 10 μM .

Doxiciclina (D9891, Sigma): este antibiótico derivado de la oxitetraciclina, es un potente inhibidor de MMPs e inhibe la síntesis de ECM en osteocitos. Para los experimentos se diluyó en medio de cultivo a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ (20 nM), concentración a la cual se ha demostrado que no causa ningún tipo de toxicidad ni variación en la proliferación de las SMC primarias en cultivo ⁵²³.

Manumicina A (M6418, Sigma): este antibiótico es un potente inhibidor específico de la farnesiltransferasa (FTase, $\text{IC}_{50} = 5 \mu\text{M}$) comparado en su efecto con la geranilgeraniltransferasa (GGTase, $\text{IC}_{50} = 180 \mu\text{M}$). Este producto se diluyó directamente en el medio de cultivo a una concentración final de 10 μM . Esta concentración es similar a la empleada en otros estudios con cultivos primarios de SMC ⁵²⁴.

GGTI-298 (G5169, Sigma): este compuesto es un inhibidor específico de la geranilgeraniltransferasa permeable para la célula. Además, no presenta ningún efecto sobre la activación de H-Ras a concentraciones inferiores de 15 μM ^{525, 526}. Se añadió directamente al medio de cultivo a una concentración final de 10 μM , concentración a la cual no presenta ningún tipo de efecto citotóxico ni afecta a la proliferación de las SMC ⁵²⁷.

Colesterol:metil- β -ciclodextrina (C4951, Sigma): este compuesto es un complejo de metil- β -ciclodextrina con colesterol, el cual es soluble en agua a

200mg/ml y contiene 40mg de colesterol por gramo de compuesto sólido, que libera a la célula produciendo un fuerte incremento del contenido de colesterol intracelular (tanto total como esterificado) ⁹⁰. Además, no tiene ninguna toxicidad sobre las SMC a concentraciones inferiores de 20 µg/ml ⁹⁰. Para nuestros experimentos se diluyó en el medio de cultivo a una concentración final de 10 µg/ml.

Ácido ecosapentaenoico (EPA, E2011 Sigma): este compuesto es un ácido polinsaturado de cadena larga ω-3, derivado ácido α-linoleico. Para su uso se complejo con BSA en una proporción molar aproximado de 1:3 (EPA:BSA). Para ello se añadieron 3 mg de EPA y 50 mg de BSA a cada 200 ml de medio de cultivo y se calentó durante 3h a 37 °C. La concentración final obtenida y que se uso para los distintos experimentos fue de 50µM.

Ácido dodecahexanoico (DHA, D2534 Sigma): este compuesto, al igual que el anterior, es un ácido polinsaturado de cadena larga ω-3 derivado ácido α-linoleico, y se usó a la misma concentración y proporción molar que el anterior, para lo cual se añadieron 2,75mg de DHA y 50mg de BSA a 200ml de medio de cultivo y se calentó durante 3h a 37 °C.

Ácido araquidónico (AA, A3555 Sigma): el ácido araquidónico (ácido eicosatetraenoico) es ácido polinsaturado de cadena larga ω-6, derivado ácido linoleico. Para los distintos experimentos se utilizo complejado con BSA en una proporción molar 1:4 (AA:BSA) y una concentración final 50 µM. Para ello se añadieron 3mg de AA y 50mg de BSA a 200ml de medio de cultivo y se incubó durante 3h a 37°C.

B.4.- Cuantificación de la síntesis de colágeno: Incorporación de [H³]-prolina

La cantidad de colágeno sintetizado por las SMC se determinó mediante el método de Peterkofsky ⁵²⁸. Para ello se sembraron las SMC-C y SMC-Ch a la misma densidad celular en placas de 6 pocillos y, cuando estas llegaron al 90% de confluencia, se añadió a cada pocillo 1ml de medio de cultivo (DMEM rico en glucosa suplementado con piruvato sódico 100mM, ácido ascórbico 50µg/ml y 10% de FBS) que contenía 1 µCi de L-[5-H³]-prolina (26 Ci/mmol) (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido). Tras 48h de incubación, se retiró el medio de cultivo, se lavó la monocapa celular tres veces con PBS y se lisaron las células con 0,5 ml de NaOH 0,5M durante 1h. Después se recogió la solución resultante, que se neutralizó con el mismo volumen de HCl 0,5M. De esta solución, 50µl se utilizaron para medir proteínas totales mediante el método de Bradford ⁵²⁹. A los 250 µl restantes se le añadió 1 volumen de TCA al 10%. Después, se centrifugó a 13000 g durante 15min a 4°C. El precipitado resultante se disolvió en 100µl de NaOH 0,2M, y seguidamente que se neutralizó con HCl 1M. La disolución obtenida se incubó con tampón de colagenasa (Tris-HCl, pH 7,6 20 mM y CaCl₂ 250mM de concentración final) y 10 unidades de colagenasa (Sigma) a 37°C durante toda la noche. Después, se añadieron 150 µl de TCA al 10% y se centrifugó a 13000 g durante 15min a 4°C. El sobrenadante resultante se añadió a 4ml de líquido de centelleo (*Cocktail Biogreen 3 for liquid scintillation*, Scharlau) y se midió la radioactividad en un contador de centelleo líquido LS 600 TA (Beckman Instruments).

B.5.- Inmunofluorescencia indirecta

Los distintos tipos de SMC (SMC-C, SMC-Ch y A10) utilizadas en estos experimentos se sembraron en portas escavados (null) y se tiñeron según el método descrito por Pickering *et al.* ⁵³⁰. Cuarenta y ocho horas después de alcanzada la

confluencia, se retiró el medio de cultivo, se lavó tres veces con PBS y se fijaron las células con acetona fría durante 10min. Después, se bloqueó con PBS suplementado con FBS al 10% durante toda la noche a 4°C. Una vez hecho el bloqueo, las preparaciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: anti-colágeno tipo I (SC 5972, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), anti-colágeno tipo III (3b2, DSHB) y anti-fibronectina (B₃/D₆, DSHB). La dilución de los anticuerpos varió dependiendo de las necesidades del experimento. De este modo, se usó una dilución 1/250 en aquellos casos en los que la concentración de la proteína en estudio era baja (y por tanto baja también la señal obtenida), y una dilución 1/1000 en los casos en los que había una alta concentración de ésta. La unión del anticuerpo primario a su antígeno se detectó con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado con fluoresceína (Sigma). Para todos los experimentos se utilizó una dilución 1/1000 de secundario y se incubó 1h a temperatura ambiente. Las preparaciones se cubrieron con una disolución de glicerol/PBS (9:1 vol/vol) que contenía Hoechst 33258 (2,5 µg/mL, Sigma), lo que se utilizó para conservar la preparación y teñir los núcleos. Las imágenes se tomaron con una cámara CCD fría acoplada a un microscopio de epifluorescencia.

B.6.- Extracción y cuantificación de RNA

La extracción 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: fenol⁵³¹. 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 6x10⁶ 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 $\mu\text{g} / \text{mL}$. La pureza de la muestra se estimó por la relación A260/A280. Considerando que una solución pura de RNA tiene una relación A260/A280 de $2 \pm 0,05$ (315).

B.6.1.- 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 10-15 μg de RNA, 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. La electroforesis se realizó en un gel de agarosa al 1 % en tampón MOPS 0,5x con un 3,5 % de formaldehído.

B.7.- Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se llevó a cabo mediante la retrotranscripción del mRNA. Se utilizó la retrotranscriptasa (RT) *PowerScript* (Clontech) en un volumen de reacción de 20 μL , según el método descrito por el fabricante. En primer lugar se incubaron 2 μg de RNA total con 500ng de Oligo(dT)12-18 como cebador (el cual hibrida con las poli-adeninas del mRNA) a 70°C (t^a de hibridación) 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 llevó a cabo

en un termociclador durante 90 minutos a 42°C, tras este tiempo la enzima se inactivó calentando la mezcla de reacción a 70°C durante 15 minutos.

B.8.- Cuantificación del cDNA: PCR a tiempo-real

La PCR a tiempo real se llevó a cabo utilizando el kit *Fast SYBR® Green Master Mix* (Roche) y el termociclador a tiempo real *Chromo4 PCR Detection System* (Biorad). La mezcla de reacción se preparó según las instrucciones del fabricante y se trabajó a un volumen final de 20 µL. La concentración cDNA de trabajo para cada muestra se estimó de forma que el Ct (ciclo donde la fluorescencia empieza a ser superior a la basal) de cada uno de los genes estudiados estuviera comprendido entre los ciclos 20 y 30. El programa de amplificación con los tiempos y las temperaturas se exponen en la siguiente tabla:

Programa: Preincubación		Ciclos:1
Segmento	Temperatura(°C)	Tiempo (seg.)
Desnaturalización	95	600
(eliminación del anticuerpo de la <i>Fast start</i>)		
Programa: Amplificación		Ciclos:40
Segmento	Temperatura(°C)	Tiempo (seg.)
1.- Desnaturalización	92	5

Material y métodos

2.-Hibridación de cebadores	60	8
3.-Elongación	72	20
4.- Adquisición de fluorescencia	82	3

Tabla B.1. Porgama de amplificación para PCR a tiempo real.

Los cebadores usados son específicos para las secuencias de pollo. Las secuencias se muestran en la siguiente tabla:

Gen	Cebador sentido (5´-3´)	Cebador anti-sentido(5´-3´)	Tamaño amplicón
<i>gapdh</i>	TTCTACACACGGACACTTC	CATCTTGGCTGGTTTCTC	109
<i>ppar</i>	CTTGACAGGAAAGACGACAG	CACAGAGCGAAACTGACATC	163
<i>srebp-1</i>	CGACAAGATCGTGGAGCTGAA	CTTGAGGGACTTGCTCTTCTG	175
<i>lxr</i>	CACTCAACTCAGCACACAG	AGACTTCATTTCCAGCATC	169
<i>col2a1</i>	GGACTTGGTGGAAACTTTGC	GTTGCCTTGAAATCCCTGG	139
<i>mmp2</i>	CAGGACAGATGGATACAGATGG	AGGAAGATGAAGGGGAATACAC	140
<i>col3a1</i>	ATCTGTGTGTGTGACTCTGG	GTTTTGTAGGCTGTGGTGTG	86
<i>fibronectina</i>	CTGTGTATGCTGTAAGTGGTC	TGCTGATGCTGTTGCCTG	89

Tabla B.2. Cebadores utilizados para PCR a tiempo Real.

Los productos de PCR se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa para comprobar el tamaño, la ausencia de contaminaciones y de dímeros de cebadores. La variación de expresión del RNA de cada gen se cuantificó de manera relativa. Este tipo de cuantificación se basa en calcular la variación de expresión que experimenta un gen problema bajo dos situaciones respecto a un gen de referencia (*housekeeping*), cuya expresión es invariable para esas condiciones, que en nuestro caso fue el *gapdh*.

Para realizar las curvas de eficiencia de nuestro experimento de cuantificación se tomó 1 μL de cDNA de cada muestra y se realizaron las siguientes diluciones de esa mezcla: $2,5 \times 10^{-1}$; 5×10^{-2} ; 1×10^{-2} ; 2×10^{-3} ; 4×10^{-4} ; 8×10^{-5} . De este modo, el patrón utilizado para calcular las curvas de eficiencia es lo más parecido posible a cada una de las muestras. Además, esto nos permitió calcular el rango de dilución a la cual debíamos de trabajar para que el Ct estuviera comprendido entre el 20 y el 30 para cada muestra.

La cuantificación relativa se realizó mediante el método de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$, dado que la eficiencia de amplificación calculadas para todos los fragmentos amplificados, eran comparables y compatibles con este método ⁵³². En este método se calcula la diferencia de expresión que experimenta un gen problema (por ejemplo *col1a2*) respecto a un gen de referencia (*gapdh*) bajo dos condiciones diferentes (controles vs tratamientos) mediante la siguiente fórmula:

Variación de la expresión = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

Donde $\Delta\Delta\text{Ct} = (\text{Ct}_{\text{muestra}} - \text{Ct}_{\text{control}})_{\text{gen problema}} - (\text{Ct}_{\text{muestra}} - \text{Ct}_{\text{control}})_{\text{gen referencia}}$

Este método es una simplificación del descrito por Michael W. Pfaffl ⁵³³, en la que se supone que las eficiencias de amplificación para el gen problema son iguales a

2. Para la utilización de este método es necesario calcular las eficiencias de amplificación de cada gen mediante curvas de eficiencia y comprobar que las rectas de calibración son paralelas y su pendiente muy próxima a 2, como ocurrió para cada uno de nuestros genes.

Con el fin de confirmar la precisión y reproducibilidad de los resultados, en cada una de las medidas de cada gen se introdujo una curva de eficiencia. Además, cada una de las muestras se midió por triplicado para cada gen. Los resultados de variación de expresión a nivel de mRNA obtenidos fueron la media de al menos 3 experimentos diferentes.

B.9.- Determinación de la actividad del promotor de *col1a2*.

Para poder determinar la actividad del promotor de gen *col1a2*, se transfectaron células SMC A10 de rata, con plásmidos recombinantes que contenían la secuencia del promotor proximal y la secuencia promotor proximal junto con las secuencias reguladoras corriente arriba.

B.9.1.- Plásmidos recombinantes

Las células SMC A10 de rata se transfectaron con dos plásmidos cedidos por el Doctor George Bou-Gharios⁵³⁴:

- -378pLAC: esta construcción contiene la secuencia comprendida entre las posición +54 a la -378 del promotor proximal en un plásmido cuyo gen reportero es *LacZ* (pβgal-Basic vector, Clontech).

- 20.8/17.5LAC: esta construcción contiene, además de la secuencia anterior del promotor proximal, las secuencias reguladoras del gen comprendidas entre las posiciones -20,8kb y -17,5 kb corriente arriba, que están contenidas en el mismo plásmido.

Además, las células se transfectaron al mismo tiempo con un vector de referencia, pGL3-Control Vector (Promega), que contiene la renilla luciferasa como gen reportero bajo el control del promotor y las secuencias reguladoras de SV40, y que se utilizó como control de transfección.

B.9.2.- Transfección y medida de la inducción del promotor mediante actividad luciferasa.

Para este experimento se sembraron células de SMC A10 de rata en placas de 24 pocillos a una densidad celular de 10^4 células por pocillo. Una vez llegadas a una confluencia del 90% se transfectaron con los plásmidos anteriormente descritos utilizando el *kit TransFast Transfection Reagent* (Promega) y siguiendo el protocolo de la casa comercial. Para la transfección se incubaron las células con 0,2 mL de medio sin suero ni antibióticos que contenía 1 μ g de DNA plasmídico (0,5 μ g de DNA de plásmido con el promotor en estudio y 0,5 μ g de DNA del vector de referencia) y 2 μ g de liposomas, durante 1h a temperatura ambiente. Posteriormente se añadió 1ml de medio completo y se dejó incubando durante 48h. Una vez terminado este tiempo, se lisaron las células con 0,15 mL de un tampón de lisis (*pasive lisis buffer*, Promega) que no interfiere en la actividad renilla luciferasa, ni de luciferasa de luciérnaga. Para medir el contenido de proteínas totales se utilizaron 50 μ l de esta disolución. Una vez conocida la concentración de proteínas, se normalizó la concentración de todas las muestras con tampón de lisis. Para la medida de actividad de β -galactosidasa, gen reportero de los plásmidos con la secuencia promotora en estudio (-378pLAC y 20.8/17.5LAC), se utilizó el kit *Beta-Glo Assay System* (Promega) y se siguió el

protocolo suministrado por el fabricante. Para la medida de la actividad de renilla luciferasa, gen reportero del vector de referencia (pGL3-Control Vector, que es control de transfección), se utilizó el kit *Renilla Luciferase Assay System* (Promega) y se siguió el protocolo del fabricante. La emisión lumínica de la muestra se midió en un luminómetro de microplacas micro *Top-Count* (Packard Instrument Co., Meriden, CT).

B.10.- Incorporación de [H³]-mevalonato

Se sembraron SMC y SMC-Ch en placas de cultivo de 12 pocillos a la misma densidad celular. Cuando las células llegaron al 90% de confluencia, se retiró el medio y se añadió 1 ml de medio de cultivo fresco que contenía 1 μ Ci de [H³]-mevalonato a cada pocillo.

El [H³]-mevalonato se obtuvo a partir de R,S-[2-H³]mevalonolactona (1,26 Ci/mmol) (Amersham). Para ello, la mevalonolactona tritiada se evaporó hasta sequedad y se hidrolizó mediante un tratamiento con NaOH 0,1 M a 37°C durante 1 hora. Una vez finalizado este tiempo se neutralizó con 0,1M de HCl y HEPES 100mM pH 7,4 y se utilizó inmediatamente para el experimento.

A las 48h de la incubación con mevalonato tritiado, se retiró el medio de cultivo y se lisaron las células con 200 μ l de NaOH 0,1M a 4°C durante toda la noche. Se tomó una alícuota de 100 μ l para medir proteínas totales mediante el método de Bradford. A los 100 μ l restantes se le añadieron 4ml de líquido de centelleo (*Cocktail Biogreen 3 for liquid scintillation*, Scharlau) y se midió la radioactividad en un contador de centelleo líquido LS 600 TA (Beckman Instruments).

B.11.- Determinación del estado de activación de Rho A

Las proteínas G de membrana actúan como interruptores moleculares en respuesta a estímulos, pasando de un modo inactivo (unidas a GDP) a un modo activo (unidas a GTP). Una vez activas se unen a sus efectores, lo que desencadena una cascada de activación dependiente de estas proteínas.

La medida el estado de activación de Rho A en cada una de las muestras se realizó mediante la técnica de *pull-down*, utilizando para ello un *kit* comercial (Rho A *activation assay Biochem Kit*, Cytoskeleton). Esta técnica se basa en la utilización de una proteína de fusión que contiene el dominio de unión a Rho (RBD) de su efector más importante (RHOCK), unido a glutatión-transferasa. Así, esta quimera se unirá a Rho A activa y a glutatión, de modo que si incubamos esta proteína de fusión con el extracto celular total y glutatión inmovilizado en una resina, podremos separar la forma activa de Rho A de la inactiva por centrifugación (quedando Rho A inactiva en el sobrenadante y la forma activa en el sedimento) y así cuantificarla.

Para la separación de la fracción activa e inactiva de Rho A se partió de 10^7 células aproximadamente, y se utilizaron los reactivos y el protocolo suministrados por la casa comercial. Así, transcurridas 48h desde el inicio de cada tratamiento, se introdujo la placa de cultivo en hielo, se retiró el medio de cultivo y se lavo con PBS frío. Tras esto, se añadieron 200 μ l de tampón de lisis y se raspó para recoger la mayor cantidad de extracto. Después, se centrifugó a 10000 g y 4°C durante 2 minutos. El resto se dividió en dos fracciones, una para medir la cantidad de Rho A total y proteínas totales (100 μ l), y otra para (100 μ l) para separar Rho A unida a GTP de Rho A unida a GDP. A esta última alícuota se le añadieron 50 μ g de resina unida a glutatión y se incubo a 4°C durante 1h en agitación. Tras esto, se centrifugó a 5000 x g a 4°C durante 1 minuto. Se retiró el sobrenadante y el pellet se lavó con 500 μ l de tampón de lavado. Tras esto se centrifugó a 5000 x g a 4°C durante 3 minutos. Se retiró el sobrenadante y se añadieron 20 μ l de tampón de muestra (4% SDS, 20% glicerol, 10% 2-mercaptoetanol, 0.004% azul de bromofenol and 0.125 M Tris HCl, pH 6.8) y se calentó a 100 °C durante 2 minutos. .

La cuantificación semicuantitativa de la cantidad de Rho A en cada fracción se realizó transfiriendo a una membrana mediante la técnica de *dot blot*. Para ello, se midió la concentración de proteína total en la fracción de Rho A total y se normalizó la concentración de proteína total, para que fuera idéntica en todas las muestras (2µg/µL). La fracción con Rho A activa, donde la concentración de proteína no se puede medir por interferencia de la resina empleada, se normalizó en base a los datos obtenidos para la fracción de Rho A total. A continuación, se añadió 2 µL de muestra a una membrana de nitrocelulosa y se incubó a 37°C 1h, para asegurar que las gotas estaban secas. Tras esto, se bloqueó la membrana en *bloto* (5% leche en polvo, 0,05% Tween-20 en TBS o PBS pH 7,4) durante 1h a temperatura ambiente, y se incubaron con el anticuerpo primario frente a Rho A suministrado en el Kit (ARH01, Cytoeskeleton) a una dilución 1/1000 durante 1h a temperatura ambiente. Después se lavó tres veces la membrana con 0,05% Tween-20 en PBS pH 7,4 y se incubó con un anticuerpo secundario anti Ig total de ratón unido a peroxidasa (Sigma) a una dilución 1/5000 durante 1h a temperatura ambiente.

La detección se realizó mediante el sistema de quimioluminiscencia *Immobilon Western Detection Reagents* (Millipore) y la impresión se realizó en papel fotográfico (Konica Minolta). 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 IMAGEJ (National Institutes of Health, Estados Unidos).

B.12.- Obtención de mutantes dominantes negativos y positivos de Rho A y H-Ras.

Para la obtención de los distintos mutantes realizamos una transfección estable con los siguientes plásmidos recombinantes adquiridos a *UMR cDNA Resource Center (Missouri S&T)*:

- T19N: contiene el marco abierto de lectura del gen que codifica a la Rho A humana clonado en pcDNA3.1+ (Invitrogen) entre los puntos de corte EcoRI (5') y Xho I (3') del sitio de multiclonaje de este vector. El inserto presenta un tamaño de 600pb y contiene una mutación que confiere un fenotipo dominante negativo respecto a Rho A.
- G14V: este plásmido es exactamente igual que T19N, con la única diferencia de que la mutación introducida confiere a la célula un fenotipo dominante positivo respecto a Rho A.
- S17N: contiene el marco abierto de lectura del gen que codifica a la H-Ras humana clonado en pcDNA3.1+ (Invitrogen) entre los puntos de corte BamH I (5') y Xho I (3') del sitio de multiclonaje de este vector. El inserto presenta un tamaño de 570pb y contiene una mutación que confiere un fenotipo dominante negativo respecto a H-Ras.
- G12V: este plásmido es exactamente igual que S17N, solo que la mutación introducida confiere a la célula un fenotipo dominante positivo respecto a H-Ras.

Es importante destacar que la transfección con estos plásmidos no produce mutantes nulos para estos genes, sino que la sobre expresión de la proteína

constitutivamente activa o inactiva inhibe la expresión y la activación de la proteína nativa.

Para la transfección se utilizaron cultivos de SMC A10 y el kit *TransFast™ Transfection Reagent* (Promega) mediante el método descrito con anterioridad. Para la selección clonal, se retiró el medio 48h después de la transfección y se añadió medio de cultivo completo suplementado con geneticina (Promega) a una concentración final de 500 µg/mL. Una vez que las colonias fueron seleccionadas (a las 2-3 semanas) se pasaron a nuevas placas de cultivo y se disminuyó la cantidad de geneticina a 100 µg/mL. Las células se usaron entre los pases 6-12 después de la transfección.

B.13.- Cuantificación de proteínas

Las proteínas totales se determinaron por el método de Bradford ⁵²⁹. Para ello se utilizó el kit *Biorad protein assay* (Bio-rad) y BSA como patrón. Este método se basa en la unión de un colorante (azul de coomasie G-250) a los aminoácidos básicos y aromáticos de las proteínas. De este modo, el colorante unido a proteína produce un cambio de color (el máximo de absorción varía de 465 nm a 595 nm cuando se une a proteína), que es proporcional a la concentración de proteína. La determinación se hizo siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante para medida en microplacas. Así, a cada pocillo se añadieron 10µl de BSA patrón (1mg/ml, 0,5mg/ml, 0,25 mg/ml, 0,125 mg/ml) o la muestra y 200 µl del reactivo colorante diluido (1/5). Se mezcló agitando durante 15min y se midió a 595 nm en un espectrofotómetro de microplacas.

B.14.- Análisis estadístico de los resultados.

El análisis estadístico de los resultados se llevo a cabo empleado el paquete estadístico Simaplot 10.0 con SigmaStat 3.5 para Windows (Systat Software. Inc.). Los resultados se expresaron como media \pm error estándar de la media. La significación estadística se comprobó mediante el test de la *t-Student* y se consideraron significativas diferencias con $P < 0,05$.

Resultados

C.1.- Efecto del colesterol en la producción de proteínas de la matriz extracelular.

C.1.1.- Efecto del colesterol sobre la síntesis de colágeno (incorporación de [H^3]-prolina).

La prolina es uno de los aminoácidos mayoritarios de los que constituyen la molécula de colágeno. Así, se utiliza la incorporación de prolina a la fracción de proteínas celulares susceptible de hidrólisis por colagenasa como medida aproximada de la síntesis de colágeno.

En la figura C.1 y la tabla C.1 se muestran la incorporación de [H^3]-prolina a colágenos en SMC-C procedentes de animales controles, SMC-Ch procedentes de animales hipercolesterolémicos (aporte de colesterol *in vivo*) y SMC-C tratadas con colesterol soluble (aporte de colesterol *in vitro*).

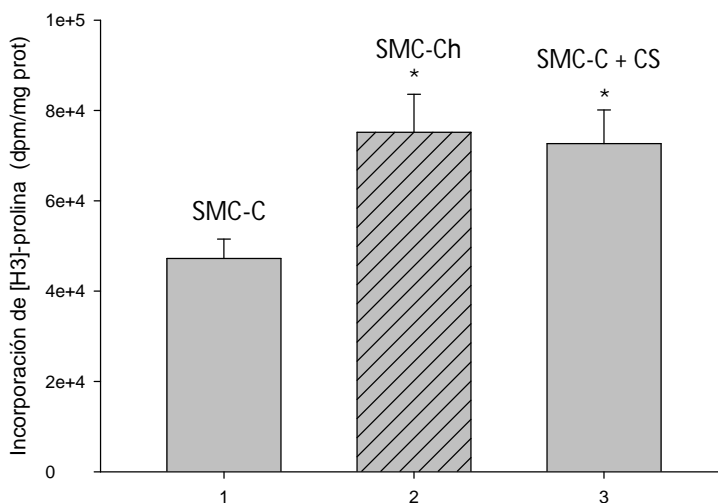


Figura C1. Incorporación de [H³]-prolina a proteínas sensibles a hidrólisis por colagenasa (dpm/mg proteína) en SMC-C, SMC-Ch y SMC-C tratadas con colesterol soluble (SMC-C + CS). Los resultados están expresados como media ± SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$).

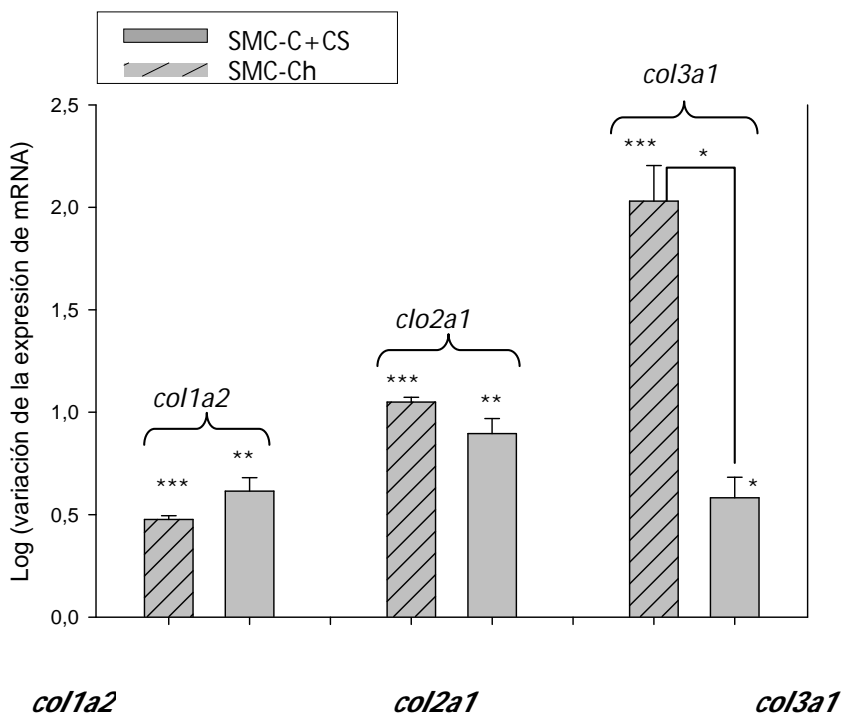
muestra	SMC-C	SMC-Ch	SMC-C+CS
dpm/mg prot	47221±4299	75184± 8405	72661± 7447

Tabla C.1. Incorporación de [H³]-prolina a proteínas sensibles a hidrólisis por colagenasa en SMC-C, SMC-Ch y SMC-C tratadas con colesterol soluble. Los datos (dpm/mg proteína) son la media ± SEM de al menos 3 determinaciones. Datos representados en figura C.1.

La síntesis de colágeno tanto en las SMC-Ch, procedentes de animales con dietas hipercolesterolémicas (aporte de colesterol *in vivo*), como en SMC-C tratadas con colesterol soluble (aporte de colesterol *in vitro*), está incrementada frente a la encontrada en SMC-C. Además, no se encontraron diferencias significativas entre la variación que producen ambos aportes de colesterol en la síntesis de colágeno.

C.1.2.- Efecto del colesterol sobre la expresión de los genes que codifican los colágenos tipo I, II y III

La figura R2 muestra la variación de expresión, a nivel de mRNA, para los genes *coll1a2*, *col2a1* y *col3a1* con respecto *gapdh*, en cultivos de SMC-Ch, SMC-C y SMC-C tratado con colesterol soluble.



		<i>col1a2</i>		<i>col2a1</i>		<i>col3a1</i>	
SMC-C	SMC-Ch	SMC-C+CS	SMC-Ch	SMC-C+CS	SMC-Ch	SMC-C+CS	
1	3,00	4,14	11,22	7,925	111,56	3,87	

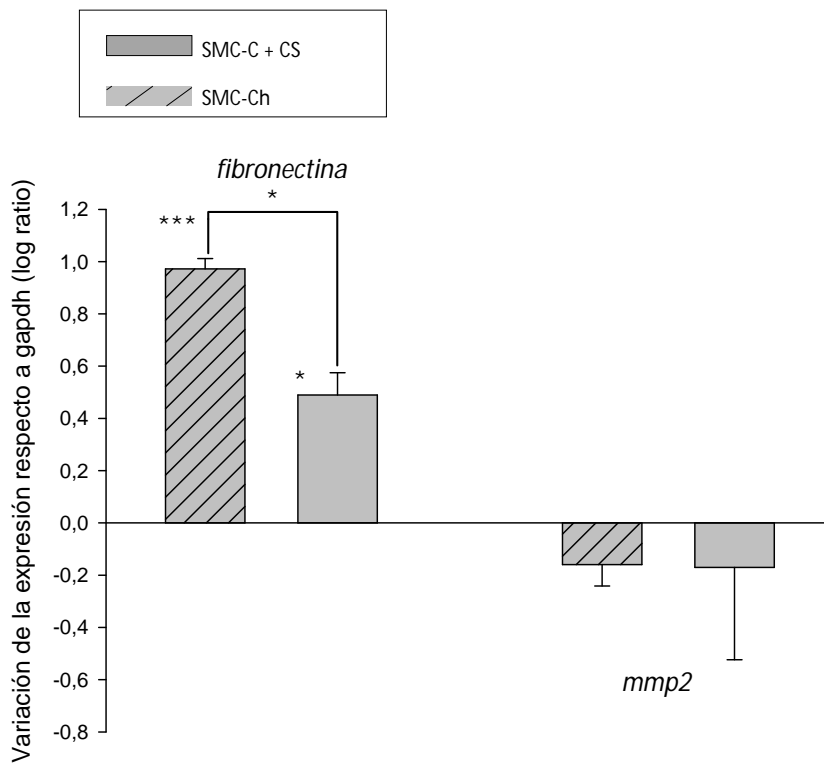
Figura. C.2. Variación de la expresión (mRNA) de los genes *col1a2*, *col2a1* y *col3a2* (con respecto a *gapdh*), en SMC-Ch y en SMC-C tratadas con colesterol soluble con respecto a SMC-C, representado como el logaritmo de esta relación. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

El colesterol soluble *in vitro* produce un efecto en la expresión de los tres colágenos estudiados similar al que se produce por un aporte de colesterol en la dieta de los animales (cultivos SMC-Ch). No se encontraron diferencias significativas entre la variación que producen ambos aportes de colesterol para los genes *col1a2* y *col2a1*. En el caso de *col3a1*, el colesterol en la dieta (cultivos SMC-Ch) incrementa bastante

más la expresión de este gen, encontrando diferencias significativas entre SMC-Ch y SMC-C tratadas con colesterol soluble.

C.1.3.- Efecto del colesterol sobre la expresión de los genes que codifican la fibronectina y la MMP2

La figura C.3 muestra la variación de expresión, a nivel de mRNA, de los genes *fibronectina* y *mmp2* con respecto al gen *gapdh*, en cultivos de SMC-Ch, SMC-C y SMC-C tratados con colesterol soluble.



<i>fibronectina</i>			<i>mmp2</i>		
SMC-C	SMC-Ch	SMC-CS	SMC-C	SMC-Ch	SMC-CS
1	9,39	3,12	1	0,70	0,79

Figura.C.3. Variación de la expresión (mRNA) de los genes *fibronectina* y *mmp2* (con respecto a *gapdh*), en SMC-Ch y en SMC-C tratadas con colesterol soluble con respecto a SMC-C, representado como el logaritmo de esta relación. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; *** $P < 0,0005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

El aporte de colesterol tanto *in vivo*, mediante la dieta (cultivos SMC-Ch), como *in vitro* mediante colesterol soluble en el cultivo SMC-C (SMC-C+CS), produce un efecto muy similar en la expresión de ambos genes. El gen de la fibronectina incrementa mucho su expresión, mientras que no se encuentran diferencias significativas en la expresión de la *mmp2*.

C.1.4.- Inmunofluorescencia indirecta de colágeno tipo I, III y fibronectina en cultivos primarios de SMC-C y SMC-Ch.

La figura R4 muestra la expresión de los colágenos tipo I y III y la fibronectina mediante inmunofluorescencia indirecta en cultivos de SMC-C y SMC-Ch.

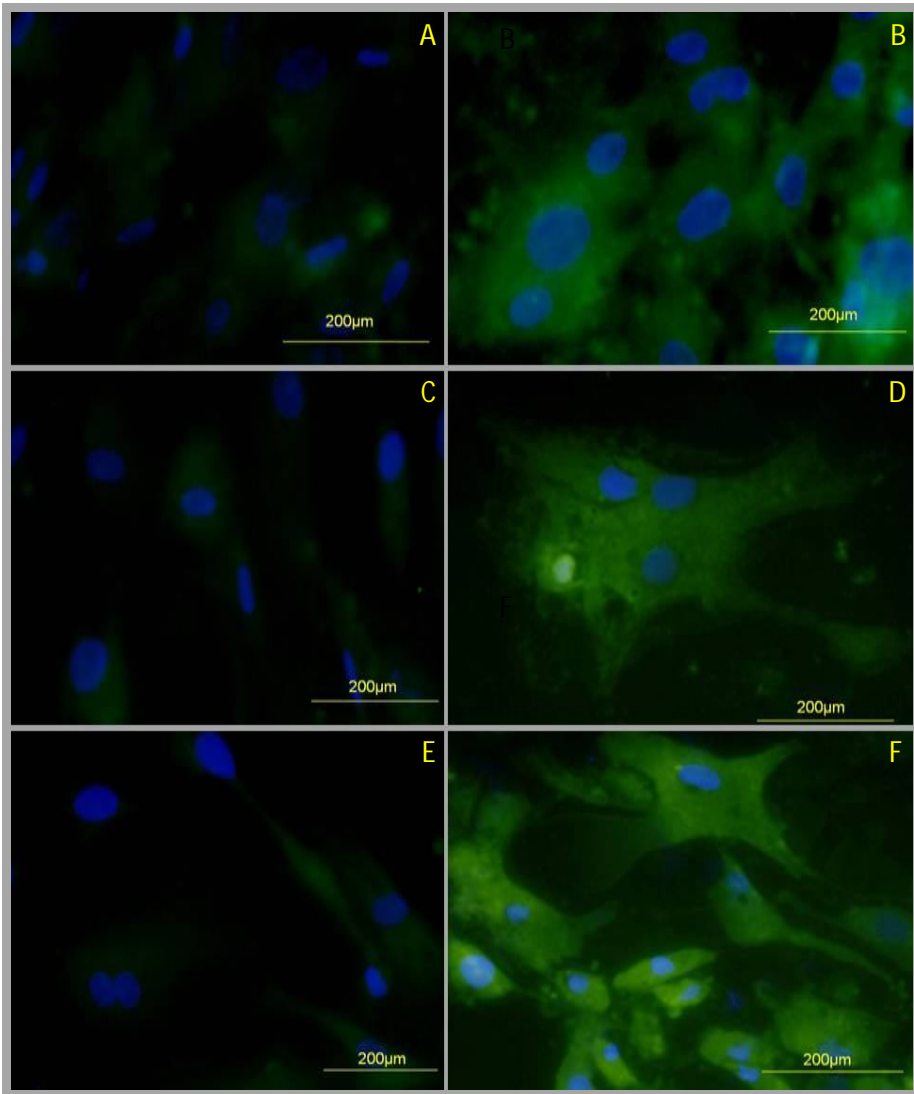


Figura C.4. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta, de colágeno I y III y fibronectina. Los núcleos están teñidos con Hoechst (azul) y la proteína en estudio con un anticuerpo primario específico (1/1000) y un secundario (1/1000) unido a fluoresceína. A y B muestran las imágenes obtenidas para SMC-C y SMC-Ch respectivamente utilizando anti-colágeno I como primario. C y D muestran las imágenes obtenidas para SMC-C y SMC-Ch con anti-colágeno III

como primario. E y F muestran las imágenes obtenidas para SMC-C y SMC-Ch con anti-fibronectina. Las imágenes son 40x.

En las imágenes se aprecia claramente que en SMC-Ch se produce un fuerte incremento en la expresión de las tres proteínas de la ECM estudiadas.

C.1.5.- Inmunofluorescencia indirecta de colágeno tipo I, III y fibronectina en cultivos primarios de SMC-C y SMC-C tratadas con colesterol soluble.

La figura C.5 muestra el efecto del colesterol:metil- β -ciclodextrina sobre la expresión de los colágenos tipo I y III y fibronectina en cultivos de SMC.

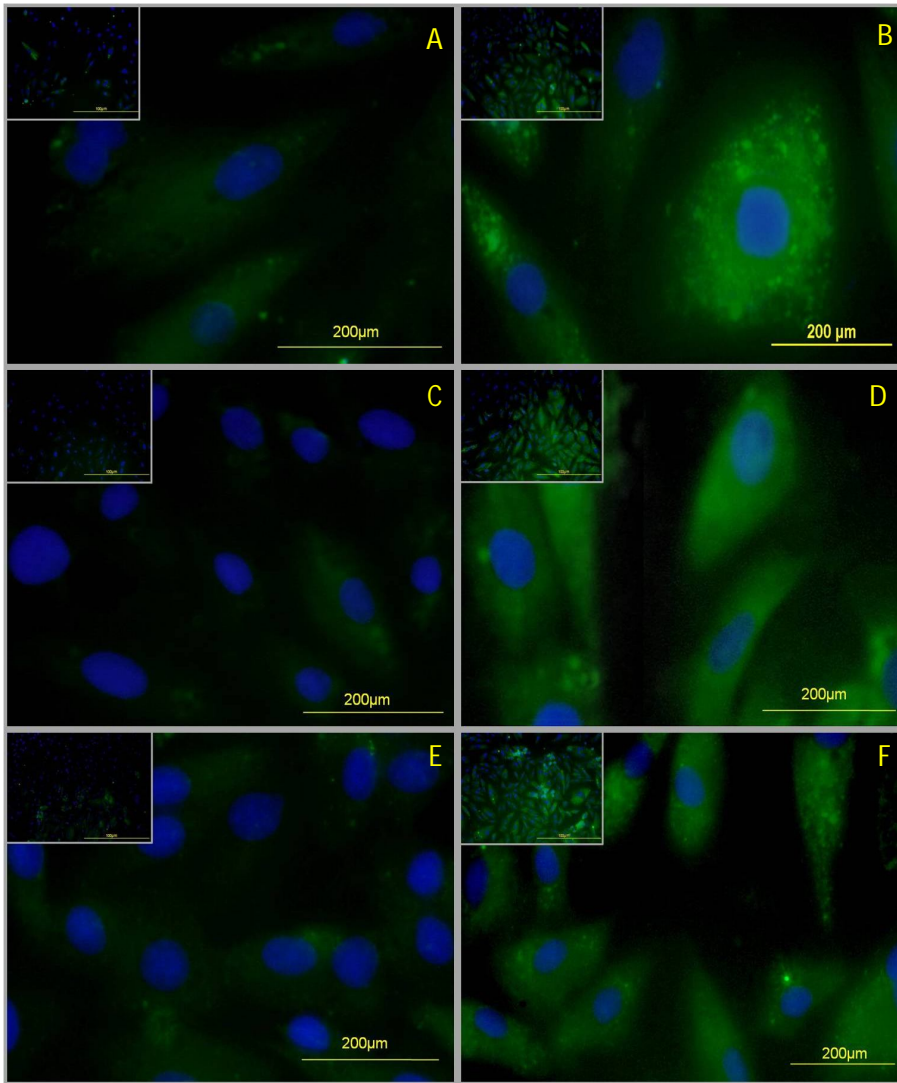


Figura C.5. Imágenes de inmunofluorescencia indirecta, de colágeno I y III y fibronectina. Los núcleos están teñidos con Hoechst (azul) y la proteína en estudio con un anticuerpo primario específico (1/1000) y un secundario (1/1000) unido a fluoresceína. A y B muestran las imágenes obtenidas para SMC-C y SMC-C tratadas con colesterol soluble utilizando anti-colágeno I como primario. C y D muestran las imágenes obtenidas para SMC-C y SMC-C tratadas con colesterol soluble con anti-colágeno III como primario. E y F muestran las imágenes

obtenidas para SMC-C y SMC-C tratadas con colesterol soluble con anti-fibronectina como primario. Las imágenes son 40x y 10x (imagen superior izquierda).

El tratamiento de las SMC-C con colesterol:metil- β -ciclodextrina produce un incremento de la expresión de los colágenos tipo I y III y fibronectina similar al que se produce en los cultivos primarios SMC-Ch (procedentes de animal hipercolesterolémicos por dieta de colesterol) con respecto a SMC-C.

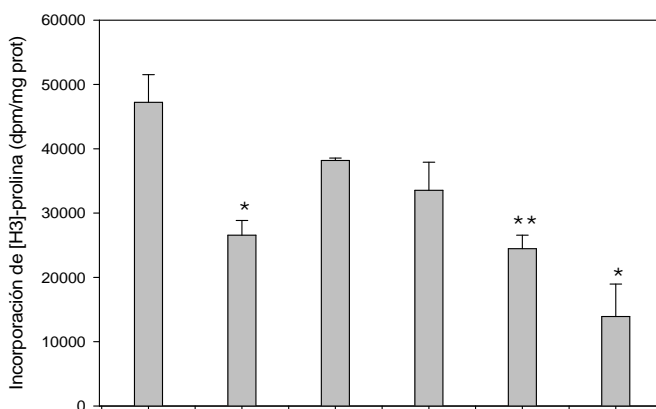
C.2.- Papel de la ruta del mevalonato en la producción y remodelación de la ECM en cultivos de SMC: efecto de las estatinas

Las estatinas son inhibidores específicos de la HMG-CoA reductasa, el enzima principal en la regulación de la biosíntesis de colesterol, y uno de los fármacos hipolipemiantes más utilizados como tratamiento de la hipercolesterolemia y en la prevención de enfermedades cardio vasculares. Además de sus efectos hipolipemiantes, se han descrito diferentes efectos de estos medicamentos independientes de los niveles plasmáticos de lípidos plasmáticos. Estos efectos se denominan pleiotrópicos y contribuyen al resultado beneficioso de las estatinas. Una de las causas propuestas en la bibliografía por la que se producen estos efectos, es la inhibición de la isoprenilación de proteínas. La falta de isoprenoides como consecuencia de la inhibición de la vía de mevalonato, produciría la inactivación de muchas proteínas de señalización claves en los cambios en las SMC producidos en la aterosclerosis. De este modo, tratamos las SMC-C y SMC-Ch con mevalonato, GGPP y con inhibidores específicos de farnesil y geranil-geranil transferasas para determinar si el colesterol y las estatinas median la expresión de las proteínas de matriz estudiadas alterando la isoprenilación de proteínas en las SMC.

C.2.1.- Síntesis de colágeno (incorporación de [H³]-prolina).

En la figura C.6 y tabla C.2 se muestran los efectos sobre la síntesis de colágeno que producen los siguientes compuestos en SMC-C y SMC-Ch: lovastatina, mevalonato, geranylgeranyl pirofosfato, manumicina A y GGTI-298. Medidos como incorporación de [H³]-prolina según el método de Peterkofsky.

SMC-C



Lovastatina	-	+	+	+	-	-
Mevalonato	-	-	+	-	-	-
GGPP	-	-	-	+	-	-
Manumicina A	-	-	-	-	+	-
GGTI-298	-	-	-	-	-	+

SMC-Ch

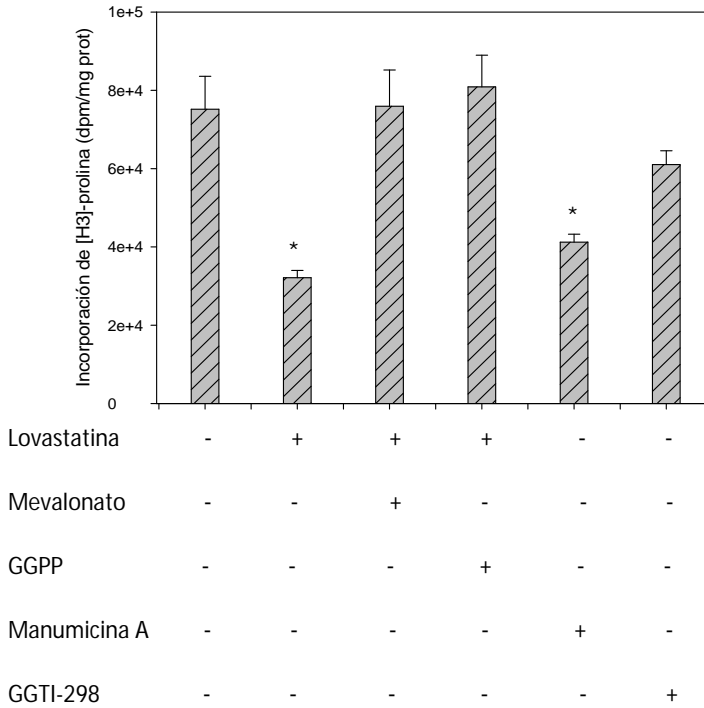


Figura C.6. Incorporación de [H³]-prolina a proteínas sensibles a hidrólisis por collagenasa en SMC-C y SMC-Ch. Los resultados (dpm/mg proteína) están expresados como media ± SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$).

	SMC-C	SMC-Ch
Control	47221 ± 4299	75184 ± 8405
Lovastatina	26565 ± 2275	32131 ± 1853
Lovastatina + Mevalonato	38178 ± 336,0	75937 ± 9269
Lovastatina + GGPP	33546 ± 4358	80885 ± 8094
Manumicina A	24457 ± 2109	41211 ± 2053
GGTI-298	13910 ± 5042	61049 ± 3520

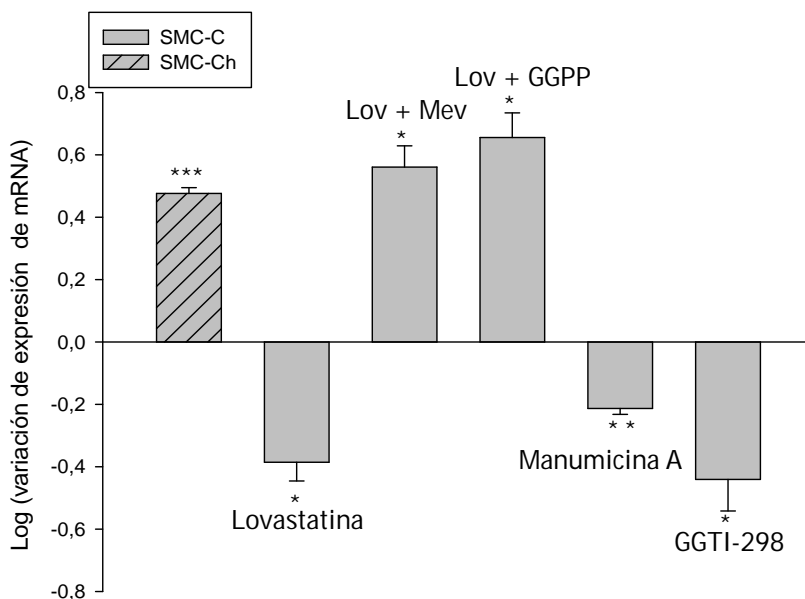
Tabla C.2. Incorporación de [H^3]-prolina a proteínas sensibles a hidrólisis por colagenasa en SMC-C y SMC-Ch. Los datos (dpm/mg proteína) son la media \pm SEM de al menos 3 determinaciones. Datos representados en figura C.6.

La síntesis de colágeno se incrementa 1,6 veces en SMC-Ch con respecto a SMC-C. Esta diferencia revierte al tratar las SMC-Ch con lovastatina, a niveles incluso inferiores a los encontrados en SMC-C. La adición de mevalonato o GGPP revierte el efecto de la lovastatina hasta niveles basales, tanto en SMC-C como en SMC-Ch. La manumicina A tiene un efecto muy similar a los anteriores, tanto en SMC-C como en SMC-Ch. El GGTI-298 reduce la incorporación de prolina a colágenos a un 27% en SMC-C. Este efecto se pierde en las células procedentes de pollos con hipercolesterolemia (SMC-Ch), ya que la disminución de la síntesis de colágeno no llega a ser significativa.

C.2.2.- Expresión de genes que codifican los colágenos tipo I, II y III

C.2.2.1.- Gen *col1a2* (colágeno, tipo I, α 2)

La figura R7 muestra la variación de expresión, a nivel de mRNA, para el gen *col1a2*, con respecto al gen de referencia *gapdh*, en las SMC incubadas con distintos tratamientos.



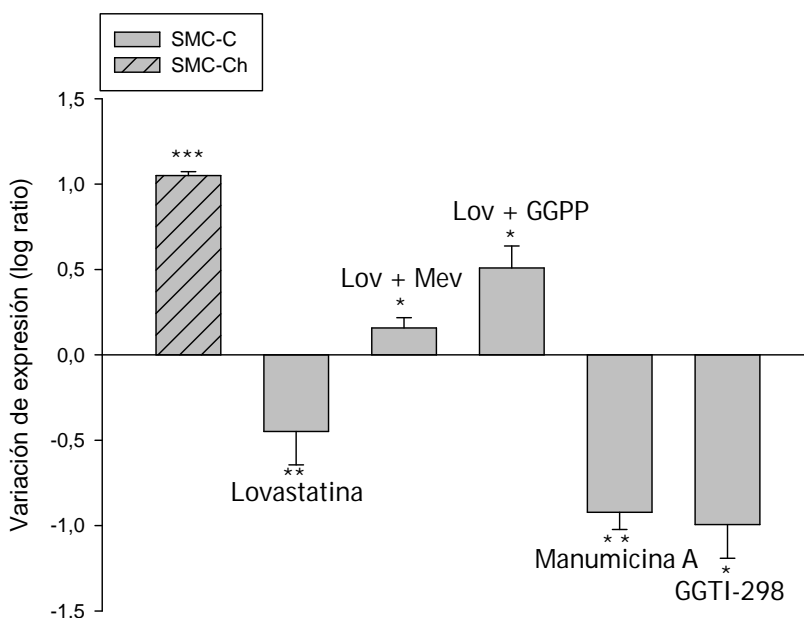
SMC-C	SMC-Ch	Lovastatina	Lov+Mev	Lov + GGPP	Manumicina A	GGTI-298
1	3,00	0,41	3,634	4,53	0,61	0,07

Figura C.7. Variación de la expresión del gen *col1a2* a nivel del mRNA, con respecto a *gapdh*, en cultivos SMC-C y SMC-Ch con distintos tratamientos. Los datos se representan como el logaritmo de esta relación. Lov: lovastatina; Lov+mev: lovastatina + mevalonato; lov + GGPP: lovastatina + geranil geranil pirofosfato. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

En cultivos SMC-Ch se incrementa la expresión del gen *col1a2* que codifica la cadena pro- $\alpha 2$ (I) del colágeno tipo I. La lovastatina inhibe la expresión del gen, efecto que se revierte por el mevalonato y especialmente por GGPP. Esta reversión es tan importante que incluso llega a superar la expresión obtenida en las SMC-Ch. La inhibición de farnesil transferasa por la manumicina A y la de geranilgeranil transferasa por GGTI-298 producen efectos similares a la lovastatina.

C.2.2.2.-Gen *col2a1* (Colágeno, tipo II, alpha1)

La figura C.8 muestra la variación de expresión obtenida a nivel del mRNA del gen *col2a1*, con respecto a *gapdh*, en las SMC con los distintos tratamientos.



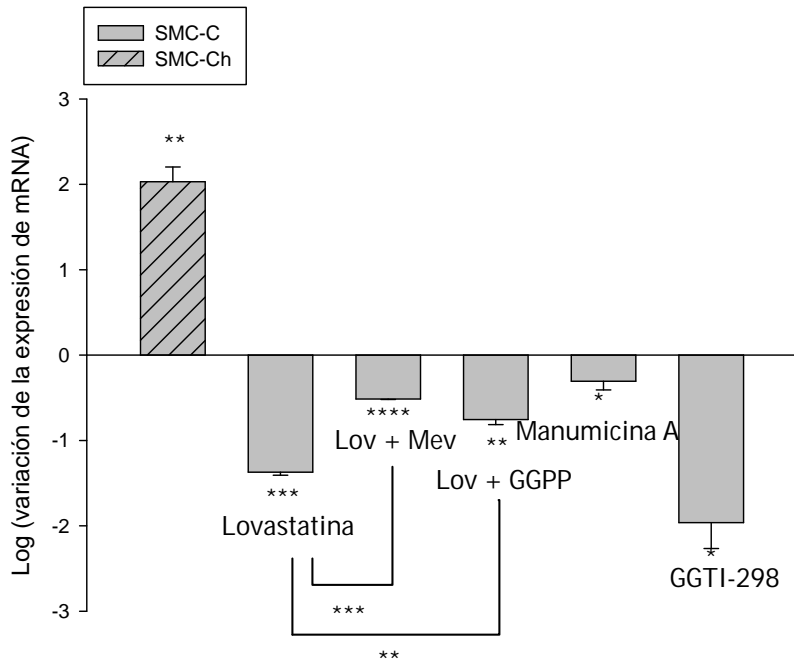
SMC-C	SMC-Ch	Lovastatina	Lov+Mev	Lov+GGPP	Manumicina A	GGTI-298
1	11,22	0,36	1,44	3,23	0,12	0,10

Figura C.8. Variación de la expresión (mRNA) del gen *col1a2* con respecto a *gapdh*, en cultivos SMC-C y SMC-Ch con los distintos tratamientos, representado como el logaritmo de esta relación. Lov: lovastatina; Lov+mev: lovastatina + mevalonato; lov +GGPP: lovastatina + geranil geranil pirofosfato. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

Los resultados muestran que en los cultivos SMC-Ch incrementa la expresión del gen *col2a1* que codifica la cadena pro- $\alpha 1$ (II) del colágeno tipo II, con respecto a SMC-C. La lovastatina reprime la expresión del gen, efecto que se ve revertido por el mevalonato y especialmente por GGPP. Tanto manumicina A como GGTI-298 producen un gran efecto represor, dejando la expresión del gen en un 10% respecto a las células sin tratar.

C.2.2.3.- Gen *col3a1* (Colágeno, tipo III, alpha1)

La figura C.9 muestra la variación de expresión obtenida, a nivel de mRNA, para el gen *col3a1*, con respecto al gen *gapdh*, en SMC con los distintos tratamientos.



SMC-C	SMC-Ch	Lovastatina	Lov+Mev	Lov+GGPP	Manumicina A	GGTI-298
1	107,23	0,04	0,30	0,18	0,18	0,01

Figura C.9. Variación de la expresión (mRNA) del gen *col3a1* con respecto a *gapdh*, en cultivos SMC-C y SMC-Ch con los distintos tratamientos, representado como el logaritmo de esta relación. Lov: lovastatina; Lov+mev: lovastatina + mevalonato; lov +GGPP: lovastatina + geranil geranil pirofosfato. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

El colesterol de la dieta (cultivos SMC-Ch) incrementa enormemente (107 veces) la expresión de la del gen *col3a1* que codifica la cadena pro- α 1 (III) del colágeno tipo III. Por otro lado, el tratamiento de las SMC-C con lovastatina produce una represión en la expresión del gen muy fuerte (25 veces menos expresión que en SMC-C). Este efecto solo es contrarrestado en parte al añadir mevalonato (7,5 veces mayor expresión que cuando solo se trata con lovastatina) y GGPP (4,5 veces más expresión que en SMC-C tratadas con lovastatinas), sin embargo sigue siendo menor que en SMC-C en ambos casos. Del mismo modo, los tratamientos con inhibidores de prenil transferasas también producen un efecto similar, que es especialmente fuerte en el caso del GGTI-298, que reprime en dos órdenes de magnitud la expresión del gen con respecto al estado basal.

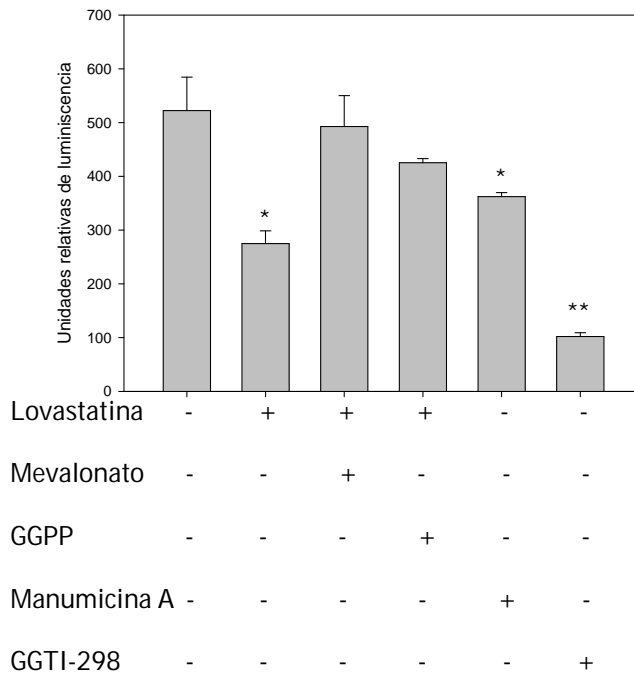
C.2. 3.- Efecto de las estatinas a nivel del promotor de *col1a2*

Con el fin de estudiar el efecto de las estatinas a nivel del promotor de *col1a2* en las SMC, se transfectaron células SMC A10 de rata con dos plásmidos recombinantes diferentes: -378pLAC (promotor proximal) y 20.8/17.5LAC (promotor proximal + secuencias reguladoras -20,8 a -17.5kb). Además, las células se transfectaron al mismo tiempo con un vector de referencia, pGL3-Control Vector, que se utilizó como control de transfección.

Resultados

En la figura C.10 y tabla C.3 se muestran los efectos de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa y las preniltransferasas sobre el promotor de *col2a1*, así como la reversión por los metabolitos derivados de la reacción de estos enzimas, medido como unidades de luminiscencia de β -galactosidasa (problema) con respecto a las obtenidas para la renilla luciferasa (control).

A)



Resultados

B)

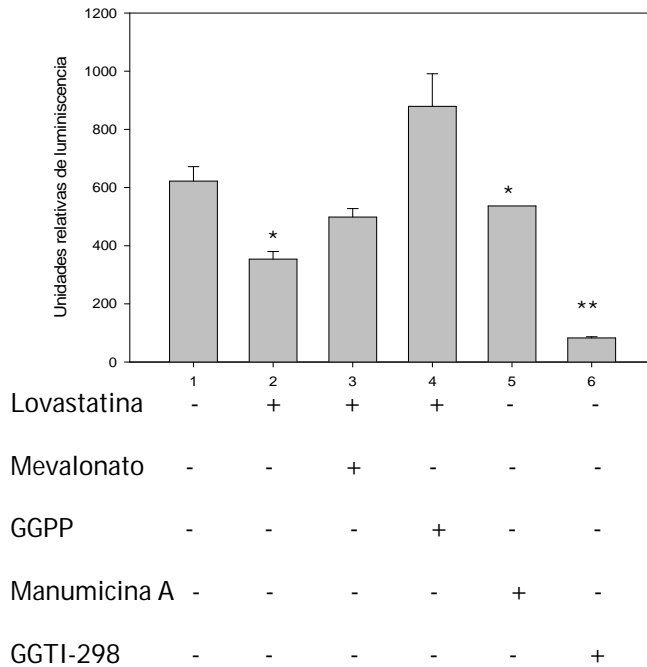


Figura C.10. Efecto de la lovastatina y los inhibidores de preniltransferasas en la activación del promotor de *col1a2*, cuantificado como luminiscencia relativa (β -galactosidasa/renilla luciferasa). A) Valores obtenidos para -378pLAC. B) valores obtenidos para 20.8/17.5LAC. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$).

	-378pLAC	20.8/17.5LAC
Control	522,2 \pm 62,21	621,9 \pm 49,83
Lovastatina	275,0 \pm 23,57	353,6 \pm 26,35
Lovastatina + Mevalonato	492,6 \pm 57,60	498,3 \pm 29,19
Lovastatina + GGPP	425,3 \pm 7,561	879,2 \pm 112,0
Manumicina A	362,2 \pm 7,632	536,3 \pm 0,4281

GGTI-298	102,1 ±7,071	82,64±4,345
----------	--------------	-------------

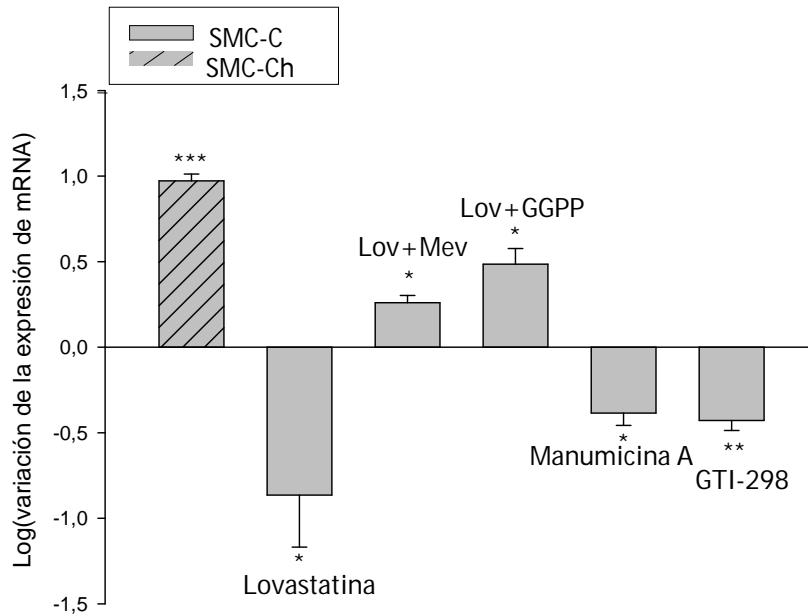
Tabla C.3. Valores de luminiscencia relativa, medidos como unidades de luminiscencia de β -galactosidasa con respecto a renilla luciferasa. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones. Datos representados en figura C.10.

La lovastatina inhibe la transcripción del *col2a1* inhibiendo la activación de su promotor. Este efecto se revierte al añadir al medio de cultivo mevalonato y especialmente GGPP. La inhibición de farnesil transferasa por manumicina A disminuye la activación del promotor de *col2a1* un 40%. No obstante, el mayor efecto se encuentra cuando inhibimos la geranyl transferasa con GGTI-298, en donde la actividad del promotor baja aproximadamente un 85% respecto al control. No se encontraron diferencias significativas entre los datos obtenidos para -378LAC y 20.8/17.5LAC, lo que indica que estos efectos se ejercen a nivel del promotor proximal y no por las secuencias reguladoras de éste.

C.2. 4.- Expresión de los genes que codifican para la fibronectina y la MMP2.

C.2. 4.1.- Gen fibronectina

La figura C.11 muestra la variación de expresión a nivel de mRNA, para el gen *fibronectina* con respecto al gen *gapdh*, en SMC con los distintos tratamientos.



SMC-C	SMC-Ch	Lovastatina	Lov+Mev	Lov+GGPP	Manumicina	GGTI-298
1	9,3	0,14	1,82	3,05	0,39	0,42

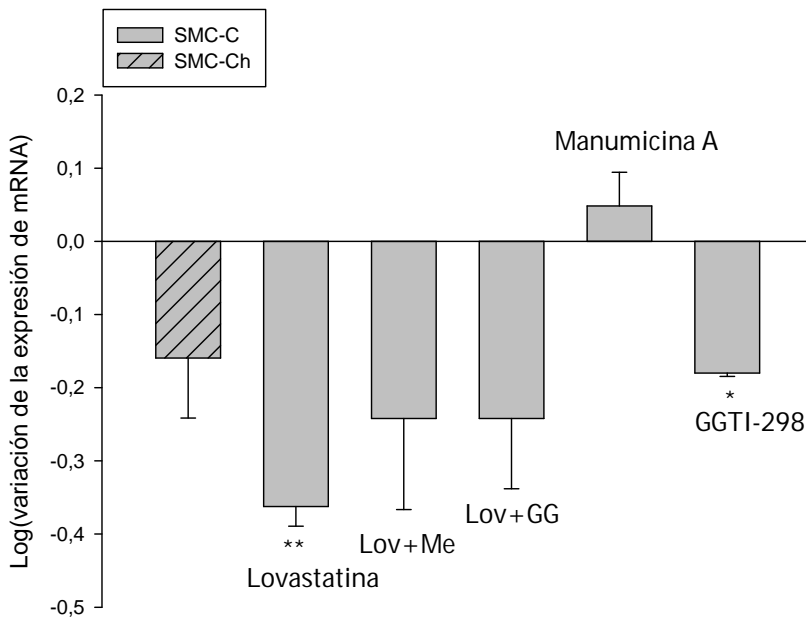
Figura C.11. Variación de la expresión (mRNA) del gen *fibronectina* con respecto a *gapdh*, en cultivos SMC-C y SMC-Ch con los distintos tratamientos, representado como el logaritmo de esta relación. Lov: lovastatina; Lov+mev: lovastatina + mevalonato; lov +GGPP: lovastatina + geranilgeranil pirofosfato. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

La expresión del gen de la fibronectina en SMC-Ch está inducida con respecto a SMC-C. La lovastatina reprime la expresión, lo que revierte al añadir mevalonato y GGPP. Tanto manumicina A como GTI-298 inhiben la expresión de un modo similar a la lovastatina, lo que evidencia que esta variación de expresión génica se debe a cambios en la actividad de preniltransferasas.

C.2. 4.2.- Gen *mmp2*

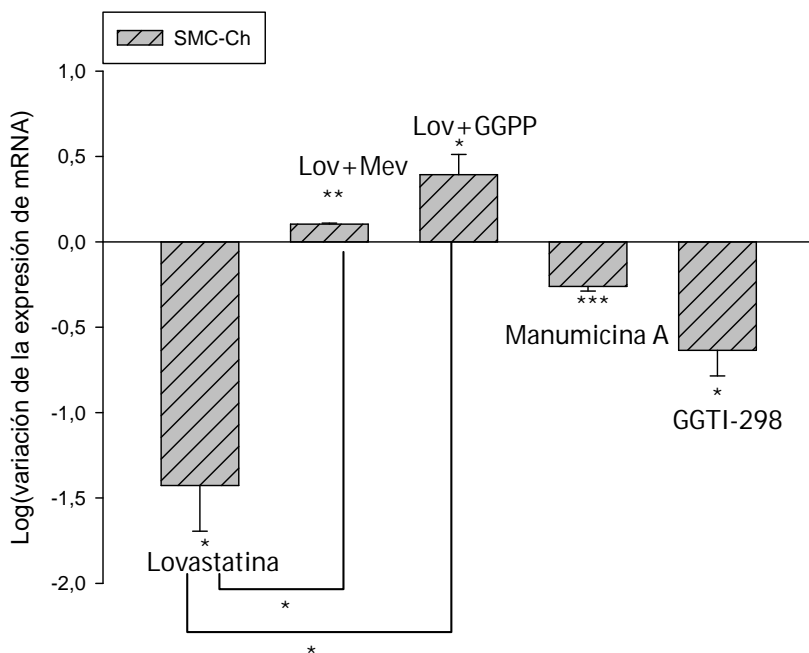
La figura C.12 muestra la variación de expresión, a nivel de mRNA, obtenida para el gen *mmp2* con respecto al gen *gapdh*, en SMC-C y SMC-Ch con los distintos tratamientos.

A)



SMC-C	SMC-Ch	Lovastatina	Lov+Mev	Lov+GGPP	Manumicina	GGTI-298
1	0,69	0,43	0,57	0,56	1,11	0,66

B)



SMC-Ch	Lovastatina	Lov+Mev	Lov+GGPP	Manumicina	GGTI-298
1	0,03	1,27	2,46	0,52	0,18

Figura C.12. Variación de la expresión del gen *mmp2* con respecto a *gapdh*, en cultivos SMC-C y SMC-Ch con los distintos tratamiento, representado como el logaritmo de esta relación. Lov: lovastatina; Lov+mev: lovastatina + mevalonato; lov +GGPP: lovastatina + geranilgeranil pirofosfato. A) Variación con respecto a SMC-C sin tratar. B) Variación respecto a SMC-Ch sin tratar. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

En el caso de la expresión de *mmp2* solo encontramos diferencias significativas en los tratamientos con lovastatina y GGTI-298 para SMC-C. Al añadir mevalonato o GGPP a las SMC-C tratadas con lovastatina el efecto no revierte. No hay diferencias significativas en SMC-C con respecto a SMC-Ch. La manumicina A tampoco muestra efecto significativo. Sin embargo, las SMC-Ch cuyo metabolismo lipídico esta alterado,

presenta una fuerte disminución en la expresión de *mmp2* al tratarlas con lovastatina (33,3 veces menor expresión que SMC-Ch sin tratar). El efecto de la lovastatina revierte al tratar las SMC-Ch con mevalonato y GGPP. La manumicina A y el GGTI-298 también reducen la expresión del gen *mmp2*.

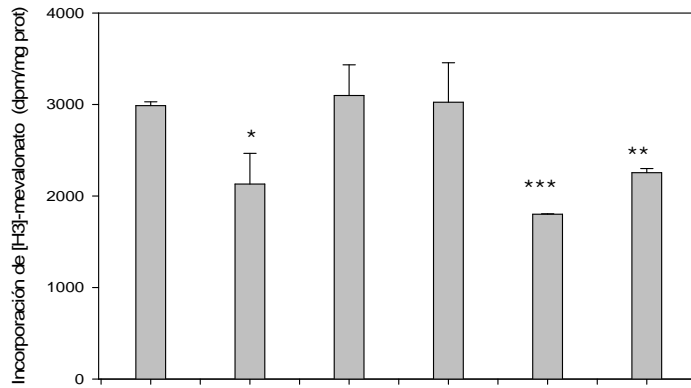
C.2. 5.- Isoprenilación de proteínas (incorporación de [H³]-mevalonato a proteínas totales)

Con objeto de estudiar la prenilización de proteínas en células SMC-C y SMC-Ch en cultivo, hemos realizado experimentos de incorporación de mevalonato marcado radiactivamente a proteínas totales. La prenilización de proteínas es un mecanismo de modificación postransduccional que determina la localización y la actividad de numerosas proteínas señal que son cruciales para la célula.

En la figura C.13 y tabla C4 se muestra el efecto de la incubación con lovastatina, mevalonato, GGPP, manumicina A y GGTI-298, sobre la incorporación de [H³]-mevalonato a proteínas totales en SMC-C y SMC-Ch.

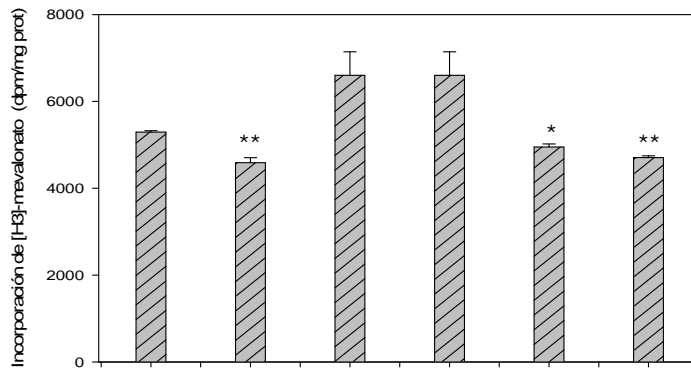
Resultados

SMC-C



Lovastatina	-	+	+	+	-	-
Mevalonato	-	-	+	-	-	-
GGPP	-	-	-	+	-	-
Manumicina A	-	-	-	-	+	-
GGTI-298	-	-	-	-	-	+

SMC-Ch



Lovastatina	-	+	+	+	-	-
Mevalonato	-	-	+	-	-	-
GGPP	-	-	-	+	-	-
Manumicina A	-	-	-	-	+	-
GGTI-298	-	-	-	-	-	+

Resultados

Figura C.13. Incorporación de [H^3]-mevalonato a proteína total (dpm/mg proteína) en cultivos SMC-C y CMC-Ch incubados con los distintos compuestos durante 48h. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$).

	SMC-C	SMC-Ch
Control	2988 \pm 41,50	5293 \pm 33,00
Lovastatina	2131 \pm 335,1	4588 \pm 115,6
Lovastatina + Mevalonato	3098 \pm 336,0	6601 \pm 543,0
Lovastatina + GGPP	3025 \pm 431,8	6605 \pm 531,6
Manumicina A	4,879 \pm 3,450	4950 \pm 70,52
GGTI-298	45,81 \pm 32,39	4708 \pm 38,93

Tabla C.5. Incorporación de [H^3]-mevalonato a proteína total (dpm/mg proteína) en cultivos SMC-C y SMC-Ch incubados con los distintos compuestos durante 48h. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones. Datos representados en la figura C.13.

La incorporación de mevalonato a proteínas totales en SMC-Ch es 1,73 veces superior respecto la incorporación en SMC-C. Este efecto se ve disminuido en las muestras tratadas con lovastatina (0,71), lo que revierte al añadir al medio mevalonato o GGPP, donde no se encuentran diferencias significativas respecto a SMC-C, e incluso aumenta respecto al control (1,3 veces) en SMC-Ch. Tanto manumicina A como GGTI-298, inhibidores específicos de farnesil transferasas y geranil-geranil transferasas respectivamente, producen un efecto muy similar a la lovastatina (0,63 y 0,75 respecto a SMC-C sin tratar).

C.2. 6.- Activación de Rho-A.

En la figura C.14 y tabla C.6 se muestra el efecto de la inhibición de la HMG-CoA reductasa y las geranylgeranyl transferasa, sobre la activación de Rho A en SMC-C, así como la reversión de estos efectos por los metabolitos intermedarios producto de estos enzimas.

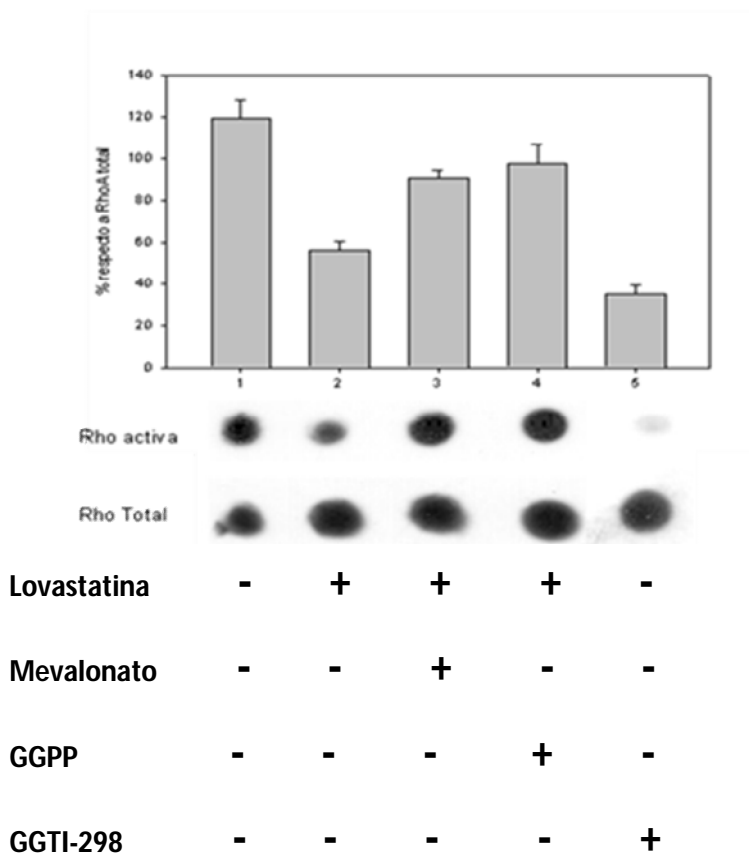


Figura C.14. Efecto sobre la activación de Rho A. La gráfica muestra la variación de luminosidad de Rho A activa frente a Rho total expresado como tanto por ciento. Los resultados son la media \pm SEM de 2 experimentos diferentes medidos por duplicado.

Tratamiento	% de activación
Control	119,3±8.9
Lovastatina	55,92± 4,357
Lovastatina + Mevalonato	90,79± 3,414
Lovastatina + GGPP	97,65± 8,980
GGTI-298	35,30± 3,818

Tabla C.6. Variación de luminosidad de Rho A activa frente a Rho total expresado como tanto por ciento. Los resultados son la media ± SEM de 2 determinaciones diferentes. Datos representados en la figura C.14.

La lovastatina inhibe la activación de Rho A en un 53%, efecto que revierte al añadir al medio mevalonato y GGPP. El GGTI-298, inhibidor específico de la geranil-geranil transferasa, inhibe la activación de Rho A en un 75%.

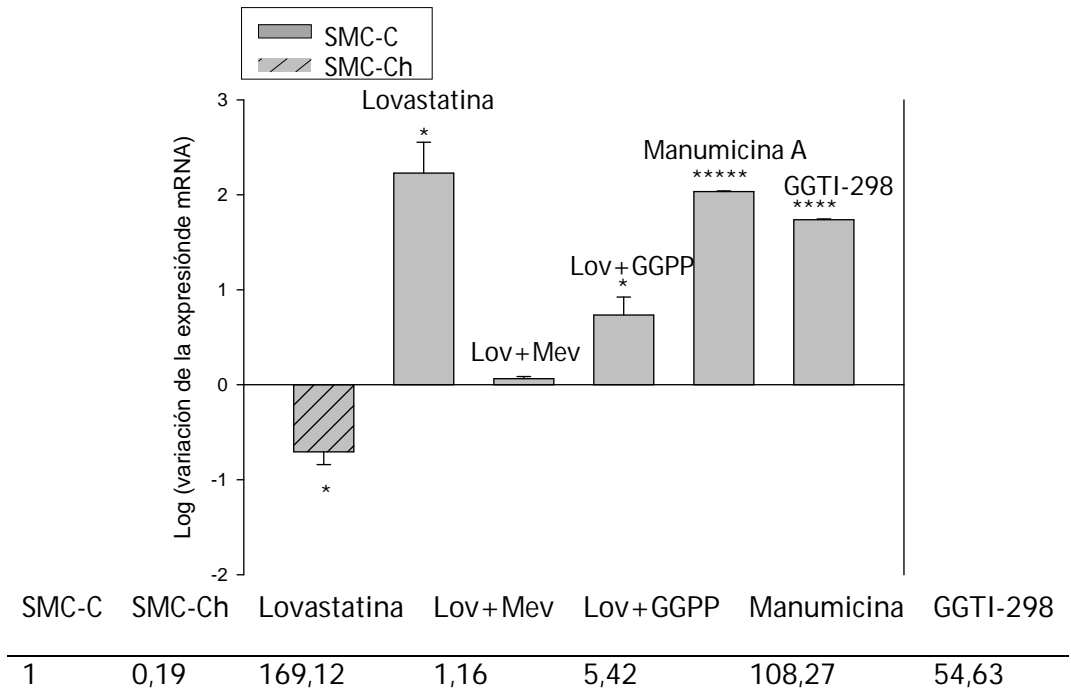
C.2. 7.- Expresión de genes que codifican para PPAR- γ , LXR y SREBP

C.2. 7.1.- Gen *ppar- γ*

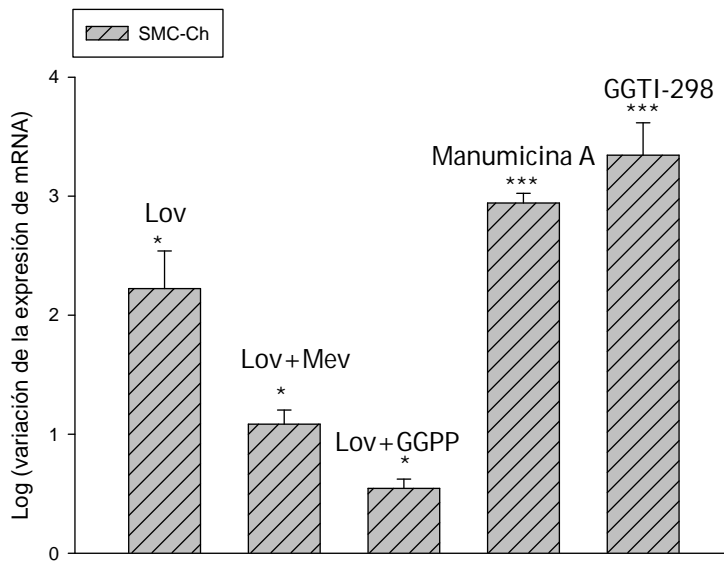
La figura C.15 muestra el efecto de los distintos tratamientos en cultivos SMC-C y SMC-Ch sobre la expresión del gen *ppar- γ* a nivel de su mRNA.

Resultados

A)



B)



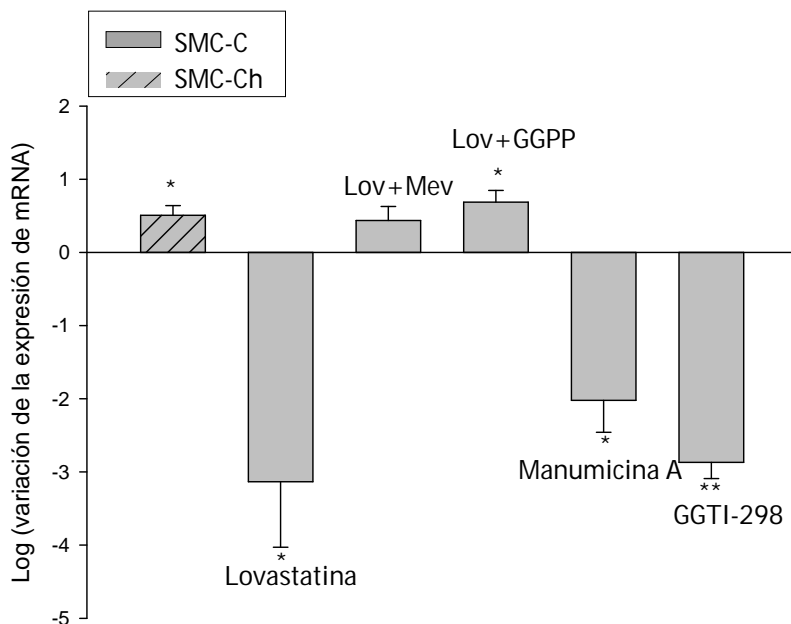
SMC-Ch	Lovastatina	Lov+Mev	Lov+GGPP	Manumicina	GGTI-298
1	167,34	12,17	3,50	876,29	2212,07

Figura C.15. Variación de la expresión del gen *ppar-γ* con respecto a *gapdh*, en cultivos SMC-C y SMC-Ch con los distintos tratamiento, representado como el logaritmo de esta relación. Lov: lovastatina; Lov+mev: lovastatina + mevalonato; lov +GGPP: lovastatina + geranilgeranil pirofosfato. A) Variación con respecto a SMC-C sin tratar. B) Variación respecto a SMC-Ch sin tratar. Los resultados están expresados como media ± SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

En SMC-Ch disminuye la expresión de *ppar-γ* con respecto a SMC-C. Por el contrario, la lovastatina produce un fuerte incremento de la expresión de *ppar-γ* en SMC-C, que revierte al añadir mevalonado y GGPP. La manumicina A y GGTI-298 producen un efecto similar al de la lovastatina en SMC-C. En SMC-Ch el incremento de la expresión de este gen es muy superior, especialmente en el caso de manumicina A y GGTI-298.

C.2. 7.2.- Gen *Ixr*

La figura C.16 muestra el efecto de los distintos tratamientos sobre la expresión, a nivel de mRNA, del gen de *Ixr*.



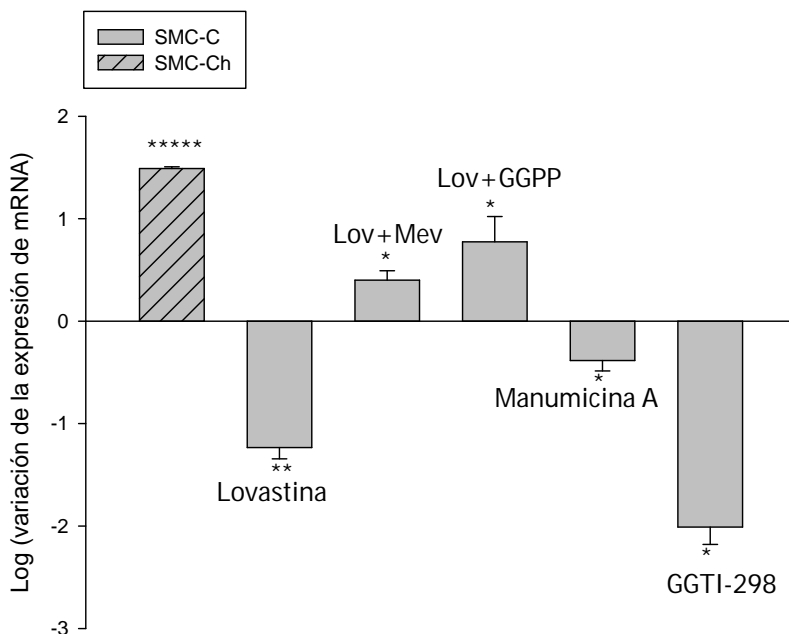
SMC-C	SMC-Ch	Lovastatina	Lov+Mev	Lov+GGPP	Manumicina	GGTI-298
1	3,21	0,0007	2,73	4,87	0,009	0,001

Figura C.16. Variación de la expresión (mRNA) del gen *Ixr* con respecto a *gapdh*, en cultivos SMC-C y SMC-Ch con los distintos tratamientos, representado como el logaritmo de esta relación. Lov: lovastatina; Lov+mev: lovastatina + mevalonato; lov +GGPP: lovastatina + geranilgeranil pirofosfato. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

En SMC-Ch aumenta la expresión del gen de *Ixr* con respecto a SMC-C. La lovastatina produce el efecto contrario disminuyendo fuertemente la expresión del gen, lo que revierte al añadir mevalonato o GGPP. La manumicina A y el GGTI-298 producen un efecto muy similar al de la lovastatina.

C.2. 7.3.- Gen *srebp-1*

La figura C.17 muestra el efecto de los distintos tratamientos sobre la expresión del gen *srebp-1* a nivel de su mRNA.



SMC-C	SMC-Ch	Lovastatina	Lov+Mev	Lov+GGPP	Manumicina	GGTI-298
1	30,88	0,06	2,52	5,95	0,78	0,01

Figura C.17. Variación de la expresión (mRNA) del gen *srebp-1* con respecto a *gapdh*, en cultivos SMC-C y SMC-Ch con los distintos tratamientos, representado como el logaritmo de esta relación. Lov: lovastatina; Lov+mev: lovastatina + mevalonato; lov +GGPP: lovastatina + geranilgeranil pirofosfato. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

En los cultivos de SMC-Ch se produce un fuerte aumento de la expresión de *srebp-1*. La lovastatina disminuye la expresión del gen. Al añadir al medio de cultivo mevalonato y geranilgeranil pirofosfato revierte el efecto de la lovastatina. Además, la inhibición de prenil transferasas disminuye la expresión de este gen, efecto que es especialmente importante al inhibir la geranilgeraniltransferasa por medio de GGTI-298.

C.3.- Papel de las GTPasas Rho A y H-Ras en la síntesis de proteínas de la ECM

Con el fin de determinar el papel de las proteínas Rho A y H-Ras en la síntesis de ECM por parte de las SMC, se obtuvieron cultivos de SMC A10 de rata mutantes dominantes positivos (que sobre expresan isoformas activas de la proteína) y negativos (que sobre expresan isoformas inactivas de la proteína) para cada una de estas proteínas.

C.3.1.- Incorporación de [H³]-prolina colágenos en mutantes dominantes negativos y positivos de Rho A y H-Ras.

La figura C.18 y tabla C.7 muestran el efecto del estado de activación de las proteínas Rho A y Ras-H sobre la síntesis de colágenos, medida como incorporación de [H³]-prolina según el método de Peterkofsky.

Resultados

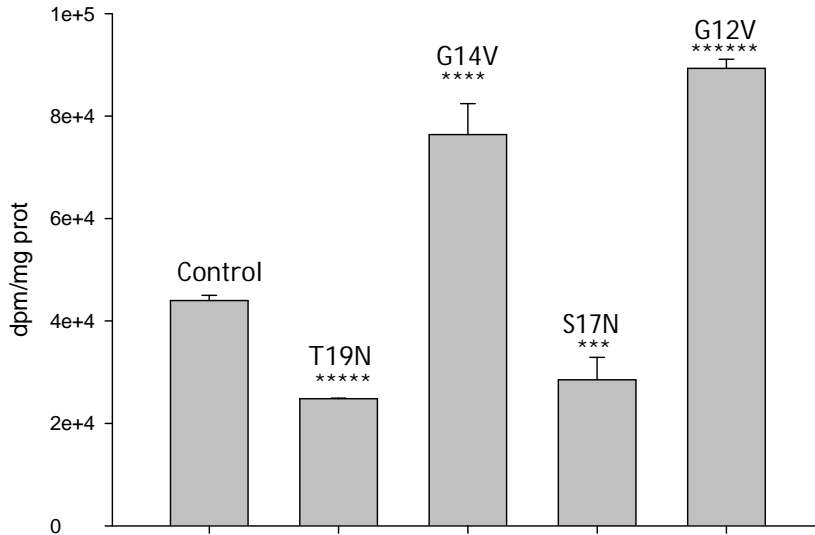


Figura C.18. Incorporación de $[H^3]$ -prolina a proteínas sensibles a hidrólisis por colagenasa (dpm/mg proteína) en SMC A10 de rata y los mutantes dominante positivo y negativo de Rho A (G14V y T19N) y H-Ras (G12V y S17N). Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (** $P < 0,0005$; **** $P < 0,00005$; ***** $P < 0,000005$; ***** $P < 0,0000005$).

	dpm/mg proteína
Control	43986 \pm 1032
T19N	24818 \pm 115,7
G14V	76392 \pm 6024
S17N	28535 \pm 4366
G12V	89321 \pm 1761

Tabla C.7. Incorporación de $[H^3]$ -prolina a proteínas sensibles a hidrólisis por colagenasa (dpm/mg proteína) en cultivos de SMC A10 de rata y los mutantes dominante positivo y

negativo de Rho A (G14V y T19N) y H-Ras (G12V y S17N). Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones. Datos representados en la figura C.18.

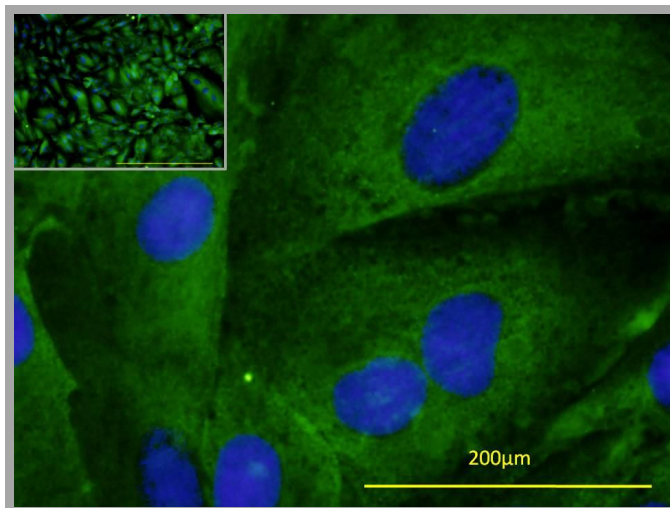
Los resultados muestran como en el mutante dominante negativo de Rho A disminuye la incorporación de prolina casi a la mitad (56% en T19N respecto al control) y el mutante dominante positivo casi la duplica (173% en G14V respecto al control). Estos resultados son similares para los mutantes de H-Ras (64% y 203% para mutante dominante negativo y positivo respectivamente).

C.3.2.- Inmunofluorescencia indirecta de los colágenos tipos I y III en mutantes dominantes positivos y negativos de Rho A.

C.3.2.1.- Colágeno tipo I

La figura C.19 muestra la expresión a nivel de proteína, obtenida para los mutantes dominantes negativos de Rho A y los controles, usando una dilución 1/250 del anticuerpo primario frente a colágeno tipo I.

A)



B)

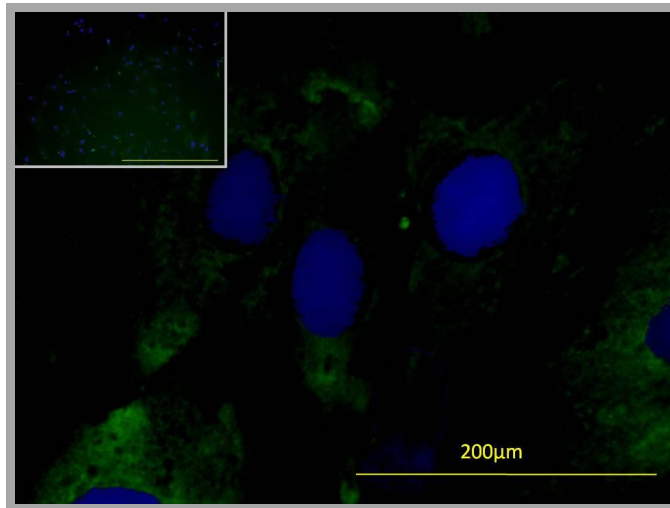
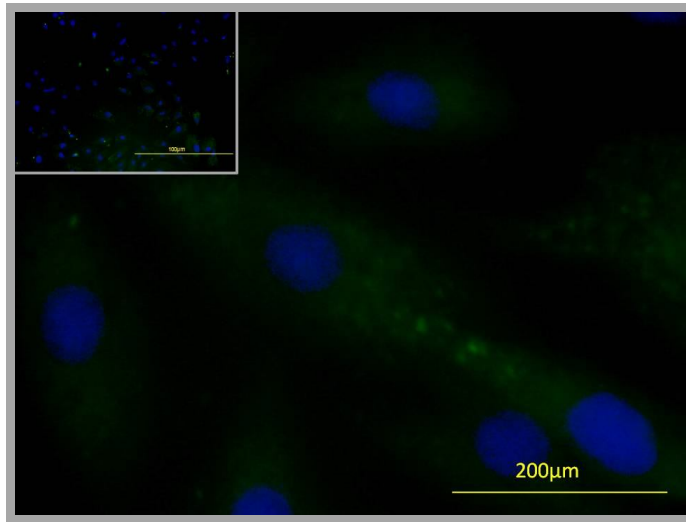


Figura C.19. Fotografías de Immunofluorescencia de colágeno tipo I en los distintos cultivos de SMC A10: A) Control; B) Mutante dominante negativo para Rho A (T19N). En ambos caso se utilizo una dilución 1/250 de anticuerpo primario y 1/1000 de secundario unido a fluoresceína. El núcleo se tiñó mediante Hoechst (azul). La imagen de la parte superior izquierda es 10x y el resto 40x.

Las imágenes muestran cómo la expresión de colágeno I en las SMC A10 control es mucho mayor que la obtenida para los mutantes negativos en los que casi no hay expresión de colágeno tipo I. De hecho, hubo que incrementar la cantidad de anticuerpo con el fin de poder obtener señal.

La figura R20 muestra la expresión del colágeno I para los mutantes dominantes positivos de Rho A y los controles, usando una dilución 1/1000 del anticuerpo primario frente a colágeno tipo I.

A)



B)

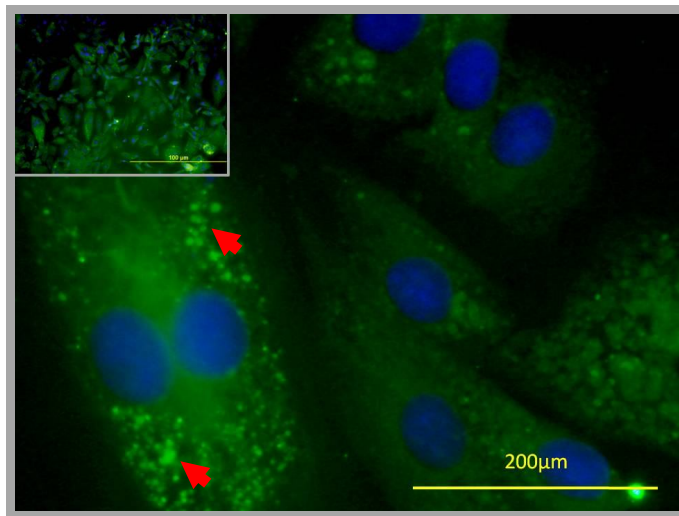


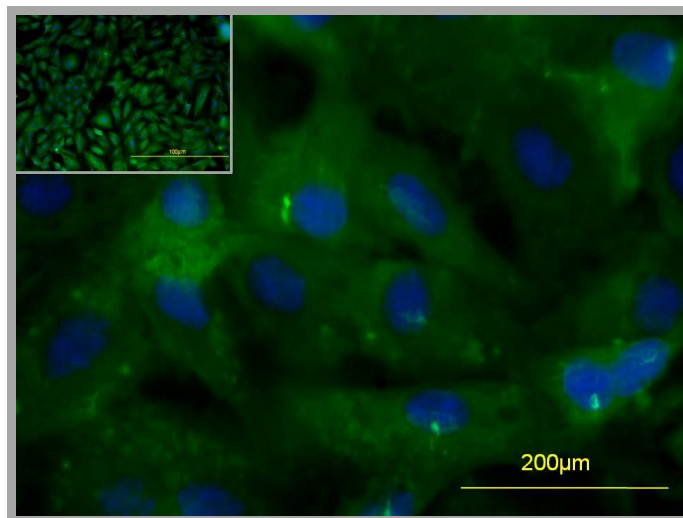
Figura C.20. Fotografías de Immunofluorescencia de colágeno tipo I en los distintos cultivos de SMC A10: A) Control; B) Mutante dominante positivo para Rho A, G14V. Las flechas rojas señalan vesículas de secreción de colágeno. En ambos casos se utilizó una dilución 1/1000 de anticuerpo primario y 1/1000 de secundario unido a fluoresceína. El núcleo se tiñó mediante tinción Hoechst (azul). La imagen de la parte superior izquierda es 10x y el resto 40x.

En las imágenes anteriores se ve claramente cómo la expresión de colágeno tipo I incrementa mucho en el mutante dominante positivo. Además, G14V (Fig. R21A) presenta una gran cantidad de vesículas de secreción de colágeno, lo que evidencia que la síntesis de colágeno tipo I en estas células es muy alta, hecho que está de acuerdo que los resultados expuestos anteriormente.

C.3.2.2.- Colágeno tipo III

La figura C.21 muestra la expresión del colágeno III para el mutante dominante negativo de Rho A (T19N) y el control.

A)



B)

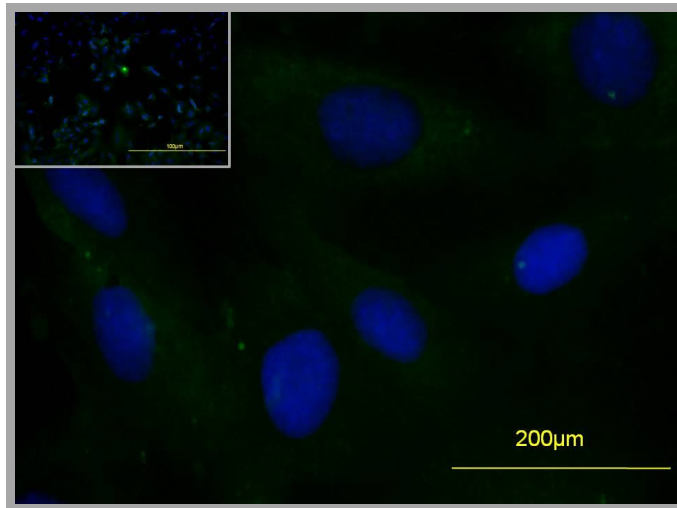
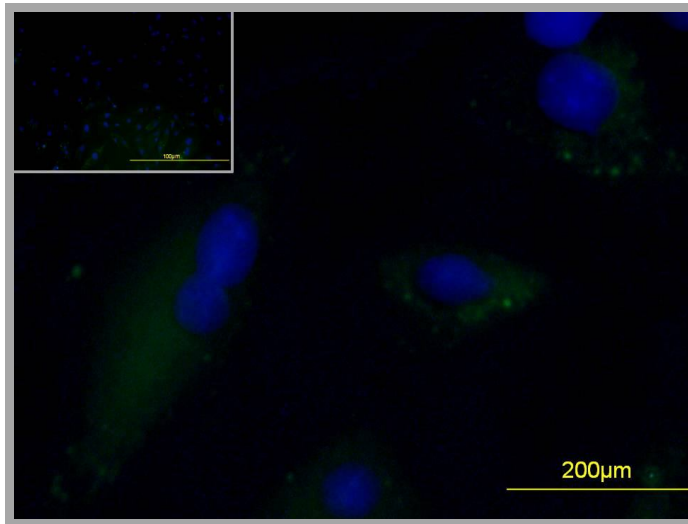


Figura C.21. Fotografías de Immunofluorescencia de colágeno tipo III en los distintos cultivos de SMC A10: A) Mutante dominante negativo para Rho A (T19N); B) Control. En ambos casos se utilizó una dilución 1/250 de anticuerpo primario y 1/1000 de secundario unido a fluoresceína. El núcleo se tiñó mediante tinción Hoechst (azul). La imagen de la parte superior izquierda es 10x y el resto corresponde a 40x.

En las imágenes puede verse, al igual que en el caso anterior, que los clones dominantes negativos presentan una expresión de colágeno tipo III mucho menor que los controles.

La figura C.22 muestra la expresión del colágeno tipo III, obtenida para los mutantes dominantes positivos de Rho A y los controles.

A)



B)

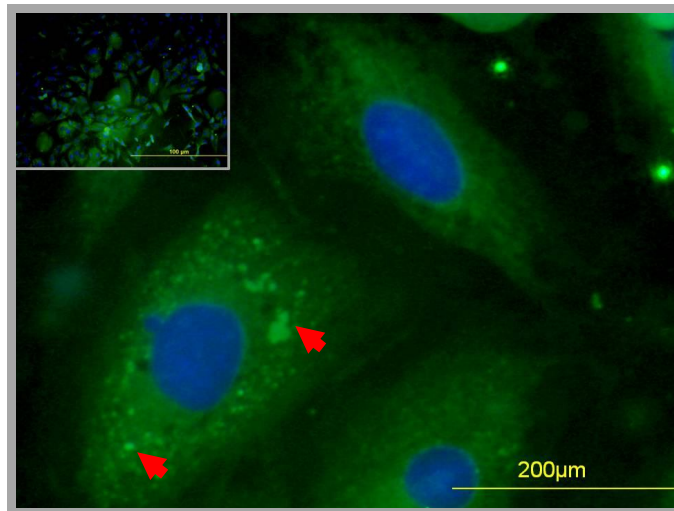


Figura C.22. Fotografías de Inmunofluorescencia de colágeno tipo III en los distintos cultivos de SMC A10: A) Control; B) Mutante dominante positivo para Rho A, G14V (las flechas rojas señalan vesículas de secreción de colágeno). En ambos casos se utilizó una dilución 1/1000 de anticuerpo primario y 1/1000 de secundario unido a fluoresceína. El núcleo se tiñó mediante Hoechst (azul). La imagen de la parte superior izquierda es 10x y el resto corresponde a 40x.

El mutante dominante positivo de Rho A, a al igual que en el caso del colágeno I, presenta una mayor expresión que los controles. Es evidente la presencia de cúmulos amorfos inmunoreactivos de colágeno tipo III que probablemente sean vesículas de secreción de procolágenos que salen al exterior. Esto pone en evidencia el gran efecto inductor de Rho A sobre la síntesis de colágeno III.

C.3.3.- Efecto del estado de activación de Rho A y Ras-H a nivel del promotor de *col1a2*.

La figura C.23 y la tabla C.8 muestran el efecto del estado de activación de Rho A y Ras-H sobre el promotor de *col1a2*, medido como unidades de luminiscencia de β -galactosidasa (20.8/17.5LAC) con respecto a las obtenidas para la renilla luciferasa (pgl3 control vector), en SMC A10 de rata.

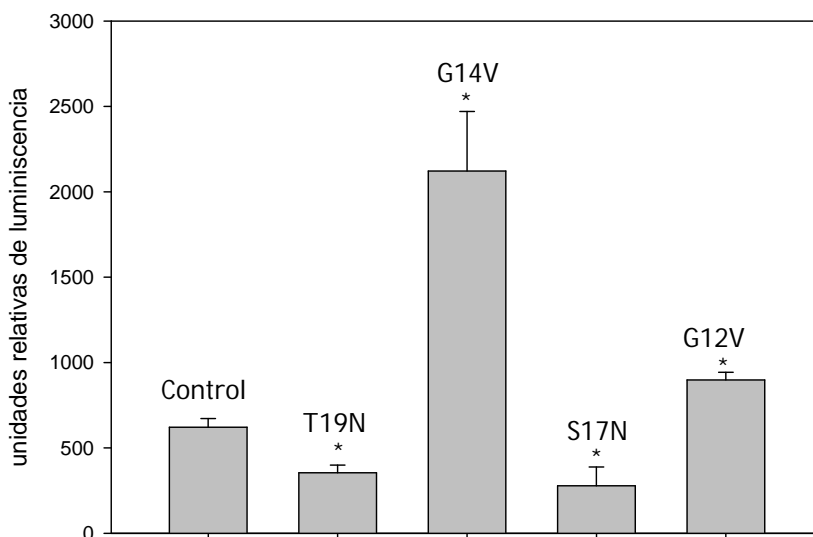


Figura C.23. Efecto del estado de activación de Rho A y H-Ras sobre el promotor de *col1a2*, medidos como luminiscencia relativa β -galactosidasa/renilla luciferasa. Los resultados están

expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P<0,05$; ** $P<0,005$; *** $P<0,0005$)

**Unidades relativas de luminiscencia
(β -gal/renilla)**

Control	621,5 \pm 621,5
T19N	354,0 \pm 45,25
G14V	2122 \pm 348,6
S17N	278,0 \pm 110,3
G12V	898,0 \pm 45,25

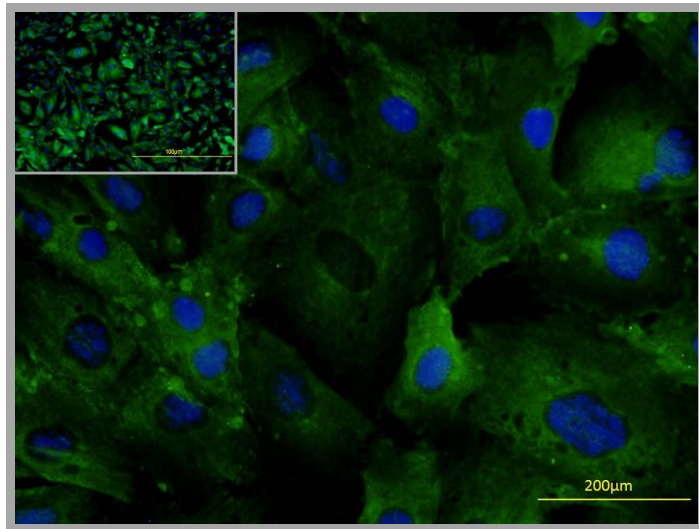
Tabla C.8. Efecto del estado de activación de Rho A y H-Ras sobre el promotor de *col1a2*. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones. Datos representados en figura C.22.

Los mutantes dominantes negativos de Rho A y H-Ras, que sobre expresan isoformas inactivas de estas proteínas, presentan menor expresión a nivel del promotor que las células A10 control. De forma opuesta, los mutantes dominantes positivos incrementan la expresión, especialmente los de Rho A.

C.3.4.- Inmunofluorescencia indirecta de fibronectina en mutantes dominantes positivos y negativos de Rho A.

En la figura C.24 se muestra la expresión de fibronectina para los controles y el mutante dominante negativo de Rho A (T19N).

A)



B)

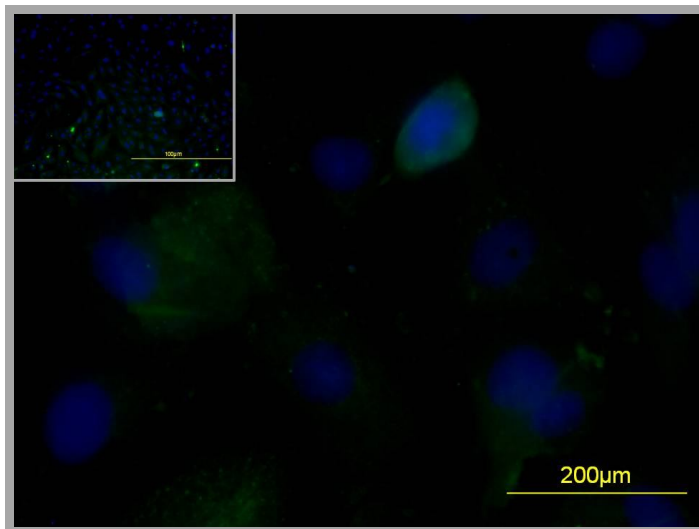
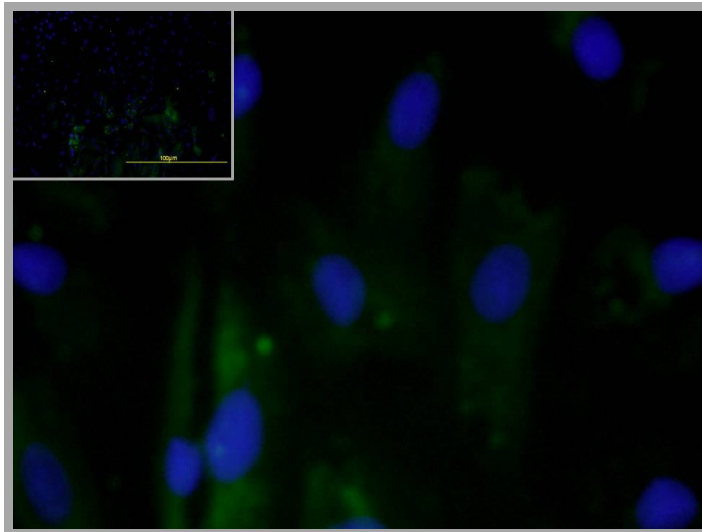


Figura C.24. Fotografías de Immunofluorescencia de fibronectina en los distintos cultivos de SMC A10: A) Control; B) Mutante dominante negativo para Rho A (T19N). En ambos casos se utilizó una dilución 1/250 de anticuerpo primario y 1/1000 de secundario unido a fluoresceína. El núcleo se tiñó con Hoechst (azul). La imagen de la parte superior izquierda es 10x y el resto corresponde a 40x.

Los mutantes dominantes negativos de Rho A muestran una expresión de fibronectina muy baja en comparación con los controles. Este hecho es similar a lo encontrado en los cultivos primarios de SMC (SMC-C y SMC-Ch), donde se produce una fuerte inhibición en la activación de Rho A con GGTI-298 (inhibidor de geranil transferasas y por tanto de Rho A) y a su vez una disminución muy fuerte en la expresión relativa del mRNA de fibronectina.

La figura R25 muestra la expresión del gen de la fibronectina para el mutante positivo negativo de Rho A (G14V) y los controles.

A)



B)

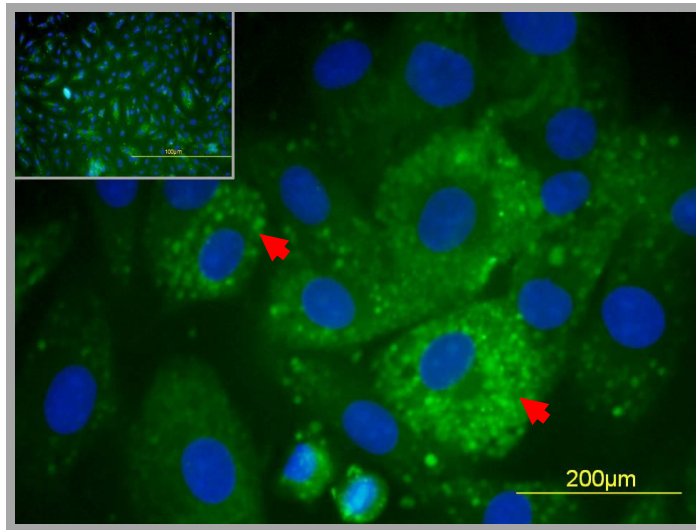


Figura C.25. Fotografías de Immunofluorescencia de fibronectina en los distintos cultivos de SMC A10: A) Control; B) Mutante dominante positivo para Rho A, G14V. Las flechas rojas señalan vesículas de secreción de fibronectina. En ambos casos se utilizó una dilución 1/1000 de anticuerpo primario y 1/1000 de secundario unido a fluoresceína. El núcleo se con Hoechst (azul). La imagen de la parte superior izquierda es una magnificación 10x y el resto corresponde a 40x.

El mutante dominante positivo de Rho A presenta una expresión muy superior a la de los controles. Esto está en concordancia con lo expuesto anteriormente.

C.4.- Efecto de la doxicilina sobre la síntesis de ECM y las vías de activación derivadas de la ruta del mevalonato en cultivos de SMC.

C.4.1.- Efecto de la doxicilina en la síntesis de colágeno.

Resultados

La figura C.26 y la tabla C.9 muestran el efecto de la doxiciclina sobre la incorporación de prolina a proteínas sensibles a hidrólisis por colagenasa en SMC-C y SMC-Ch.

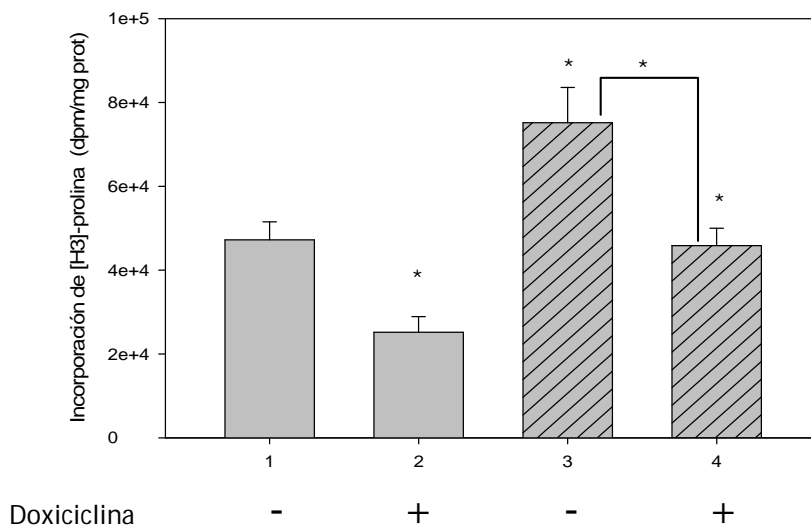


Figura C.26. Efecto de la doxiciclina sobre la incorporación de [H³]-prolina a proteínas sensibles a hidrólisis por colagenasa (dpm/mg proteína) en SMC-C y SMC-Ch. Los resultados están expresados como media ± SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$).

	SMC-C		SMC-Ch	
muestra	Control	Doxiciclina	Control	Doxiciclina
dpm/mg prot	47221 ± 4299	25196 ± 3724	75184 ± 8405	45863 ± 4144

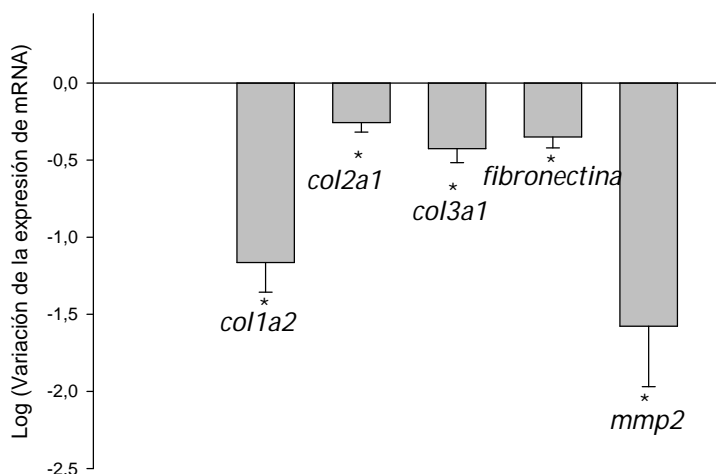
Tabla C.9. Incorporación de [H³]-prolina a proteínas sensibles a hidrólisis por colagenasa en SMC-C y SMC-Ch tratadas con doxiciclina. Los datos (dpm/mg proteína) son la media ± SEM de al menos 3 determinaciones. Datos representados en figura C.26.

La doxiciclina produce una fuerte disminución de la síntesis de colágeno tanto en SMC-C como en SMC-Ch. Esta disminución hace que la incorporación de prolina a colágenos en SMC-Ch baje hasta niveles similares a los de SMC-C.

C.4.2.- Efecto de la doxiciclina sobre la expresión de genes que codifican los colágenos tipo I, II y III, fibronectina y MMP2

La figura C.27 muestra la variación en la expresión del mRNA de *col1a2*, *col2a1*, *col3a1*, *fibronectina* y *mmp2* en SMC-C y SMC-Ch.

A)



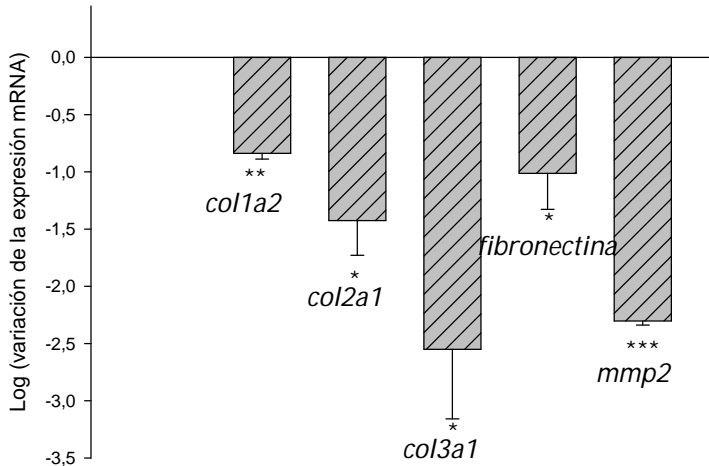
Variación de la expresión (doxiciclina vs control)

<i>col1a2</i>	0,07
<i>col2a1</i>	0,55
<i>col3a1</i>	0,37
<i>fibronectina</i>	0,45

Resultados

mmp2 0,03

B)



Variación de la expresión (doxiciclina *vs* control)

<i>col1a2</i>	0,15
<i>col2a1</i>	0,04
<i>col3a1</i>	0,003
<i>fibronectina</i>	0,10
<i>mmp2</i>	0,005

Figura C.27. Variación de la expresión *col1a2*, *col2a3*, *col3a1*, *fibronectina* y *mmp2* con respecto a *gapdh*, en SMC- C (A) y SMC-Ch (B) tratadas con doxiciclina, representado como el logaritmo de esta variación. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

La doxiciclina produce una fuerte inhibición de la expresión de los cinco genes estudiados. Este efecto es especialmente notorio en SMC-Ch.

C.4.3.- Efecto de la doxiciclina sobre la isoprenilación de proteínas.

La figura R28 y tabla R10 muestra el efecto de la doxiciclina sobre la prenilación de proteínas en SMC-C y SMC-Ch medida como incorporación de H³-MVA a proteínas totales.

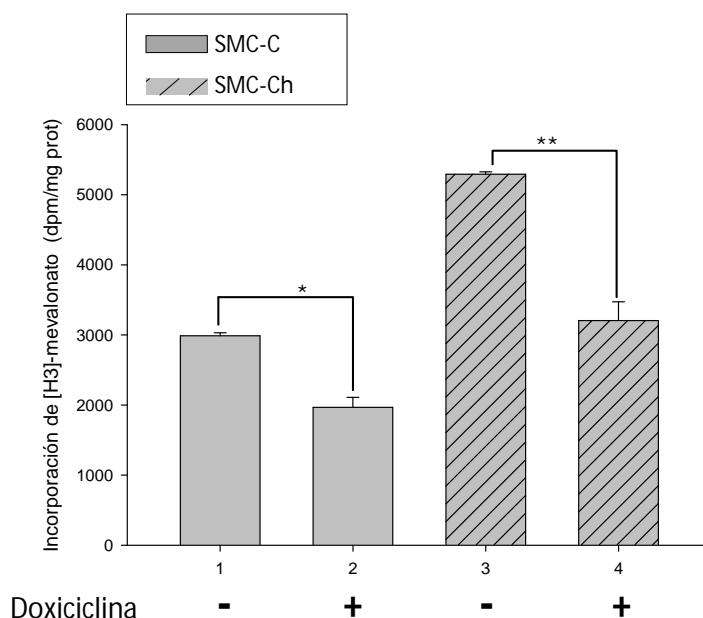


Figura C.28. Efecto de la doxiciclina sobre la incorporación de [H³]-mevalonato a proteína total (dpm/mg proteína) en SMC-C y SMC-Ch. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$).

Resultados

	SMC-C		SMC-Ch	
muestra	Control	Doxiciclina	Control	Doxiciclina
dpm/mg prot	2988±41,50	1966±142,7	5293±33,00	3205±267,9

Tabla C.10. Efecto de la doxiciclina sobre la incorporación de [H^3]-mevalonato a proteína total (dpm/mg proteína) en SMC-C y SMC-Ch. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones. Datos representados en figura C.28.

La doxiciclina disminuye la incorporación de mevalonato a proteína total en un 35% en SMC-C y un 40% en SMC-Ch. De este modo la doxiciclina disminuye la isoprenilación de proteínas en SMC-Ch a valores similares a los de las SMC-C (no existen diferencias significativas entre ambos valores, $P > 0,05$).

C.4.4.- Efecto de la doxiciclina sobre el estado de activación de Rho-A.

La figura C.29 y tabla C.11 muestra el efecto de la doxiciclina en el estado de activación de Rho A.

Resultados

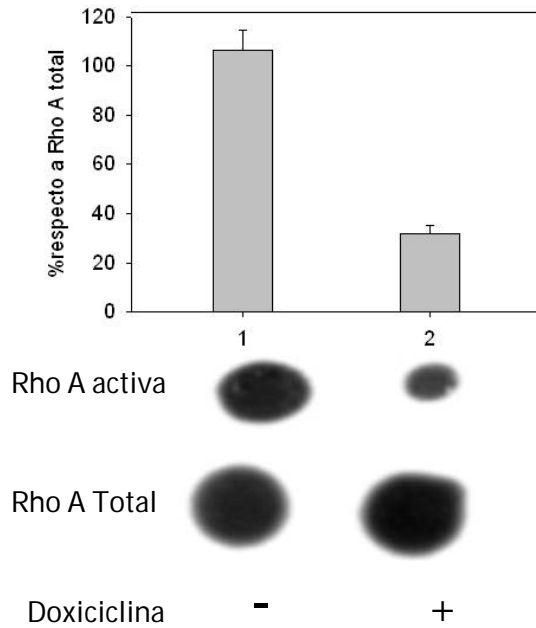


Figura C.29. Efecto de la doxiciclina sobre la activación de Rho A. La gráfica muestra la variación de luminosidad de Rho A activa frente a Rho total.

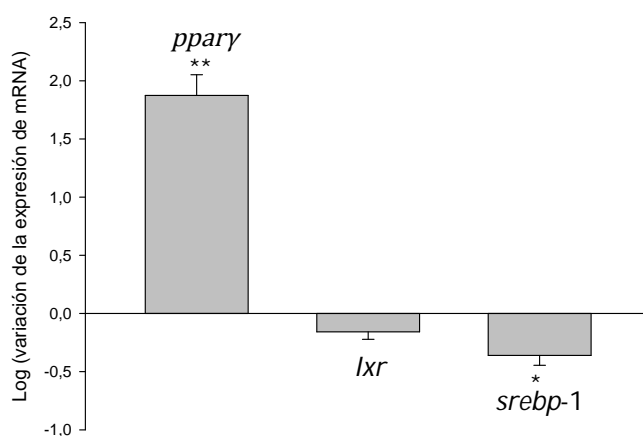
Tratamiento	%activación
Control	106,5±7,778
Doxiciclina	31,90± 3,253

Tabla C.11. Variación de luminosidad de Rho A activa frente a Rho total expresado como tanto por ciento. Los resultados son la media ± SEM de 2 determinaciones diferentes. Datos representados en la figura C.29.

La doxiciclina inhibe la activación de Rho A en un 70% en las SMC-C, efecto similar al encontrado anteriormente con el tratamiento con lovastatina.

C.4.5.- Efecto de la doxiciclina en la expresión de genes que codifican para PPAR- γ , LXR y SREBP

La figura C.30 muestra el efecto de la doxiciclina sobre la expresión de *ppary*, *lxr*, y *srebp-1*.



Variación de la expresión (Doxiciclina *vs* Control)

<i>ppar γ</i>	74,80
<i>lxr</i>	0,69
<i>srebp-1</i>	0,44

Figura C.30. Variación de la expresión de *ppary*, *lxr* y *serbp-1* (con respecto a *gapdh*), en SMC-C tratadas con doxiciclina, con respecto a SMC-C, representado como el logaritmo de esta relación. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

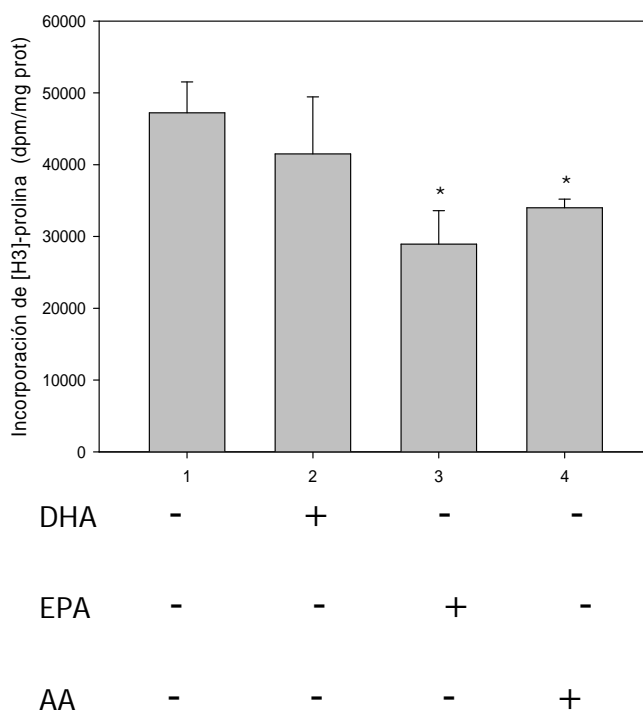
La doxiciclina incrementa la expresión *ppary* y disminuye la de *srebp* en SMC-C, mientras que no se producen diferencias significativas en la expresión de *Ixr*.

C.5.- Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) sobre la síntesis de ECM y las vías de activación derivadas de la ruta del mevalonato en las SMC.

C.5.1.- Efecto de los PUFA sobre la síntesis de colágeno

La figura C.31 y tabla C12 muestran los resultados de incorporación de [³H]-prolina a colágenos obtenidos tras la incubación de los cultivos SMC-C y SMC-Ch con ácidos grasos poliinsaturados DHA, EPA y AA .

SMC-C



SMC-Ch

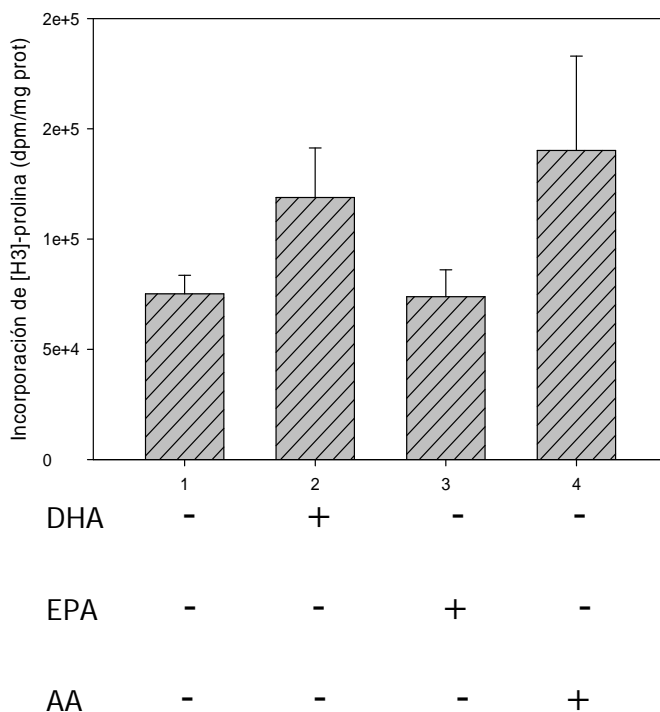


Figura C.31. Efecto de los PUFAs sobre la incorporación de [H³]-prolina a proteínas sensibles a hidrólisis por colagenasa en SMC-C y SMC-Ch. Los resultados están expresados como media ± SEM de al menos 3 determinaciones (* *P*<0,05).

	SMC-C	SMC-Ch
Control	47221±4299	75184± 8405
EPA	41498±7949	118857± 22476
DHA	28934±4651	73875±12172
AA	34001±1202	140213±42746

Tabla C.12. Incorporación de [H³]-prolina a proteínas sensibles a hidrólisis por colagenasa (dpm/mg proteína) en cultivos SMC-C y SMC-Ch incubados con los distintos PUFA durante 48h.

Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones. Datos representados en la figura C.31.

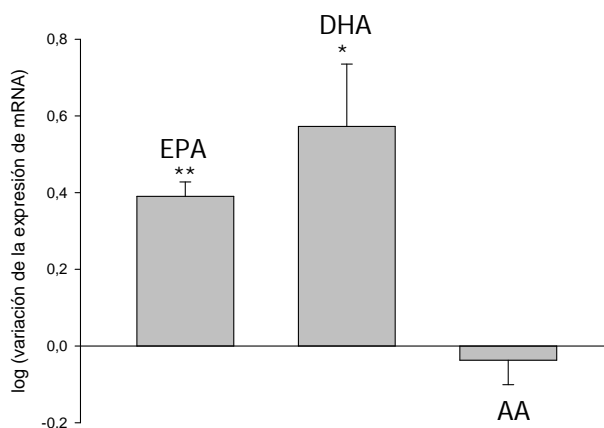
Tanto EPA como AA inhiben la síntesis de colágeno en SMC-C, mientras que no encontramos diferencias significativas con respecto al tratamiento con DHA. En SMC-Ch no existe inhibición de la síntesis de colágeno, e incluso se produce un incremento con los tratamientos de DHA y AA, aunque éste no es significativo.

C.5.2.- Efecto de los PUFA en la expresión de genes que codifican proteínas de la ECM

C.5.2.1.- Gen *col1a2*

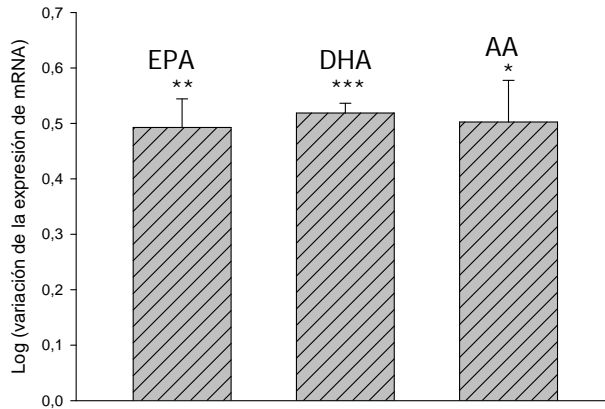
La figura C.32 muestra el efecto de los PUFAS sobre la expresión, a nivel de mRNA, del gen *col1a2* en SMC-C y SMC-Ch.

SMC-C



SMC-C	EPA	DHA	AA
1	2,46	3,87	0,93

SMC-Ch



SMC-Ch	EPA	DHA	AA
1	3,12	3,30	3,2

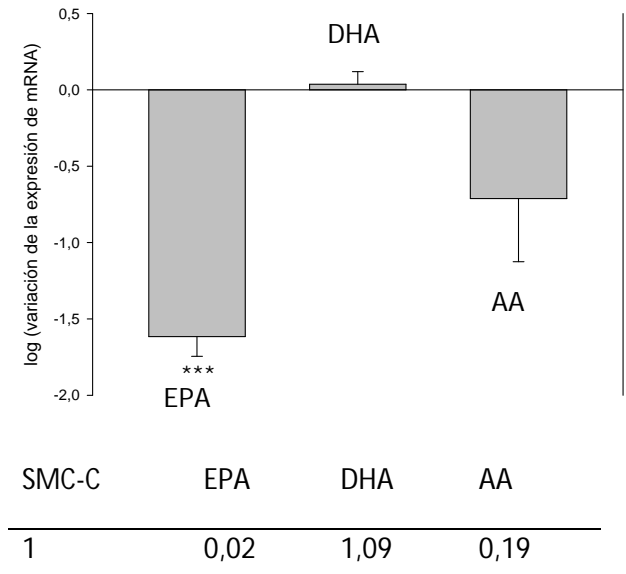
Figura C.32. Variación de la expresión (mRNA) del gen *col1a2* con respecto al gen *gapdh*, en SMC-Ch y SMC-C incubados con EPA, DHA y AA durante 48h, representado como el logaritmo de esta relación. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

Los tratamientos con EPA y DHA incrementan la expresión de *col1a2* en SMC-C, mientras que el AA no presenta ningún efecto significativo. En SMC-Ch los tres PUFAS incrementa la expresión del gen, de modo que esta se triplica en los tres casos.

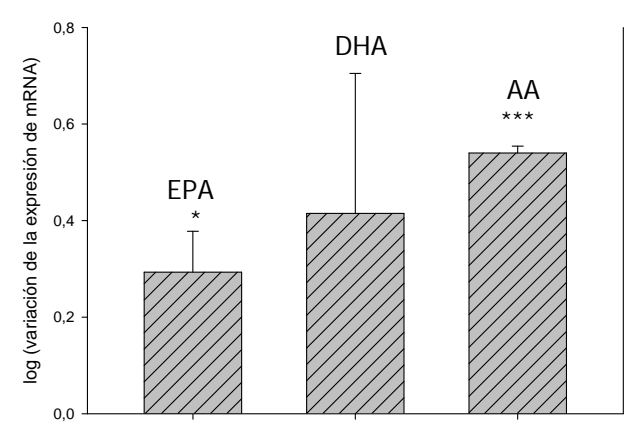
C.5.2.2.- Gen *col2a1*

La figura C.33 muestra el efecto de los PUFAS sobre la expresión, a nivel del mRNA, de gen *col2a1* en SMC-C y SMC-Ch.

SMC-C



SMC-Ch



SMC-Ch	EPA	DHA	AA
1	1,96	2,60	3,47

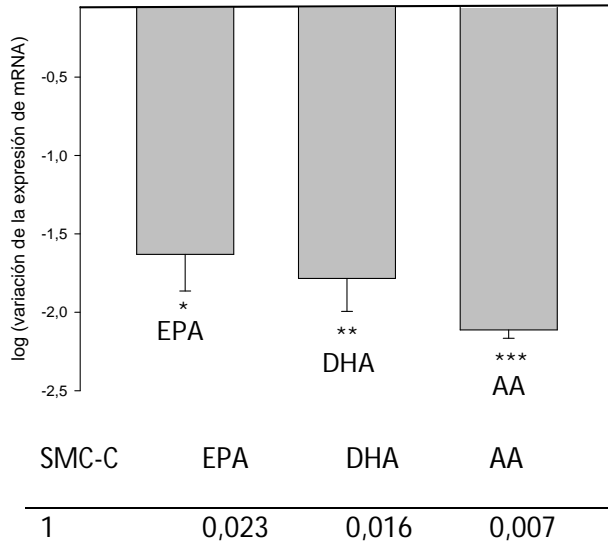
Figura C.33. Variación de la expresión (mRNA) del gen *col2a1* con respecto al gen *gapdh*, en SMC-Ch y SMC-C incubados con EPA, DHA y AA durante 48h, representado como el logaritmo de esta relación. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; *** $P < 0,0005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

El EPA inhibe la síntesis del mRNA de colágeno II en SMC-C, mientras que no encontramos diferencias significativas con los tratamientos con DHA y EPA. En SMC-Ch todos los tratamientos incrementan la expresión del mRNA del *col2a1*, aunque las diferencias no son significativas en el caso de DHA.

C.5.2.3.- Gen *col3a1*

La Figura C.34 muestra el efecto de los PUFAS sobre la expresión, a nivel de mRNA, del gen de *col3a1* en SMC-C y SMC-Ch

SMC-C



SMC-Ch

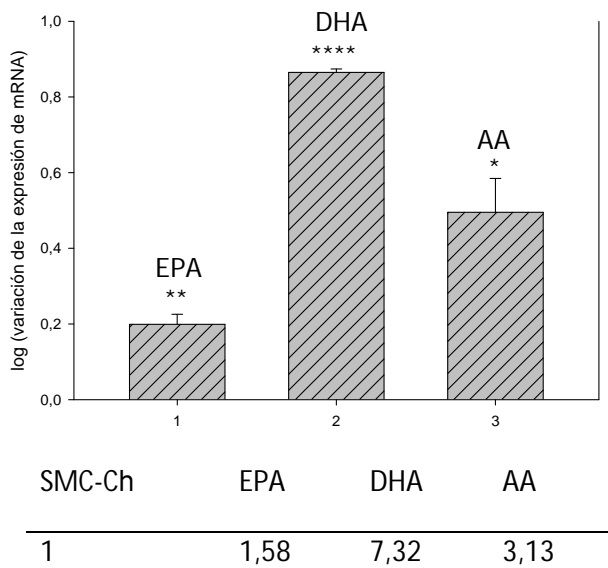


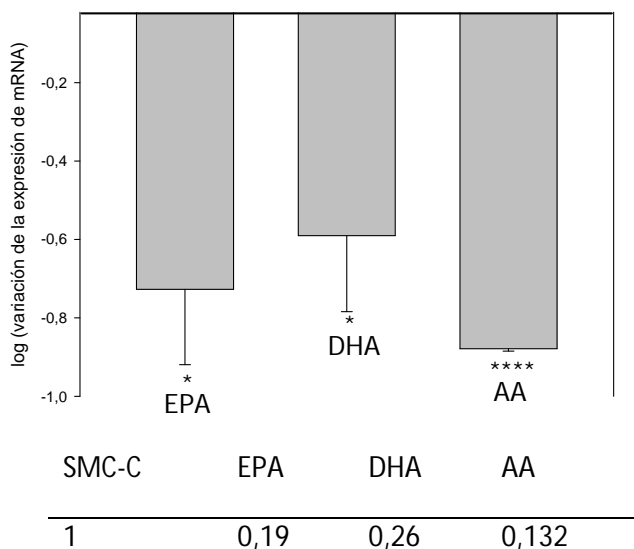
Figura C.34. Variación de la expresión (mRNA) del gen *col3a1* con respecto al gen *gapdh*, en SMC- Ch y SMC-C incubadas con EPA, DHA y AA durante 48h, representado como el logaritmo de esta relación. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

Los PUFAs producen una fuerte disminución de la expresión del mRNA de *col1a3* en SMC-C, mientras que se produce el efecto contrario en SMC-Ch.

C.5.2.4.- Gen fibronectina

La figura C.35 muestra el efecto de los PUFAS sobre la expresión, a nivel de mRNA, del gen de *fibronectina* en SMC-C y SMC-Ch.

SMC-C



SMC-Ch

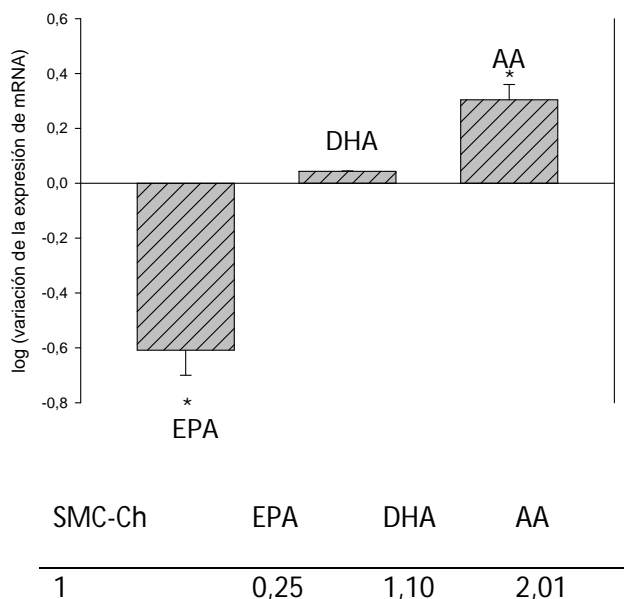


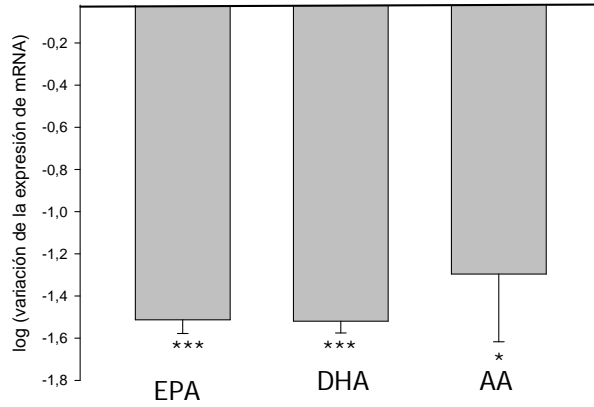
Figura C.35. Variación de la expresión (mRNA) del gen *fibronectina* con respecto al gen *gapdh*, en SMC-Ch y SMC-C incubadas con EPA, DHA y AA durante 48h, representado como el logaritmo de esta relación. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; *** $P < 0,0005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

Los PUFAS producen una fuerte inhibición de la expresión del gen de la fibronectina en SMC-C. En SMC-Ch el EPA disminuye la expresión mientras que tanto DHA como sobre todo AA la aumentan.

C.5.2.5.- Gen *mmp2*

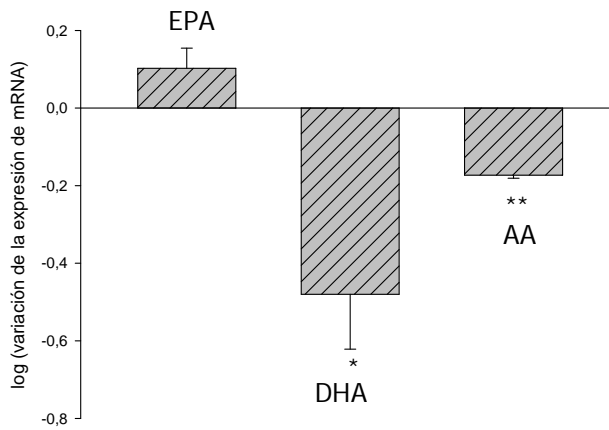
La figura C.36 muestra el efecto de los PUFAS sobre la expresión, a nivel del mRNA, del gen de *mmp2*.

SMC-C



SMC-Ch	EPA	DHA	AA
1	0,03	0,03	0,05

SMC-Ch



SMC-Ch	EPA	DHA	AA
1	1,26	0,33	0,67

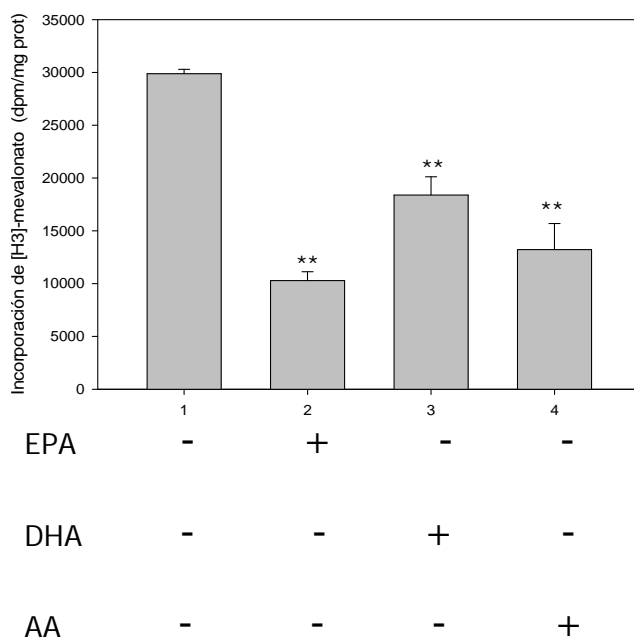
Figura C.36. Variación de la expresión (mRNA) del gen *mmp2* con respecto al gen *gapdh*, en SMC- Ch y SMC-C incubadas con EPA, DHA y AA durante 48h, representado como el logaritmo de esta relación. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

Los PUFAS producen una fuerte disminución de la expresión de *mmp2* en SMC-C. En SMC-Ch el efecto es mucho menor incluso se pierde en el caso del EPA.

C.5.3.- Efecto de los PUFAs sobre la isoprenilación de proteínas

Las figuras C.37 y tabla C.13 muestran el efecto de los ácidos grasos poliinsaturados EPA ($\omega 3$), DHA ($\omega 3$) y AA ($\omega 6$) sobre la incorporación de mevalonato a proteína total.

SMC-C



SMC-Ch

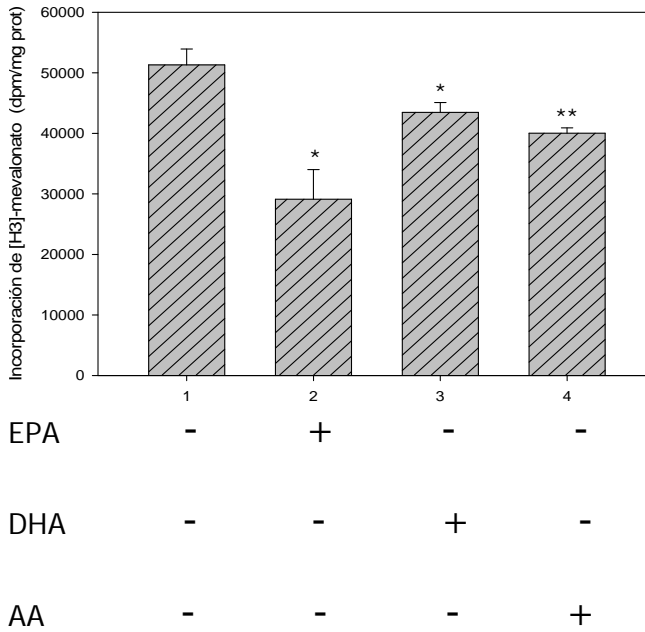


Figura C.37. Efecto de los ácidos grasos poliinsaturados en la incorporación de [H³]-mevalonato a proteína total (dpm/mg proteína) en SMC-C y SMC-Ch. Los resultados están expresados como media ± SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$).

	SMC-C	SMC-Ch
Control	29880±410,6	51306± 2623
EPA	10286±842,0	29120± 4892
DHA	18387±1728	43455±1634
AA	13221±2469	40030±875,0

Tabla C.13. Incorporación de [H³]-mevalonato a proteína total (dpm/mg proteína) en cultivos SMC-C y SMC-Ch incubados con los distintos PUFA durante 48h. Los resultados están expresados como media ± SEM de al menos 3 determinaciones. Datos representados en la figura C.37.

Los PUFA, tanto de la serie 3 como la 6, inhiben la isoprenilación de proteínas. Este efecto es superior en SMC-C que en SMC-Ch.

C.5.4.- Efecto de los PUFAs sobre la activación de Rho-A

La figura C.38 y la tabla C.14 muestran el efecto de los PUFAs sobre la activación de Rho A:

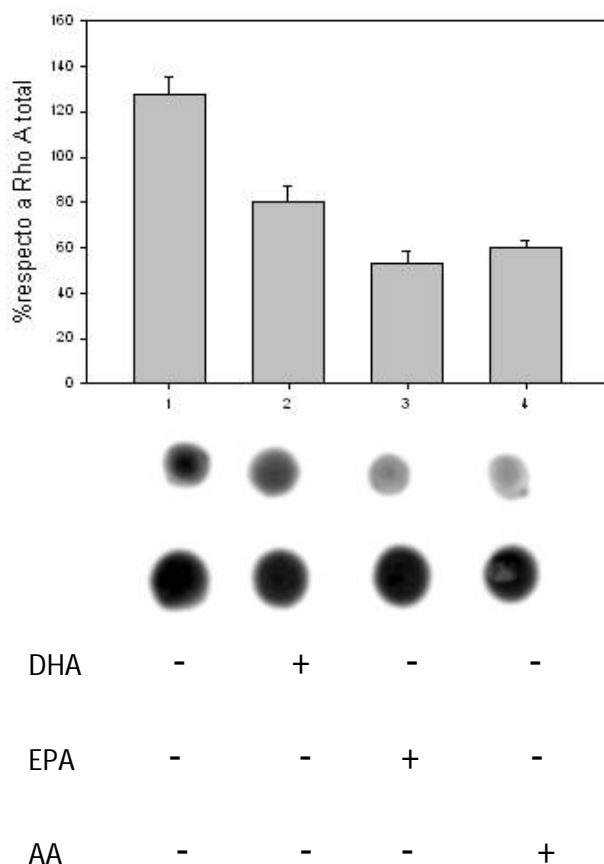


Figura C.38. Efecto de los PUFAS sobre la activación de Rho A. La gráfica muestra la variación de luminosidad de Rho A activa frente a Rho total.

Tratamiento	% activación
Control	127,5±7,78
DHA	80,0± 7,07
EPA	53,0± 5,66
AA	60,0± 2,83

Tabla C.14. Variación de luminosidad de Rho A activa frente a Rho total expresado como tanto por ciento. Los resultados son la media ± SEM de 2 experimentos diferentes medidos por duplicado. Datos representados en la figura C.38.

Los PUFAS inhiben la activación de Rho A. Al igual que sucedía con la isoprenilación de proteínas, este efecto es superior para EPA y AA que para DHA.

C.5.5.- Efecto de los PUFAs sobre la expresión de genes que codifican para PPAR- γ , LXR y SREBP

C.5.5.1.- Gen *ppar- γ*

La figura C.39 muestra el efecto de los PUFAs sobre la expresión, a nivel de mRNA, del gen de *ppar- γ* .

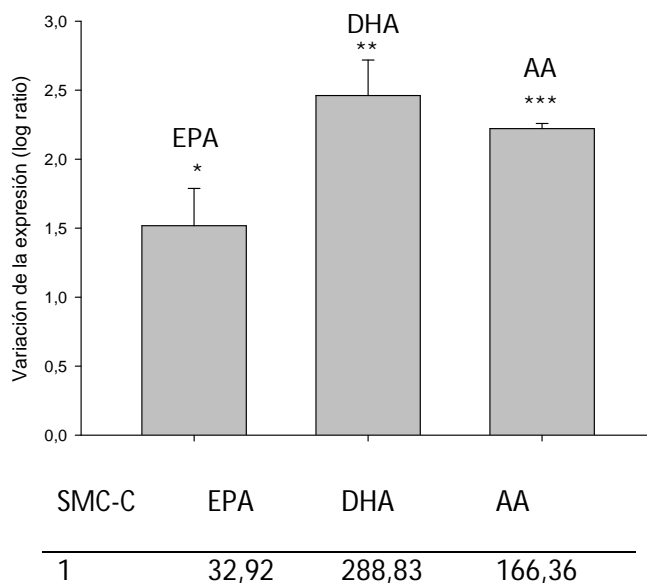


Figura C.39. Variación de la expresión (mRNA) del gen de *ppary* (con respecto a *gapdh*), en SMC-C incubadas con EPA, DHA y AA durante 48h, representado como el logaritmo de esta relación. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

Los PUFAs estudiados producen un fuerte aumento en la expresión de *ppa-γ* en SMC-C. Para SMC-Ch la variación de la expresión fue muy similar, no encontrando diferencias significativas entre los valores observados en SMC-Ch respecto a los observados en SMC-C por lo que no se muestran en la figura.

C.5.5.2.- Gen *Ixr*

La figura C.40 muestra el efecto de los PUFAs sobre la expresión, a nivel de mRNA, del gen *Ixr*.

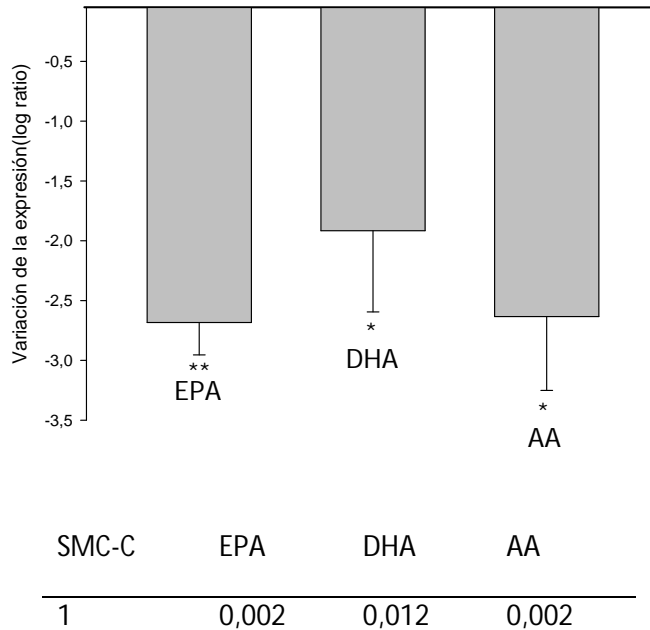


Figura C.40. Variación de la expresión (mRNA) del gen *lxr* (con respecto a *gapdh*), en SMC-C incubados con EPA, DHA y AA durante 48h, representado como el logaritmo de esta relación. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

Los PUFAs producen una fuerte disminución de la expresión de *lxr* en SMC-C. En SMC-Ch la variación de la expresión de este gen fue muy similar (sin diferencias significativas entre estos valores) por lo que no se muestran en la figura.

C.5.5.3.- Gen *srebp-1*

La figura C.41 muestra el efecto de los PUFAs sobre la expresión, a nivel de mRNA, del gen *srebp-1*.

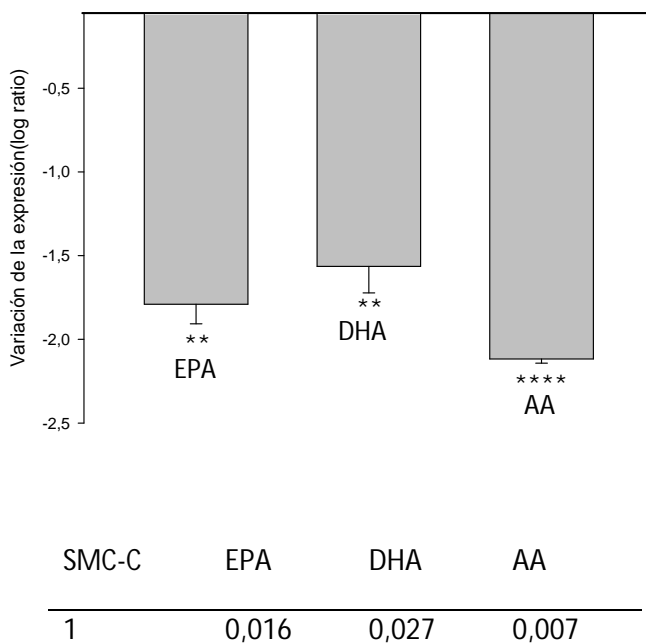


Figura C.41. Variación de la expresión (mRNA) del gen *srebp-1* (con respecto a *gapdh*), en SMC-C incubadas con EPA, DHA y AA durante 48h, representado como el logaritmo de esta relación. Los resultados están expresados como media \pm SEM de al menos 3 determinaciones (* $P < 0,05$; ** $P < 0,005$; *** $P < 0,0005$). La tabla anexa muestra el valor de la variación de la expresión de mRNA representado en la figura.

Los PUFAs producen una fuerte disminución de la expresión de *srebp-1*. Para SMC-Ch la variación de la expresión no mostró diferencias significativas respecto a las obtenidas para SMC-C, por lo que no se muestra en la figura.

Discusión

D.1.- Papel del colesterol en la matriz extracelular

Las SMC sufren una serie de alteraciones como respuesta fisiológica a daños en la pared vascular o en la remodelación de los vasos. No obstante, estos cambios son la base de enfermedades como la aterosclerosis y restenosis. La proliferación, la apoptosis, la migración y la síntesis de la ECM por parte de estas células, contribuyen a los cambios de la arquitectura vascular en el desarrollo de la enfermedad ⁵³⁵⁻⁵³⁸. Situaciones como la hiperlipemia alteran la expresión de genes en las células SMC, lo que desencadena estas respuestas patológicas. El colesterol de la dieta es uno de los factores de riesgo que pueden iniciar estos cambios ⁵³⁹. 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 ^{61, 540-542}. Estudios 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 ⁶⁰. El mantenimiento de dicha dieta durante 10 días no produce placas ateromatosas observables por microscopía electrónica, no obstante las células de músculo liso arterial obtenidas de estos animales y cultivadas (SMC-Ch), muestran diferencias tanto en la proliferación como a nivel molecular con respecto a las obtenidas de pollos alimentados con dieta control (SMC-C). 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 ^{60, 543-545}.

En las lesiones tempranas, las SMC contribuyen al desarrollo de la placa ateromatosa a través de la producción, entre otras cosas, de ECM que participa del

engrosamiento de la pared y favorece la retención de las lipoproteínas en el subendotelio. Sin embargo, en fases más avanzadas de la enfermedad las SMC también son las encargadas de generar una cubierta fibrosa rica en ECM que cubre el núcleo lipídico y da estabilidad a la placa. Nuestros resultados muestran cómo las células procedentes de pollos en las fases iniciales de la aterosclerosis, alimentados con una dieta suplementada con colesterol al 5% durante 10 días, presentan un fuerte incremento en la síntesis de colágeno (figura C.5). En este sentido, la expresión de los colágenos tipo I, II y III y fibronectina, se encuentran muy incrementadas tanto a nivel de su mRNA (figuras C.1 y C.2) como a nivel de su proteína (figura C.3). Esta sobreproducción de ECM evidencia los fuertes cambios fenotípicos que produce el colesterol en estas células. De hecho, la sobreexpresión de estas proteínas es uno de los indicadores del cambio fenotípico de las SMC a su fenotipo sintético, especialmente los colágenos I y III, y uno de los desencadenantes principales de la hipertrofia vascular ⁵⁴⁶. Estudios con aortas humanas ponen de manifiesto que existe una fuerte acumulación de colágenos en las fases iniciales de la aterosclerosis, que está inducida por un acumulo de colesterol en la célula ^{142, 547}. Otros estudios con cultivos primarios de SMC muestran cómo un aporte de colesterol a la célula usando sueros procedente de pacientes hipercolesterolémicos ^{548, 549}, o con medios de cultivo ricos en LDL ^{550, 551}, producen cambios a nivel de la síntesis de ECM similares a los encontrados en nuestros experimentos. Por otro lado, no encontramos efectos significativos por parte de la dieta rica en colesterol en la expresión de *MMP2* (figura C.2). Este hecho junto a la ausencia de valores detectables del mRNA de la *MMP9* (datos no mostrados), evidencia que el proceso aterosclerótico se encuentra en la fase inicial, ya que la sobreexpresión de estos genes se produce en fases más tardías de la enfermedad y está asociada a la inestabilidad de la placa ateromatosa ^{552, 553}. Por otra parte, se ha descrito que un aporte de colesterol a los cultivos mediante colesterol soluble produce cambios en las SMC que conducen a su transformación en células espumosas ⁹⁰. Estas células transformadas están presentes en las lesiones ateroscleróticas desde las fases iniciales de la aterosclerosis y es uno de los hechos que desencadena el

desarrollo de la enfermedad ⁴. En este sentido, nuestros resultados demuestran que un aporte de colesterol *in vitro* produce cambios a nivel de la ECM muy similares a los de la dieta hipercolesterolémica (figuras C.1, C.2 y C.4), lo que ratifica los resultados encontrados en nuestro modelo aviar de aterosclerosis temprana.

El mecanismo por el cual el colesterol produce estos fuertes cambios en el fenotipo de las SMC no está muy bien definido. No obstante, existen tres factores de transcripción (PPAR γ , SREBP-1 y LXR) que están fuertemente regulados por el contenido de colesterol intracelular.

PPAR γ es una de las moléculas más importantes en la regulación de metabolismo lipídico y está involucrada en los cambios experimentados por las células vasculares, especialmente en la migración y proliferación de las SMC ^{381, 394, 395}. En nuestros experimentos vemos como el colesterol en la dieta produce una fuerte disminución en la expresión de PPAR γ (figura C.14), lo que podría estar implicado en el incremento de la síntesis de ECM en las SMC, como se ha visto que ocurre en otros tipos celulares⁵⁵⁴⁻⁵⁵⁷.

Con respecto a los factores de transcripción SREBP y LXR, se sabe que son los encargados de regular el contenido de colesterol en la célula. Así, en una situación normal, una bajada de colesterol induce la expresión de SREBP, lo que desencadena una respuesta que da lugar a un aumento en la síntesis de colesterol en la célula ⁴¹³⁻⁴¹⁵. LXR regula el transporte de colesterol en la célula, de modo que un incremento de colesterol induce su expresión y con ello el transporte de colesterol al exterior de la célula ⁴²³. En nuestros estudios encontramos que los niveles de mRNA de *lxr* y *srebp-1* están incrementados en SMC-Ch respecto a SMC-C (figuras C.15 y C.16). Este hecho pone de manifiesto la fuerte desregulación con respecto al metabolismo lipídico que presentan las SMC-Ch, las cuales duplican su contenido de colesterol intracelular

respecto a SMC-C, después de 20 días en cultivo ⁶⁰. Los cambios observados en la matriz podrían estar mediados por estos factores de transcripción, ya que se ha visto que regulan la expresión de algunas proteínas de matriz. Así por ejemplo los SREBPs media en la expresión del colágeno tipo VI en respuesta a LDL ⁵⁵⁸ y LXR reprime la expresión de MMP9 ⁵⁵⁹. No obstante son necesarios nuevos experimentos que pongan de manifiesto el papel de estos factores de transcripción en la síntesis y la remodelación de la ECM por parte de las SMC.

D.2.- Efecto de las estatinas y el estado de activación de Rho A y H-Ras sobre la ECM.

Como se ha descrito anteriormente, las estatinas son inhibidores específicos de la HMG-CoA reductasa, el enzima principal en la regulación de la biosíntesis de colesterol, y uno de los fármacos hipolipemiantes más utilizados como tratamiento de la hipercolesterolemia. En nuestros estudios encontramos que las estatinas producen una fuerte inhibición en la síntesis de colágeno (figura C.5). Esta inhibición hace que la síntesis de colágeno en las SMC procedentes de pollos hipercolesterolémicos (SMC-Ch) disminuya a valores muy similares a las procedentes de animales control (SMC-C). Este efecto de la lovastatina revierte al añadir al medio de cultivo mevalonato, que es el producto de la reacción catalizada por la HMG-CoA reductasa. Además, la expresión de los colágenos tipo I, II y III y fibronectina (figuras C.6, C.7, C.8 y C.10, respectivamente) sigue un patrón idéntico al anterior. Este hecho, en el caso de la cadena alfa del colágeno tipo 1 responde a una inhibición a nivel del promotor (figura C.9). En este sentido, nuestros resultados son muy similares a los obtenidos previamente en cultivos de SMC humanas ^{560, 561}. No obstante, en fases tardías de la enfermedad se ha visto que las estatinas producen un incremento en la síntesis de matriz extracelular, lo que estabiliza la placa ateromatosa ⁴⁴⁶, y evidencia el doble papel de la ECM en el desarrollo de la enfermedad. Con respecto a la MMP2 los datos obtenidos muestran

como la lovastatina inhibe la expresión de su gen en SMC-C y sobre todo en SMC-Ch (figura C.11). Este efecto es similar al encontrado en otros modelos animales de aterosclerosis y en pacientes ateroscleróticos tratados con estatinas ⁵⁶²⁻⁵⁶⁴, en los que se demuestra una reducción de la expresión de *MMP2* en la placa ateromatosa que se asocia con la estabilización de la placa producida por estos fármacos.

A pesar de que las estatinas actúan principalmente como hipolipemiantes, actualmente se han descrito diferentes efectos de estos medicamentos independientes de los niveles plasmáticos de LDL. Estos efectos se denominan pleiotrópicos y contribuyen al resultado clínico beneficioso de estos fármacos. La estabilidad de la placa, el descenso del estrés oxidativo y de la inflamación, o la inhibición de la respuesta trombogénica, son algunos de los efectos pleiotrópicos de las estatinas ⁵⁶⁵. Una de las causas por la que se producen estos efectos, es la inhibición de la modificación postraduccional de proteínas isopreniladas. La falta de isoprenoides como consecuencia de la inhibición de la vía del mevalonato, produciría la inactivación de muchas proteínas, que necesitan ser modificadas por isoprenilación. En este sentido, nosotros encontramos que un aporte de colesterol en la dieta induce fuertemente la isoprenilación de proteínas en las SMC. La lovastatina produce el efecto contrario, que revierte al añadir al medio mevalonato y GGPP (figura C.12). Estos efectos son paralelos a los encontrados en la síntesis y la expresión de las proteínas de matriz estudiadas. De este modo, tratamos las células con inhibidores específicos de farnesil y geranil-geranil transferasas para determinar si el colesterol y las estatinas median en la expresión de las proteínas de matriz alterando la isoprenilación de proteínas en las SMC, o si por el contrario estos hechos son paralelos y/o dependientes de otras rutas. Así, observamos cómo la inhibición de farnesil transferasa (mediante manumicina A) y geranil-geranil- transferasas (con GTI-218) producen un efecto inhibitorio a nivel de las proteínas de ECM en las SMC muy similar al encontrado para la lovastatina (figuras C.6, C.7, C.8, C.10 y C.11). De este modo, podemos concluir que el efecto observado por el colesterol y las estatinas en las SMC a nivel de la ECM, está mediado por una alteración en la isoprenilización de proteínas en la célula.

La isoprenilación es especialmente importante en la familia de proteínas pequeñas que unen GTP, las cuales están involucradas en diversos procesos celulares y en la regulación de la expresión de diferentes genes ²⁹⁹. Por lo general las proteínas que necesitan ser modificadas por geranilgeraniol, pertenecen a la familia de proteínas Rho, mientras que las que necesitan ser modificadas por un farnesol, pertenecen a la familia de proteínas Ras. En nuestros experimentos vemos cómo la inhibición tanto de geranilgeranil transferasas como de farnesiltransferasas inhibía la síntesis de ECM. Esto hace pensar que ambas rutas están actuando en la regulación de la expresión de la ECM, y que el efecto del colesterol y las estatinas es dependiente de estas dos rutas. En este sentido, los mutantes dominantes negativos para Rho A obtenidos en nuestros experimentos muestran una fuerte disminución la producción de las proteínas de ECM estudiadas en las SMC (figuras C.17, C.18, C.20 y C.23), mientras que en los mutantes dominantes positivos se produce el efecto contrario (figuras C.17, C.19, C.21, C.24). Este efecto a nivel de *col1a2* se ejerce a nivel de su promotor (fig C.22). Los mutantes dominantes positivos y negativos de H-Ras muestran un comportamiento a nivel de la ECM muy similar a los de Rho A (C.17 y C.22). De este modo, nuestros resultados demuestran que el colesterol y las estatinas regulan la activación de Rho A y H-Ras, y que estas proteínas son cruciales en la regulación de la síntesis de ECM en las SMC. Estudios previos demuestran que estas proteínas juegan un papel fundamental en la proliferación, la migración, la supervivencia y el fenotipo de las SMC ^{341, 342, 352, 452, 566}. No obstante el papel de estas proteínas en la síntesis de ECM no está muy bien caracterizado y es uno de los resultados más importantes de la presente tesis doctoral.

Por otro lado, los tratamientos con estatinas en nuestras células producen un fuerte incremento en la expresión del gen que codifica para PPAR γ (figura C.15). Cabe pensar que la sobre expresión de este factor de transcripción por efecto de las estatinas pueda producirse como respuesta a un cambio en el contenido de colesterol de la célula. En este sentido, otros trabajos demuestran que el incremento de la

expresión de *PPAR γ* por efecto de las estatinas es independiente del contenido de colesterol en la célula, y que un aporte de colesterol *in vitro* no revierte los efectos de las estatinas sobre *PPAR γ* ⁵⁶⁷. Este hecho está en concordancia con nuestros resultados, ya que vemos cómo los efectos de la lovastatina sobre *PPAR γ* revierte al añadir GGPP, que no es un producto intermedio de la síntesis de colesterol, sino un intermediario de las vías en las que se ramifica la ruta del mevalonato. Además, los inhibidores de isoprenil transferasas producen un efecto similar al observado con el tratamiento con lovastatina. Todo esto sugiere que la activación de las GTPasas pequeñas de membrana juega un papel fundamental en este proceso en las SMC. De hecho, estudios recientes han demostrado que el efecto de las estatinas sobre *PPAR α* y *PPAR γ* es dependiente de la inhibición de Rho A y otras proteínas G pequeñas como Cdc42 ^{567, 568}, en células hepáticas y macrófagos.

Con respecto a los otros dos factores de transcripción estudiados, las estatinas producen una fuerte disminución de la expresión de los genes que codifican para LXR y SREBP-1 en las SMC (figura C.15 y C.16). En este sentido, otros trabajos han demostrado que las estatinas disminuyen la expresión de *SREBP-1* e incrementa la expresión de *SREBP-2* en varios tipos celulares ^{569, 570}. Este efecto se debe a que SREBP-1 es el factor de transcripción encargado de la expresión basal de los genes implicados en el metabolismo lipídico, mientras que *SREBP-2* se encarga de inducir la transcripción de los genes responsables de la biosíntesis del colesterol como respuesta a una disminución en la concentración de esteroides. Con respecto a las proteínas G de membrana, se ha demostrado que SREBP media la activación de Rho A, en un mecanismo que es dependiente de la modulación del metabolismo del colesterol ejercido por este factor de transcripción ⁵⁷¹. Además, se ha visto que la sobre expresión de H-Ras produce una sobre expresión de SREBP-1. En este sentido, nuestros resultados muestran cómo el efecto de las estatinas revierte con la adición de mevalonato y GGPP al medio (figura C.16). Esto, junto con el hecho de que la inhibición

de farnesil transferasas y geranylgeranyl transferasas, produzca una fuerte inhibición en la expresión de *SREBP-1* (figura C.16), hace pensar que existe una relación entre la activación de las GTPasas pequeñas y SREBPs, y que esto tiene un papel fundamental en la expresión de las proteínas de la ECM.

LXR activa la transcripción de diversos genes en respuesta a derivados oxidados del colesterol ^{572, 573}. Además, regula la expresión de la mayoría de los genes involucrados en el transporte de colesterol en la célula, como *abcA1*, *abcG1* y *apoE*. En este sentido, se ha demostrado que las estatinas inhiben la expresión del gen que codifica para LXR y sus genes diana, inhibiendo la síntesis de oxisteroles en macrófagos ⁵⁷⁴⁻⁵⁷⁶. No obstante este hecho no está muy bien definido, ya que otros autores postulan que las estatinas producen el efecto contrario en los mismos tipos celulares ⁵⁷⁷. Con respecto a la relación existente entre las proteínas G de membrana y estos genes, también existe una fuerte controversia. Por un lado se ha descrito que los genes activados por LXR, que regulan el flujo de colesterol en la célula, activan a las proteínas G de membrana ^{578, 579}. Además, en este sentido se ha visto que síndromes metabólicos como la enfermedad de Tangier, en los que existe un fuerte incremento en el flujo de colesterol, están relacionados con una sobreactivación de GTPasas pequeñas y que una inhibición de éstas disminuye el flujo de colesterol y mejora los niveles de lípidos plasmáticos ^{580, 581}. Por otro lado, otros autores postulan el efecto contrario, de modo que la inhibición de proteínas G produce un incremento del flujo de colesterol que esta mediado por un incremento en la expresión de LXR ⁵⁷⁷.

Nuestros resultados muestran que las estatinas inhiben la expresión de LXR en las SMC, efecto que revierte al añadir al medio de cultivo mevalonato y GGPP (figura C.15). Además, la inhibición de farnesil transferasas y geranylgeranyl transferasas, produce un efecto similar al observado con la lovastatina. Estos datos hacen pensar que existe una relación directa entre ambas rutas, de modo que una inhibición de proteínas G produce una disminución en la expresión de LXR.

D.3.- Efecto de la doxiciclina sobre la ECM

Las tetraciclinas poseen propiedades no inherentes a su actividad bactericida que le confieren propiedades antiateroscleróticas tales como la inhibición de la proliferación y la migración celular ^{478, 479}, así como la inhibición de síntesis de ECM y hiperplasia intimal ^{480, 481}. Estos hechos hacen que haya una importante investigación sobre el uso profiláctico de este fármaco en síndromes cardíacos agudos ^{582, 583}.

Con respecto a la ECM, aunque el efecto inhibitorio sobre la actividad de las MMPs en las SMC está bien descrito ^{523, 584-586}, poco se sabe sobre el efecto de este fármaco sobre la producción de ECM por las SMC. Con respecto a esto, lo único que se sabe es que la doxiciclina inhibe la producción de colágeno y PGs en condriocitos de rata ^{587, 588}, hecho que está directamente relacionado con el efecto de este fármaco en la osteoartritis. Nuestros resultados demuestran por primera vez que la doxiciclina inhibe la síntesis y la expresión de proteínas de ECM, en particular a nivel de la síntesis de colágeno (figura C.25) y la expresión de colágeno I, II y III y fibronectina (Figuras C.26) .

La disminución de la síntesis de proteínas de la ECM en las SMC tiene que estar íntimamente relacionada con la disminución del engrosamiento intimal descrita en otros trabajos ⁴⁸⁰. En este proceso, además de un incremento en la proliferación y la migración de las SMC (íntimamente relacionadas con las MMPs) es fundamental que se produzca un aumento en la síntesis de ECM que sirva de andamiaje para que las células puedan crecer y migrar.

Con respecto al mecanismo por el cual la doxiciclina produce este efecto, se ha achacado a la capacidad quelante de iones divalentes de las tetraciclinas ⁴⁷³. No obstante, esta propiedad solo explica la inhibición, en parte, de la actividad de las MMPs al secuestrar el Zn^{2+} necesario para su función. Estudios recientes han demostrado que las tetraciclinas inhiben las rutas de señalización de las MAPKs kinasas y de la PI3K ^{479, 482} dos de las rutas de señalización más importantes en la célula

y que están estrechamente relacionadas con las proteínas G de membrana. Nuestros resultados muestran que la doxiciclina inhibe la isoprenilación de proteínas (figura C.27) y con ello la activación de Rho A (figura C.28). Además, el tratamiento con doxiciclina produce una fuerte inducción de la expresión de *PPAR* γ y una disminución de la expresión de SREBP-1 (figura C.29).

De este modo, la doxiciclina produce un efecto muy similar a la lovastatina y a los inhibidores de prenil-transferasas estudiados. Esto sugiere que los efectos anti-aterogénicos de la doxiciclina, al igual que en el caso de las estatinas, están relacionados con las vías de isoprenilación de proteínas y la activación de proteínas G.

D.4.- Efecto de los PUFA sobre la ECM

Los ácidos grasos poli-insaturados poseen un efecto protector frente a la aterosclerosis gracias a su capacidad de influenciar en la coagulación sanguínea, el perfil de los lípidos plasmáticos, la inflamación y la presión sanguínea. De todos ellos, el efecto más conocido derivado del consumo de ácidos grasos poli-insaturados es el hipolipemiante ^{490, 589}. En este sentido, la acción de estos compuestos sobre el metabolismo del colesterol en nuestro modelo experimental celular de aterosclerosis temprana en pollos está bien caracterizado ⁵⁹⁰⁻⁵⁹³. De este modo, el aceite de pescado rico en PUFAS produce una fuerte disminución en la concentración de colesterol y en la actividad de la HMG-Co A reductasa en estos animales. Además, produce una disminución en la proliferación y la apoptosis en las SMC-C y SMC-Ch ⁵⁹⁴. En este sentido, uno de los objetivos de esta tesis doctoral ha sido estudiar el papel de los ácidos grasos poli-insaturados en la producción y remodelación de la ECM en SMC, así como la posible implicación de las Rho A en este proceso. De este modo, nuestros resultados muestran cómo tanto los ácidos grasos de la serie n=3 (EPA y DHA), como los de la serie n=6 (AA) inhiben fuertemente la isoprenilación de proteínas y la

activación de Rho A en las SMC (figura C.36 y C.37, respectivamente). Este efecto es similar al encontrado en otros estudios para H-Ras en SMC ⁵⁹⁵, y se ha relacionado con el efecto antiproliferativo de los PUFAs.

Con respecto a los factores de transcripción estudiados, los tratamientos con EPA, DHA y AA, producen un fuerte incremento en la expresión del gen que codifica para *PPARγ* (figura C.38). En este sentido, se ha demostrado que tanto los ácidos grasos poli-insaturados como sus derivados unidos a coenzima A, producen una activación de la producción de *PPARγ* ⁵⁹⁶. Además, encontramos que los PUFAs inhiben la expresión del gen que codifica para *SREBP-1* en las SMC (figura C.40). Así, en otros tipos celulares se ha visto que los PUFA inhiben la expresión del mRNA de *SREBP-1* e incrementan su degradación^{597, 598}. De este modo, la activación de *PPARγ* junto la inhibición de *SREBP-1* producida por los PUFAs, debe influir en multitud de procesos celulares. Dado el papel anti-aterogenico y anti-inflamatorio de la modulación de estos dos factores de transcripción, debe de ser una de las rutas por los que los PUFAs ejercen sus efectos beneficiosos.

Con respecto a la producción de ECM, no encontramos cambios en la síntesis de colágeno por efecto del EPA, mientras que DHA y AA la disminuyen (figura R30). Estos resultados son similares a los encontrados en otros tipos celulares ⁵⁹⁹⁻⁶⁰¹. En relación con la expresión de los genes estudiados, la expresión de *colágeno I* incrementa con EPA y DHA, y disminuye con AA (figura R31). Con respecto a los *colágenos II y III* y la *fibronectina*, los tres PUFAs producen una fuerte inhibición de la síntesis de su mRNA (figuras C.32, C.33 y C.34). Los cambios producidos en la síntesis de colágeno por los PUFAs están mediados, al menos en parte, por los precursores de los eicosanoides y genes relacionados con su síntesis, como la ciclo oxigenasa ^{599, 602}. En este sentido, se ha demostrado que un incremento en prostaglandina E₂ (PEG₂) inhibe

la expresión de *coágono* I, II y *fibronectina* en fibroblastos ^{600, 603}. Además, otros protanoides derivados de los PUFAs, como las prostaglandinas D (PGD) también presentan un efecto inhibitorio de la síntesis de matriz extracelular, que es dependiente de PPAR γ ⁶⁰⁴. Los distintos efectos ejercidos por estos eicosanoides están mediados por la unión a sus receptores ^{605, 606}. De este modo, se ha descrito que el efecto inhibitorio de PEG₂ sobre la expresión de *colágeno* tipo I en fibroblastos, esta mediada por la unión de esta prostaglandina a sus receptores EP₄⁶⁰⁷ y EP₂⁶⁰⁸, pero no a EP₃ y EP₁⁶⁰⁸. En este sentido, se ha visto que EP₂⁶⁰⁹ inhibe la activación de Rho A, mientras que EP₁ y EP₃ no alteran su activación ⁶¹⁰ en fibroblastos. En su conjunto, estos datos junto con nuestros resultados en SMC, sugieren que los PUFA inhiben la síntesis de ECM a través de las rutas de activación de sus derivados eicosanoides y que este efecto es dependiente de las rutas de activación de Rho A y de PPAR.

Con respecto a las MMPs se ha descrito que el EPA inhibe la expresión de MMP2 y MMP9 en los macrófagos provenientes de ratones deficientes en ApoE, hecho que se relaciona con la estabilización y la reducción de la placa ateromatosa por efecto de los PUFA en estos ratones ⁶¹¹. En este sentido, se ha demostrado que este efecto es dependiente de PPARs en macrófagos ⁶¹¹. En otros tipos celulares se han encontrado efectos muy similares en los tratamientos con EPA y DHA ⁶¹²⁻⁶¹⁴. Nuestros resultados en SMC se asemejan mucho a los citados anteriormente, de modo que los tres PUFAs disminuyen la expresión de MMP2 en las SMC e incrementan la expresión de PPAR γ (figuras C.35 y C.38). Con respecto al AA, los efectos de esta molécula sobre la expresión de la MMP2 en las células vasculares no están bien caracterizados. No obstante se han descrito algunos efectos de los eicosanoides derivados de esta molécula con relación a las MMPs. Así, se sabe que la secreción de MMP9 por parte de los macrófagos de la placa ateromatosa ocurre por un mecanismo dependiente de PGE₂ ⁶¹⁵. Por otro lado, las PGD producen un fuerte efecto antiinflamatorio, lo que va acompañado de una disminución en la producción de MMPs ⁶¹⁶. En este sentido, se ha

demostrado que el balance entre la síntesis de PGE/PGD es crucial en la expresión de MMPs en la aterosclerosis. Así, para que se produzca una sobreexpresión de MMPs es necesario que estén inducidas la ciclooxigenasa 2 (COX2, enzima clave en la transformación de AA a PGH, precursor de PGE y PGD) y prostaglandina E sintasa (biosíntesis de PGE), mientras que la actividad prostaglandina D sintasa (biosíntesis de PGD) debe de estar inhibida. Por el contrario, si la prostaglandina D sintasa está activa se produce un fuerte incremento de la expresión de PPAR γ , lo que va acompañado de un fuerte efecto inhibitorio de las MMPs ⁶¹⁶. En este sentido, nosotros encontramos que el AA produce una fuerte inducción de la expresión de PPAR γ (figura C.38) y una fuerte disminución en la expresión de MMP2 (figura C.35), lo que hace pensar que el AA produce que el balance PGE/PGD en las SMC se decante hacia este último. No obstante serían necesarios nuevos experimentos que demuestren este hecho.

Conclusiones

-
1. El aporte de colesterol tanto en la dieta como en cultivo, produce un fuerte incremento de la producción de matriz extracelular en cultivos de SMC. Este efecto es dependiente de la isoprenilación de proteínas y de la activación de proteínas G de membrana, y en él podrían estar involucrados los factores de transcripción PPAR γ , SREBP-1 y LXR.
 2. Las estatinas inhiben la producción y la remodelación de matriz extracelular en cultivos de SMC. Este efecto es dependiente de la isoprenilación de proteínas y de la activación de proteínas G de membrana, y en él podrían estar involucrados los factores de transcripción PPAR γ , SREBP-1 y LXR.
 3. La doxiciclina inhibe la producción y la remodelación de matriz extracelular en los cultivos de SMC. Este efecto es dependiente de la isoprenilación de proteínas y de la activación de proteínas G de membrana, y en él podrían estar involucrados los factores de transcripción PPAR γ , SREBP-1 y LXR.
 4. El efecto de los PUFAs sobre la matriz extracelular en cultivos de SMC varía según el PUFA y el gen. Así, EPA y DHA incrementan la expresión de *col1 α 2* y AA la disminuye. La expresión de *col2 α 1a*, *col3 α 1*, *fibronectina* y *mmp2*, disminuye por efecto de EPA DHA y AA. Los PUFAs inhiben la activación de Rho A y la expresión de *srebp-1* e inducen la expresión de *ppary*. Estos hechos podrían estar involucrados en los efectos sobre la matriz extracelular encontrados.

1. Murray CJL SJ, Mathers CD, Lopez AD (eds.) *Summary measures of population health: concepts, ethics, measurement and applications*. Geneva: WHO; 2002.
2. Yusuf S, Reddy S, Ounpuu S, Anand S. Global burden of cardiovascular diseases: Part II: variations in cardiovascular disease by specific ethnic groups and geographic regions and prevention strategies. *Circulation*. 2001;104:2855-2864.
3. Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Truszczynska H, Sharma SK, Badimon JJ, O'Connor WN. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation*. 2004;110:2032-2038.
4. Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J*. 1999;138:S419-420.
5. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*. 1990;323:27-36.
6. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J*. 1989;3:2007-2018.
7. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991;43:109-142.
8. Vanhoutte PM, Corcaud S, de Montrion C. Venous disease: from pathophysiology to quality of life. *Angiology*. 1997;48:559-567.
9. Ross R. Atherosclerosis: current understanding of mechanisms and future strategies in therapy. *Transplant Proc*. 1993;25:2041-2043.
10. Camejo G, Hurt-Camejo E, Wiklund O, Bondjers G. Association of apo B lipoproteins with arterial proteoglycans: pathological significance and molecular basis. *Atherosclerosis*. 1998;139:205-222.
11. Camejo G. Hydrolytic enzymes released from resident macrophages and located in the intima extracellular matrix as agents that modify retained apolipoprotein B lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23:1312-1313.
12. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature*. 2002;420:868-874.
13. Sary HC. Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis*. 1989;9:119-32.
14. Freedman DS, Newman WP, 3rd, Tracy RE, Voors AE, Srinivasan SR, Webber LS, Restrepo C, Strong JP, Berenson GS. Black-white differences in aortic fatty streaks in adolescence and early adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Circulation*. 1988;77:856-864.
15. Libby P. Atheroma: more than mush. *Lancet*. 1996;348 Suppl 1:s4-7.
16. Ferns GA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science*. 1991;253:1129-1132.

17. Calara F, Ameli S, Hultgardh-Nilsson A, Cercek B, Kupfer J, Hedin U, Forrester J, Shah PK, Nilsson J. Autocrine induction of DNA synthesis by mechanical injury of cultured smooth muscle cells. Potential role of FGF and PDGF. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996;16:187-193.
18. Chamley-Campbell J, Campbell GR, Ross R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol Rev.* 1979;59:1-61.
19. Chamley-Campbell JH, Campbell GR, Ross R. Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. *J Cell Biol.* 1981;89:379-383.
20. Llorente-Cortes V, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Esterified cholesterol accumulation induced by aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells is reduced by HMG-CoA reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:738-746.
21. Llorente-Cortes V, Otero-Vinas M, Sanchez S, Rodriguez C, Badimon L. Low-density lipoprotein upregulates low-density lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells: possible involvement of sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circulation.* 2002;106:3104-3110.
22. Murakami T, Yamada N. Modification of macrophage function and effects on atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1996;7:320-323.
23. Badimon L, Badimon JJ, Cohen M, Chesebro JH, Fuster V. Vessel wall-related risk factors in acute vascular events. *Drugs.* 1991;42 Suppl 5:1-9.
24. Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi. *Circulation.* 1992;86:III74-85.
25. Badimon L, Fuster V, Corti R, Badimon JJ. Coronary thrombosis: local and systemic factors. In: V F, ed. *Hurst's the heart, 11th Edition.* New York: McGraw-Hill; 2004.
26. Badimon L, Fuster V, Corti R, Badimon JJ. Interaction of platelet activation and thrombosis. In: Fuster V, Topol EJ, Nabel EG, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease (Second Edition).* Philadelphia
Lippincott-RavenPublishers
2004.
27. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997;89:331-340.
28. Libby P. The active roles of cells of the blood vessel wall in health and disease. *Mol Aspects Med.* 1987;9:499-567.
29. Gouni-Berthold I, Sachinidis A. Possible non-classic intracellular and molecular mechanisms of LDL cholesterol action contributing to the development and progression of atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol.* 2004;2:363-370.
30. Sachinidis A, Locher R, Mengden T, Vetter W. Low-density lipoprotein elevates intracellular calcium and pH in vascular smooth muscle cells and fibroblasts

- without mediation of LDL receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;167:353-359.
31. Scott-Burden T, Resink TJ, Hahn AW, Baur U, Box RJ, Buhler FR. Induction of growth-related metabolism in human vascular smooth muscle cells by low density lipoprotein. *J Biol Chem.* 1989;264:12582-12589.
 32. Sachinidis A, Seewald S, Epping P, Seul C, Ko Y, Vetter H. The growth-promoting effect of low-density lipoprotein may be mediated by a pertussis toxin-sensitive mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Pharmacol.* 1997;52:389-397.
 33. Zhu Y, Lin JH, Liao HL, Friedli O, Jr., Verna L, Marten NW, Straus DS, Stemerman MB. LDL induces transcription factor activator protein-1 in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:473-480.
 34. Metzler B, Li C, Hu Y, Sturm G, Ghaffari-Tabrizi N, Xu Q. LDL stimulates mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 expression, independent of LDL receptors, in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1862-1871.
 35. Xu CB, Hansen-Schwartz J, Edvinsson L. Sphingosine signaling and atherogenesis. *Acta Pharmacol Sin.* 2004;25:849-854.
 36. Sanchez T, Hla T. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J Cell Biochem.* 2004;92:913-922.
 37. Siess W, Tigyi G. Thrombogenic and atherogenic activities of lysophosphatidic acid. *J Cell Biochem.* 2004;92:1086-1094.
 38. Schmitz U, Thommes K, Beier I, Vetter H. Lysophosphatidic acid stimulates p21-activated kinase in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;291:687-691.
 39. Ko Y, Totzke G, Seewald S, Schmitz U, Schiermeyer B, Meyer zu Brickwedde MK, Vetter H, Sachinidis A. Native low-density lipoprotein (LDL) induces the expression of the early growth response gene-1 in human umbilical arterial endothelial cells. *Eur J Cell Biol.* 1995;68:306-312.
 40. Zhu Y, Liao H, Wang N, Ma KS, Verna LK, Shyy JY, Chien S, Stemerman MB. LDL-activated p38 in endothelial cells is mediated by Ras. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001;21:1159-1164.
 41. Camera M, Mussoni L, Maderna P, Sironi L, Prati L, Colli S, Bernini F, Corsini A, Tremoli E. Effect of atherogenic lipoproteins on PAI-1 synthesis by endothelial cells. *Cytotechnology.* 1993;11 Suppl 1:S144-146.
 42. Pritchard KA, Ackerman AW, Ou J, Curtis M, Smalley DM, Fontana JT, Stemerman MB, Sessa WC. Native low-density lipoprotein induces endothelial nitric oxide synthase dysfunction: role of heat shock protein 90 and caveolin-1. *Free Radic Biol Med.* 2002;33:52-62.
 43. Rodriguez C, Raposo B, Martinez-Gonzalez J, Llorente-Cortes V, Vilahur G, Badimon L. Modulation of ERG25 expression by LDL in vascular cells. *Cardiovasc Res.* 2003;58:178-185.

44. Rodriguez JA, Nespereira B, Perez-Illzarbe M, Eguinoa E, Paramo JA. Vitamins C and E prevent endothelial VEGF and VEGFR-2 overexpression induced by porcine hypercholesterolemic LDL. *Cardiovasc Res.* 2005;65:665-673.
45. Moghadasian MH. Experimental atherosclerosis: a historical overview. *Life Sci.* 2002;70:855-865.
46. Ignatowski AC. Influence of animal food on the organism of rabbits. *S. Peterb. Izviest. Imp. Voenno-Med. Akad.* 1908;16:154–173.
47. Anitschkow N. Lesions of organs under lipid infiltration. *Proc. Med. Soc. Petersburg.* 1912;80:1-11.
48. Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol.* 2004;55:503-517.
49. Yanni AE. The laboratory rabbit: an animal model of atherosclerosis research. *Lab Anim.* 2004;38:246-256.
50. Bosze Z, Hiripi L, Carnwath JW, Niemann H. The transgenic rabbit as model for human diseases and as a source of biologically active recombinant proteins. *Transgenic Res.* 2003;12:541-553.
51. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science.* 1992;258:468-471.
52. Horlick L, Katz LN. Retrogression of atherosclerotic lesions on cessation of cholesterol feeding in the chick. *J Lab Clin Med.* 1949;34:1427-1442.
53. Orita S, Masegi T, Itou K, Kawada M, Yanai T, Ueda K. Spontaneous aortic arteriosclerosis in layer chickens. *J Comp Pathol.* 1994;110:341-347.
54. Mol MA, de Smet RC, Terpstra AH, West CE. Effect of dietary protein and cholesterol on cholesterol concentration and lipoprotein pattern in the serum of chickens. *J Nutr.* 1982;112:1029-1037.
55. Texon M. The hemodynamic concept of atherosclerosis. *Am J Cardiol* 1960;5:291-294.
56. Most NS, Benditt EP. The ultrastructure of spontaneous and experimental induced arterial lesions. I. The cholesterol-induced lesions and the effect of a cholesterol and oil diet on the preexisting spontaneous plaque in the chicken aorta. *Lab. Inv.* . 1970;22:521–530.
57. Most NS, Benditt EP. The ultrastructure of spontaneous and experimental induced arterial lesions. II. The spontaneous plaque in the chicken. *Lab. Inv.* . 1970;22:231–239.
58. Most NS, Benditt EP. The ultrastructure of spontaneous and experimental induced arterial lesions. I. An ultrastructural survey of the normal chicken aorta. *Lab. Inv.* . 1970;22:166–183.
59. Wong HY. The cockerel as an animal model for atherosclerosis research. *Adv Exp Med Biol.* 1975;63:381-391.
60. Carazo A, Alejandre J, Diaz R, Rios A, Castillo M, Linares A. Changes in cultured arterial smooth muscle cells isolated from chicks upon cholesterol feeding. *Lipids.* 1998;33:181-190.

61. Aguilera JA, Linares A, Arce V, Garcia-Peregrin E. Effect of dietary cholesterol on mevalonate metabolism by sterol and nonsterol pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;122:945-948.
62. Chandler RF, Hooper SN, Ismail HA. Antihypercholesterolemic studies with sterols: comparison of rats and chicks as animal model. *Can. J. Pharm. Sci.* . 1979;14.
63. Fernandez ML, Volek JS. Guinea pigs: a suitable animal model to study lipoprotein metabolism, atherosclerosis and inflammation. *Nutr Metab (Lond)*. 2006;3:17.
64. Gil A, Ramírez M, Aguilera M, Mesa M. Modelos experimentales de enfermedad cardiovascular. *Nutr Hosp*. 2007;22:169-177.
65. Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973;52:2745-2756.
66. Pomerat CM, Slick WC. Isolation and growth of endothelial cells in tissue culture. *Nature*. 1963;198:859-861.
67. Grafe M, Auch-Schwelk W, Graf K, Terbeek D, Hertel H, Unkelbach M, Hildebrandt A, Fleck E. Isolation and characterization of macrovascular and microvascular endothelial cells from human hearts. *Am J Physiol*. 1994;267:H2138-2148.
68. Hewett PW, Murray JC. Human microvessel endothelial cells: isolation, culture and characterization. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 1993;29A:823-830.
69. Schelling ME, Meininger CJ, Hawker JR, Jr., Granger HJ. Venular endothelial cells from bovine heart. *Am J Physiol*. 1988;254:H1211-1217.
70. Visner GA, Staples ED, Chesrown SE, Block ER, Zander DS, Nick HS. Isolation and maintenance of human pulmonary artery endothelial cells in culture isolated from transplant donors. *Am J Physiol*. 1994;267:L406-413.
71. van Hinsbergh VW, Kooistra T, Scheffer MA, Hajo van Bockel J, van Muijen GN. Characterization and fibrinolytic properties of human omental tissue mesothelial cells. Comparison with endothelial cells. *Blood*. 1990;75:1490-1497.
72. Jaffe EA. Endothelial cells. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds. *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*. New York; 1988.
73. Madri JA, Williams SK. Capillary endothelial cell cultures: phenotypic modulation by matrix components. *J Cell Biol*. 1983;97:153-165.
74. Huang AJ, Furie MB, Nicholson SC, Fischbarg J, Liebovitch LS, Silverstein SC. Effects of human neutrophil chemotaxis across human endothelial cell monolayers on the permeability of these monolayers to ions and macromolecules. *J Cell Physiol*. 1988;135:355-366.
75. Glassberg MK, Nolop KB, Jackowski JT, Abraham WM, Wanner A, Ryan US. Microvascular and macrovascular endothelial cells produce different constrictor substances. *J Appl Physiol*. 1992;72:1681-1686.
76. Del Vecchio PJ, Smith JR. Aging of endothelium in culture: decrease in angiotensin-converting enzyme activity. *Cell Biol Int Rep*. 1982;6:379-384.

-
77. Hoshi H, McKeehan WL. Brain- and liver cell-derived factors are required for growth of human endothelial cells in serum-free culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81:6413-6417.
 78. Owens GK, Geisterfer AA, Yang YW, Komoriya A. Transforming growth factor-beta-induced growth inhibition and cellular hypertrophy in cultured vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol*. 1988;107:771-780.
 79. Goldstein S. Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science*. 1990;249:1129-1133.
 80. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990;345:458-460.
 81. Hubbard K, Dhanaraj SN, Sethi KA, Rhodes J, Wilusz J, Small MB, Ozer HL. Alteration of DNA and RNA binding activity of human telomere binding proteins occurs during cellular senescence. *Exp Cell Res*. 1995;218:241-247.
 82. Stepp MA, Kindy MS, Franzblau C, Sonenshein GE. Complex regulation of collagen gene expression in cultured bovine aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1986;261:6542-6547.
 83. Kimes BW, Brandt BL. Characterization of two putative smooth muscle cell lines from rat thoracic aorta. *Exp Cell Res*. 1976;98:349-366.
 84. Kimes BW, Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. *Exp Cell Res*. 1976;98:367-381.
 85. Zeng C, Luo Y, Asico LD, Hopfer U, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. Perturbation of D1 dopamine and AT1 receptor interaction in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2003;42:787-792.
 86. Anand-Srivastava MB, Palaparti A. Angiotensin-II-induced enhanced expression of Gi proteins is attenuated by losartan in A10 vascular smooth muscle cells: role of AT1 receptors. *Can J Physiol Pharmacol*. 2003;81:150-158.
 87. Kambe T, Kinjyo N, Hiruki H, Kubo T. Basal transcriptional regulation of rat AT1 angiotensin II receptor gene expression. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004;31:96-100.
 88. Savoia C, Tabet F, Yao G, Schiffrin EL, Touyz RM. Negative regulation of RhoA/Rho kinase by angiotensin II type 2 receptor in vascular smooth muscle cells: role in angiotensin II-induced vasodilation in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2005;23:1037-1045.
 89. Gotlieb AI, Heggeness MH, Ash JF, Singer SJ. Mechanochemical proteins, cell motility and cell-cell contacts: the localization of mechanochemical proteins inside cultured cells at the edge of an in vitro "wound". *J Cell Physiol*. 1979;100:563-578.
 90. Rong JX, Shapiro M, Trogan E, Fisher EA. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:13531-13536.
 91. Rong JX, Kusunoki J, Oelkers P, Sturley SL, Fisher EA. Acyl-coenzymeA (CoA):cholesterol acyltransferase inhibition in rat and human aortic smooth muscle

- cells is nontoxic and retards foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:122-127.
92. Kang MA, Jeoung NH, Kim JY, Lee JE, Jung UJ, Choi MS, Lee WH, Kwon OS, Lee H, Park YB. Up-regulation of skeletal muscle LIM protein 1 gene by 25-hydroxycholesterol may mediate morphological changes of rat aortic smooth muscle cells. *Life Sci.* 2007;80:460-467.
93. Gonzalez-Timon B, Gonzalez-Munoz M, Zaragoza C, Lamas S, Melian EM. Native and oxidized low density lipoproteins oppositely modulate the effects of insulin-like growth factor I on VSMC. *Cardiovasc Res.* 2004;61:247-255.
94. Chuang M, Lee MW, Zhao D, Severson DL. Metabolism of a long-chain diacylglycerol by permeabilized A10 smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 1993;265:C927-933.
95. Cinatl J, Paluska E, Chudomel V, Malaskova V, Elleder M. Culture of macrophage cell lines from normal mouse bone marrow. *Nature.* 1982;298:388-389.
96. Tsuchiya S, Yamabe M, Yamaguchi Y, Kobayashi Y, Konno T, Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer.* 1980;26:171-176.
97. Tsuchiya S, Kobayashi Y, Goto Y, Okumura H, Nakae S, Konno T, Tada K. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* 1982;42:1530-1536.
98. Tajima S, Hayashi R, Tsuchiya S, Miyake Y, Yamamoto A. Cells of a human monocytic leukemia cell line (THP-1) synthesize and secrete apolipoprotein E and lipoprotein lipase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1985;126:526-531.
99. Sakai J, Hoshino A, Takahashi S, Miura Y, Ishii H, Suzuki H, Kawarabayasi Y, Yamamoto T. Structure, chromosome location, and expression of the human very low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem.* 1994;269:2173-2182.
100. Kohro T, Tanaka T, Murakami T, Wada Y, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T. A comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J Atheroscler Thromb.* 2004;11:88-97.
101. Nishimura N, Harada-Shiba M, Tajima S, Sugano R, Yamamura T, Qiang QZ, Yamamoto A. Acquisition of secretion of transforming growth factor-beta 1 leads to autonomous suppression of scavenger receptor activity in a monocyte-macrophage cell line, THP-1. *J Biol Chem.* 1998;273:1562-1567.
102. Kurata H, Matsumoto A, Fujiwara Y, Kondo K, Itakura H, Mitchell A, Fidge N. A candidate high density lipoprotein (HDL) receptor, HB2, with possible multiple functions shows sequence homology with adhesion molecules. *J Atheroscler Thromb.* 1998;4:112-117.
103. Ogru E, Libinaki R, Gianello R, West S, Munteanu A, Zingg JM, Azzi A. Modulation of cell proliferation and gene expression by alpha-tocopheryl phosphates: relevance to atherosclerosis and inflammation. *Ann N Y Acad Sci.* 2004;1031:405-411.

104. Ozaki H, Miyashita Y, Watanabe H, Shirai K. Enhancement of MMP-9 activity in THP-1 cells by 7-ketocholesterol and its suppression by the HMG-CoA reductase inhibitor fluvastatin. *J Atheroscler Thromb*. 2005;12:308-314.
105. Kavanagh IC, Symes CE, Renaudin P, Nova E, Mesa MD, Boukouvalas G, Leake DS, Yaqoob P. Degree of oxidation of low density lipoprotein affects expression of CD36 and PPARgamma, but not cytokine production, by human monocyte-macrophages. *Atherosclerosis*. 2003;168:271-282.
106. Takaku M, Wada Y, Jinnouchi K, Takeya M, Takahashi K, Usuda H, Naito M, Kurihara H, Yazaki Y, Kumazawa Y, Okimoto Y, Umetani M, Noguchi N, Niki E, Hamakubo T, Kodama T. An in vitro coculture model of transmigrant monocytes and foam cell formation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2330-2339.
107. Axel DI, Brehm BR, Wolburg-Buchholz K, Betz EL, Koveker G, Karsch KR. Induction of cell-rich and lipid-rich plaques in a transfilter coculture system with human vascular cells. *J Vasc Res*. 1996;33:327-339.
108. Dedhar S, Hannigan GE. Integrin cytoplasmic interactions and bidirectional transmembrane signalling. *Curr Opin Cell Biol*. 1996;8:657-669.
109. Lafrenie RM, Yamada KM. Integrin-dependent signal transduction. *J Cell Biochem*. 1996;61:543-553.
110. Gullberg D, Ekblom P. Extracellular matrix and its receptors during development. *Int J Dev Biol*. 1995;39:845-854.
111. Roskelley CD, Bissell MJ. Dynamic reciprocity revisited: a continuous, bidirectional flow of information between cells and the extracellular matrix regulates mammary epithelial cell function. *Biochem Cell Biol*. 1995;73:391-397.
112. Ruoslahti E, Yamaguchi Y. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. *Cell*. 1991;64:867-869.
113. Lochter A, Bissell MJ. Involvement of extracellular matrix constituents in breast cancer. *Semin Cancer Biol*. 1995;6:165-173.
114. Ingber DE, Folkman J. How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? *Cell*. 1989;58:803-805.
115. Bonfil RD, Vinyals A, Bustuoabad OD, Llorens A, Benavides FJ, Gonzalez-Garrigues M, Fabra A. Stimulation of angiogenesis as an explanation of Matrigel-enhanced tumorigenicity. *Int J Cancer*. 1994;58:233-239.
116. Taipale J, Miyazono K, Heldin CH, Keski-Oja J. Latent transforming growth factor-beta 1 associates to fibroblast extracellular matrix via latent TGF-beta binding protein. *J Cell Biol*. 1994;124:171-181.
117. Kadler KE, Baldock C, Bella J, Boot-Handford RP. Collagens at a glance. *J Cell Sci*. 2007;120:1955-1958.
118. van der Rest M, Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J*. 1991;5:2814-2823.
119. Hulmes DJ. The collagen superfamily--diverse structures and assemblies. *Essays Biochem*. 1992;27:49-67.
120. Mayne R, Brewton RG. New members of the collagen superfamily. *Curr Opin Cell Biol*. 1993;5:883-890.

121. Olsen BR, Winterhalter KH, Gordon MK. FACIT collagens and their biological roles. *Trends Glycos. Glycotech.* 1995;7:115-127.
122. Koch M, Foley JE, Hahn R, Zhou P, Burgeson RE, Gerecke DR, Gordon MK. alpha 1(Xx) collagen, a new member of the collagen subfamily, fibril-associated collagens with interrupted triple helices. *J Biol Chem.* 2001;276:23120-23126.
123. Burgeson RE. Type VII collagen, anchoring fibrils, and epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol.* 1993;101:252-255.
124. Timpl R, Chu ML. Microfibrillar collagen type VI. In: Yurchenco PD, Birk DE, Mecham RP, eds. *In Extracellular Matrix Assembly and Structure.* San Diego: Academic Press; 1994.
125. Sato K, Yomogida K, Wada T, Yorihuri T, Nishimune Y, Hosokawa N, Nagata K. Type XXVI collagen, a new member of the collagen family, is specifically expressed in the testis and ovary. *J Biol Chem.* 2002;277:37678-37684.
126. Veit G, Kobbe B, Keene DR, Paulsson M, Koch M, Wagener R. Collagen XXVIII, a novel von Willebrand factor A domain-containing protein with many imperfections in the collagenous domain. *J Biol Chem.* 2006;281:3494-3504.
127. Li K, Tamai K, Tan EM, and Uitto J. Cloning of type XVII collagen. Complementary and genomic DNA sequences of mouse 180-kilodalton bullous pemphigoid antigen (BPAG2) predict an interrupted collagenous domain, a transmembrane segment, and unusual features in the 5'-end of the gene and the 3'-untranslated region of the mRNA. *J. Biol. Chem.* 1996;268:8825-8834.
128. Banyard J, Bao L, Zetter BR. Type XXIII collagen, a new transmembrane collagen identified in metastatic tumor cells. *J Biol Chem.* 2003;278:20989-20994.
129. Rehn M, Pihlajaniemi T. Alpha 1(XVIII), a collagen chain with frequent interruptions in the collagenous sequence, a distinct tissue distribution, and homology with type XV collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91:4234-4238.
130. Brodsky B, Ramshaw JA. The collagen triple-helix structure. *Matrix Biol.* 1997;15:545-554.
131. Kivirikko KI, Pihlajaniemi T. Collagen hydroxylases and the protein disulfide isomerase subunit of prolyl 4-hydroxylases. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.* 1998;72:325-398.
132. Kessler E, Takahara K, Biniaminov L, Brusel M, Greenspan DS. Bone morphogenetic protein-1: the type I procollagen C-proteinase. *Science.* 1996;271:360-362.
133. Colige A, Li SW, Sieron AL, Nusgens BV, Prockop DJ, Lapiere CM. cDNA cloning and expression of bovine procollagen I N-proteinase: a new member of the superfamily of zinc-metalloproteinases with binding sites for cells and other matrix components. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:2374-2379.
134. Yurchenco PD, Schittny JC. Molecular architecture of basement membranes. *Faseb J.* 1990;4:1577-1590.
135. Thyberg J, Blomgren K, Roy J, Tran PK, Hedin U. Phenotypic modulation of smooth muscle cells after arterial injury is associated with changes in the distribution of laminin and fibronectin. *J Histochem Cytochem.* 1997;45:837-846.

136. Amento EP, Ehsani N, Palmer H, Libby P. Cytokines and growth factors positively and negatively regulate interstitial collagen gene expression in human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:1223-1230.
137. Thie M, Harrach B, Schonherr E, Kresse H, Robenek H, Rauterberg J. Responsiveness of aortic smooth muscle cells to soluble growth mediators is influenced by cell-matrix contact. *Arterioscler Thromb.* 1993;13:994-1004.
138. Lawrence R, Hartmann DJ, Sonenshein GE. Transforming growth factor beta 1 stimulates type V collagen expression in bovine vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1994;269:9603-9609.
139. Rizvi MA, Katwa L, Spadone DP, Myers PR. The effects of endothelin-1 on collagen type I and type III synthesis in cultured porcine coronary artery vascular smooth muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 1996;28:243-252.
140. Kato H, Suzuki H, Tajima S, Ogata Y, Tominaga T, Sato A, Saruta T. Angiotensin II stimulates collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *J Hypertens.* 1991;9:17-22.
141. Jimi S, Saku K, Uesugi N, Sakata N, Takebayashi S. Oxidized low density lipoprotein stimulates collagen production in cultured arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 1995;116:15-26.
142. Orekhov AN, Tertov VV, Kudryashov SA, Smirnov VN. Triggerlike stimulation of cholesterol accumulation and DNA and extracellular matrix synthesis induced by atherogenic serum or low density lipoprotein in cultured cells. *Circ Res.* 1990;66:311-320.
143. Tan EM, Glassberg E, Olsen DR, Noveral JP, Unger GA, Peltonen J, Chu ML, Levine E, Sollberg S. Extracellular matrix gene expression by human endothelial and smooth muscle cells. *Matrix.* 1991;11:380-387.
144. Vernon RB, Sage EH. Between molecules and morphology. Extracellular matrix and creation of vascular form. *Am J Pathol.* 1995;147:873-883.
145. Lohler J, Timpl R, Jaenisch R. Embryonic lethal mutation in mouse collagen I gene causes rupture of blood vessels and is associated with erythropoietic and mesenchymal cell death. *Cell.* 1984;38:597-607.
146. Seyama Y, Wachi H. Atherosclerosis and matrix dystrophy. *J Atheroscler Thromb.* 2004;11:236-245.
147. Libby P, Schoenbeck U, Mach F, Selwyn AP, Ganz P. Current concepts in cardiovascular pathology: the role of LDL cholesterol in plaque rupture and stabilization. *Am J Med.* 1998;104:14S-18S.
148. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med.* 1998;338:1042-1050.
149. Majors A, Ehrhart LA, Pezacka EH. Homocysteine as a risk factor for vascular disease. Enhanced collagen production and accumulation by smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:2074-2081.

-
150. Jimi S, Sakata N, Matunaga A, Takebayashi S. Low density lipoproteins bind more to type I and III collagens by negative charge-dependent mechanisms than to type IV and V collagens. *Atherosclerosis*. 1994;107:109-116.
 151. Ross R. Atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1984;6 Suppl 4:S714-719.
 152. Ooshima A. Collagen alpha B chain: increased proportion in human atherosclerosis. *Science*. 1981;213:666-668.
 153. Plenz G, Dorszewski A, Volker W, Ko YS, Severs NJ, Breithardt G, Robenek H. Cholesterol-induced changes of type VIII collagen expression and distribution in carotid arteries of rabbit. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999;19:2395-2404.
 154. Hou G, Mulholland D, Gronska MA, Bendeck MP. Type VIII collagen stimulates smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase synthesis after arterial injury. *Am J Pathol*. 2000;156:467-476.
 155. Barnes MJ, Knight CG, Farndale RW. The collagen-platelet interaction. *Curr Opin Hematol*. 1998;5:314-320.
 156. Rekhter MD, O'Brien E, Shah N, Schwartz SM, Simpson JB, Gordon D. The importance of thrombus organization and stellate cell phenotype in collagen I gene expression in human, coronary atherosclerotic and restenotic lesions. *Cardiovasc Res*. 1996;32:496-502.
 157. Rekhter MD, Hicks GW, Brammer DW, Work CW, Kim JS, Gordon D, Keiser JA, Ryan MJ. Animal model that mimics atherosclerotic plaque rupture. *Circ Res*. 1998;83:705-713.
 158. Mecham RP, Davis EC. Elastic fiber structure and assembly. In: Yurchenco PD, Birk DE, Mecham RP, eds. *Extracellular Matrix Assembly and Structure*. San Diego: Academic Press; 1994.
 159. Downing AK, Knott V, Werner JM, Cardy CM, Campbell ID, Handford PA. Solution structure of a pair of calcium-binding epidermal growth factor-like domains: implications for the Marfan syndrome and other genetic disorders. *Cell*. 1996;85:597-605.
 160. Rosenbloom J, Abrams WR, Mecham R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *Faseb J*. 1993;7:1208-1218.
 161. Nakashima Y, Sueishi K. Alteration of elastic architecture in the lathyrotic rat aorta implies the pathogenesis of aortic dissecting aneurysm. *Am J Pathol*. 1992;140:959-969.
 162. Li DY, Brooke B, Davis EC, Mecham RP, Sorensen LK, Boak BB, Eichwald E, Keating MT. Elastin is an essential determinant of arterial morphogenesis. *Nature*. 1998;393:276-280.
 163. Karnik SK, Brooke BS, Bayes-Genis A, Sorensen L, Wythe JD, Schwartz RS, Keating MT, Li DY. A critical role for elastin signaling in vascular morphogenesis and disease. *Development*. 2003;130:411-423.
 164. Hayashi A, Suzuki T, Tajima S. Modulations of elastin expression and cell proliferation by retinoids in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biochem*. 1995;117:132-136.

-
165. Wachi H, Seyama Y, Tajima S. Modulation of elastin expression by heparin is dependent on the growth condition of vascular smooth muscle cells: up-regulation of elastin expression by heparin in the proliferating cells is mediated by the inhibition of protein kinase C activity. *J Biochem.* 1995;118:582-586.
 166. Tokimitsu I, Takehana M, Hori H, Nagai Y, Tajima S. Identification of nondisulfided pro alpha 1 (IV) chain produced by cultured B16 melanoma cells. *J Biochem.* 1994;116:1039-1043.
 167. Tokimitsu I, Kato H, Wachi H, Tajima S. Elastin synthesis is inhibited by angiotensin II but not by platelet-derived growth factor in arterial smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta.* 1994;1207:68-73.
 168. Tokimitsu I, Tajima S. Inhibition of elastin synthesis by high potassium salt is mediated by Ca²⁺ influx in cultured smooth muscle cells in vitro: reciprocal effects of K⁺ on elastin and collagen synthesis. *J Biochem.* 1994;115:536-539.
 169. Krams DM, Franzblau C, Hollander W. The protein and lipid composition of arterial elastin and its relationship to lipid accumulation in the atherosclerotic plaque. *J Clin Invest.* 1971;50:1666-1677.
 170. Noma A, Takahashi T, Yamada K, Wada T. Elastin-lipid interaction action in the arterial wall. Part 1. Extraction of elastin from human aortic intima. *Atherosclerosis.* 1979;33:29-39.
 171. Noma A, Takahashi T, Wada T. Elastin-lipid interaction in the arterial wall. Part 2. In vitro binding of lipoprotein-lipids to arterial elastin and the inhibitory effect of high density lipoproteins on the process. *Atherosclerosis.* 1981;38:373-382.
 172. Seyama Y, Hayashi M, Usami E, Tsuchida H, Tokudome S, Yamashita S. Basic study on nondelipidemic fractionation of aortic connective tissue of human and experimental atherosclerosis. *J Clin Chem.* 1990;19:53-61.
 173. Grande J, Davis HR, Bates S, Mathews MB, Glagov S. Effect of an elastin growth substrate on cholesteryl ester synthesis and foam cell formation by cultured aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 1987;68:87-93.
 174. Aota S, Nagai T, Olden K, Akiyama SK, Yamada KM. Fibronectin and integrins in cell adhesion and migration. *Biochem Soc Trans.* 1991;19:830-835.
 175. Akiyama SK, Olden K, Yamada KM. Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 1995;14:173-189.
 176. Hynes RO. Fibronectins. New York: Springer-Verlag; 1990.
 177. Skorstengaard K, Jensen MS, Sahl P, Petersen TE, Magnusson S. Complete primary structure of bovine plasma fibronectin. *Eur J Biochem.* 1986;161:441-453.
 178. Hershberger RP, Culp LA. Cell-type-specific expression of alternatively spliced human fibronectin IIIc mRNAs. *Mol Cell Biol.* 1990;10:662-671.
 179. Yamada KM, Kennedy DW. Dualistic nature of adhesive protein function: fibronectin and its biologically active peptide fragments can autoinhibit fibronectin function. *J Cell Biol.* 1984;99:29-36.
 180. Pierschbacher MD, Ruoslahti E. Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature.* 1984;309:30-33.

-
181. Aota S, Nomizu M, Yamada KM. The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J Biol Chem.* 1994;269:24756-24761.
 182. Ekblom P, Timpl R. Cell-to-cell contact and extracellular matrix. A multifaceted approach emerging. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8:599-601.
 183. Paulsson M. The role of laminin in attachment, growth, and differentiation of cultured cells: a brief review. *Cytotechnology.* 1992;9:99-106.
 184. Boudreau N, Myers C, Bissell MJ. From laminin to lamin: regulation of tissue-specific gene expression by the ECM. *Trends Cell Biol.* 1995;5:1-4.
 185. Malinda KM, Kleinman HK. The laminins. *Int J Biochem Cell Biol.* 1996;28:957-959.
 186. Beck K, Hunter I, Engel J. Structure and function of laminin: anatomy of a multidomain glycoprotein. *FASEB J.* 1990;4:148-160.
 187. Maurer P, Hohenester E, Engel J. Extracellular calcium-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8:609-617.
 188. Timpl R. Macromolecular organization of basement membranes. *Curr Opin Cell Biol.* 1996;8:618-624.
 189. Mayer U, Timpl R. Nidogen: A versatile binding protein of basement membranes. In: Yurchenco PD, Birk DE, Mecham RP, eds. *Extracellular Matrix Assembly and Structure.* San Diego: Academic Press; 1994.
 190. Mecham RP, Hinek A. Non-integrin laminin receptors. In: Ekblom P, R. Timpl, eds. *The Laminins.* New York: Harwood Academic Publishers; 1996.
 191. Aumailley M, Krieg T. Laminins: a family of diverse multifunctional molecules of basement membranes. *J Invest Dermatol.* 1996;106:209-214.
 192. Engvall E, Earwicker D, Haaparanta T, Ruoslahti E, Sanes JR. Distribution and isolation of four laminin variants; tissue restricted distribution of heterotrimers assembled from five different subunits. *Cell Regul.* 1990;1:731-740.
 193. Porter BE, Sanes JR. Gated migration: neurons migrate on but not onto substrates containing S-laminin. *Dev Biol.* 1995;167:609-616.
 194. Ruoslahti E. Fibronectin and its receptors. *Annu Rev Biochem.* 1988;57:375-413.
 195. Timpl R, Brown JC. The laminins. *Matrix Biol.* 1994;14:275-281.
 196. Wachi H, Seyama Y, Yamashita S, Tajima S. Cell cycle-dependent regulation of elastin gene in cultured chick vascular smooth-muscle cells. *Biochem J.* 1995;309 (Pt 2):575-579.
 197. Morla AO, Mogford JE. Control of smooth muscle cell proliferation and phenotype by integrin signaling through focal adhesion kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000;272:298-302.
 198. Beppu M, Hora M, Watanabe M, Kikugawa K. Binding and uptake of oxidized low density lipoprotein (LDL) by macrophage scavenger receptors are enhanced by substrate-bound fibronectin. *Biol Pharm Bull.* 1995;18:802-809.
 199. Kakolyris S, Karakitsos P, Tzardi M, Agapitos E. Immunohistochemical detection of fibronectin in early and advanced atherosclerosis. *In Vivo.* 1995;9:35-40.

-
200. Smith EB, Ashall C. Fibronectin distribution in human aortic intima and atherosclerotic lesions: concentration of soluble and collagenase-releasable fractions. *Biochim Biophys Acta*. 1986;880:10-15.
 201. Stenman S, von Smitten K, Vaheri A. Fibronectin and atherosclerosis. *Acta Med Scand Suppl*. 1980;642:165-170.
 202. Kilic T, Sohrabifar M, Kurtkaya O, Yildirim O, Elmaci I, Gunel M, Pamir MN. Expression of structural proteins and angiogenic factors in normal arterial and unruptured and ruptured aneurysm walls. *Neurosurgery*. 2005;57:997-1007; discussion 1997-1007.
 203. Burke JM, Balian G, Ross R, Bornstein P. Synthesis of types I and III procollagen and collagen by monkey aortic smooth muscle cells in vitro. *Biochemistry*. 1977;16:3243-3249.
 204. Bornstein P. Diversity of function is inherent in matricellular proteins: an appraisal of thrombospondin 1. *J Cell Biol*. 1995;130:503-506.
 205. Sage EH, Bornstein P. Extracellular proteins that modulate cell-matrix interactions. SPARC, tenascin, and thrombospondin. *J Biol Chem*. 1991;266:14831-14834.
 206. Erickson HP. Tenascin-C, tenascin-R and tenascin-X: a family of talented proteins in search of functions. *Curr Opin Cell Biol*. 1993;5:869-876.
 207. Strom A, Olin AI, Aspberg A, Hultgardh-Nilsson A. Fibulin-2 is present in murine vascular lesions and is important for smooth muscle cell migration. *Cardiovasc Res*. 2006;69:755-763.
 208. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med*. 2003;9:685-693.
 209. Patel MK, Lymn JS, Clunn GF, Hughes AD. Thrombospondin-1 is a potent mitogen and chemoattractant for human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:2107-2114.
 210. Okamoto M, Ono M, Uchiumi T, Ueno H, Kohno K, Sugimachi K, Kuwano M. Up-regulation of thrombospondin-1 gene by epidermal growth factor and transforming growth factor beta in human cancer cells--transcriptional activation and messenger RNA stabilization. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1574:24-34.
 211. Roth JJ, Gahtan V, Brown JL, Gerhard C, Swami VK, Rothman VL, Tulenko TN, Tuszynski GP. Thrombospondin-1 is elevated with both intimal hyperplasia and hypercholesterolemia. *J Surg Res*. 1998;74:11-16.
 212. McGillicuddy FC, O'Toole D, Hickey JA, Gallagher WM, Dawson KA, Keenan AK. TGF-beta1-induced thrombospondin-1 expression through the p38 MAPK pathway is abolished by fluvastatin in human coronary artery smooth muscle cells. *Vascul Pharmacol*. 2006;44:469-475.
 213. Hedin U, Holm J, Hansson GK. Induction of tenascin in rat arterial injury. Relationship to altered smooth muscle cell phenotype. *Am J Pathol*. 1991;139:649-656.
 214. Jones PL, Cowan KN, Rabinovitch M. Tenascin-C, proliferation and subendothelial fibronectin in progressive pulmonary vascular disease. *Am J Pathol*. 1997;150:1349-1360.

-
215. Jones PL, Rabinovitch M. Tenascin-C is induced with progressive pulmonary vascular disease in rats and is functionally related to increased smooth muscle cell proliferation. *Circ Res.* 1996;79:1131-1142.
 216. Fischer JW. Tenascin-C: a key molecule in graft stenosis. *Cardiovasc Res.* 2007;74:335-336.
 217. Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. *FASEB J.* 1992;6:861-870.
 218. Taipale J, Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.* 1997;11:51-59.
 219. Yayon A, Klagsbrun M, Esko JD, Leder P, Ornitz DM. Cell surface, heparin-like molecules are required for binding of basic fibroblast growth factor to its high affinity receptor. *Cell.* 1991;64:841-848.
 220. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature.* 1990;346:281-284.
 221. Wight TN, Potter-Perigo S, Aulinskas T. Proteoglycans and vascular cell proliferation. *Am Rev Respir Dis.* 1989;140:1132-1135.
 222. Galis ZS, Alavi MZ, Moore S. In situ ultrastructural characterization of chondroitin sulfate proteoglycans in normal rabbit aorta. *J Histochem Cytochem.* 1992;40:251-263.
 223. Yao LY, Moody C, Schonherr E, Wight TN, Sandell LJ. Identification of the proteoglycan versican in aorta and smooth muscle cells by DNA sequence analysis, in situ hybridization and immunohistochemistry. *Matrix Biol.* 1994;14:213-225.
 224. Bashkin P, Doctrow S, Klagsbrun M, Svahn CM, Folkman J, Vlodavsky I. Basic fibroblast growth factor binds to subendothelial extracellular matrix and is released by heparitinase and heparin-like molecules. *Biochemistry.* 1989;28:1737-1743.
 225. Hayashi K, Madri JA, Yurchenco PD. Endothelial cells interact with the core protein of basement membrane perlecan through beta 1 and beta 3 integrins: an adhesion modulated by glycosaminoglycan. *J Cell Biol.* 1992;119:945-959.
 226. Stary HC. The sequence of cell and matrix changes in atherosclerotic lesions of coronary arteries in the first forty years of life. *Eur Heart J.* 1990;11 Suppl E:3-19.
 227. Merrilees MJ, Beaumont B. Structural heterogeneity of the diffuse intimal thickening and correlation with distribution of TGF-beta 1. *J Vasc Res.* 1993;30:293-302.
 228. Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose EJ. Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu Rev Cell Biol.* 1992;8:365-393.
 229. Cizmeci-Smith G, Asundi V, Stahl RC, Teichman LJ, Chernousov M, Cowan K, Carey DJ. Regulated expression of syndecan in vascular smooth muscle cells and cloning of rat syndecan core protein cDNA. *J Biol Chem.* 1992;267:15729-15736.
 230. Mertens G, Cassiman JJ, Van den Berghe H, Vermeylen J, David G. Cell surface heparan sulfate proteoglycans from human vascular endothelial cells. Core protein

- characterization and antithrombin III binding properties. *J Biol Chem.* 1992;267:20435-20443.
231. Camejo G, Fager G, Rosengren B, Hurt-Camejo E, Bondjers G. Binding of low density lipoproteins by proteoglycans synthesized by proliferating and quiescent human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1993;268:14131-14137.
232. Fager G, Camejo G, Olsson U, Ostergren-Lunden G, Lustig F, Bondjers G. Binding of platelet-derived growth factor and low density lipoproteins to glycosaminoglycan species produced by human arterial smooth muscle cells. *J Cell Physiol.* 1995;163:380-392.
233. Tao Z, Smart FW, Figueroa JE, Glancy DL, Vijayagopal P. Elevated expression of proteoglycans in proliferating vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 1997;135:171-179.
234. Chen JK, Hoshi H, McKeenan WL. Stimulation of human arterial smooth muscle cell chondroitin sulfate proteoglycan synthesis by transforming growth factor-beta. *In Vitro Cell Dev Biol.* 1991;27:6-12.
235. Schonherr E, Jarvelainen HT, Sandell LJ, Wight TN. Effects of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 on the synthesis of a large versican-like chondroitin sulfate proteoglycan by arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 1991;266:17640-17647.
236. Edwards IJ, Xu H, Wright MJ, Wagner WD. Interleukin-1 upregulates decorin production by arterial smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb.* 1994;14:1032-1039.
237. Kahari VM, Larjava H, Uitto J. Differential regulation of extracellular matrix proteoglycan (PG) gene expression. Transforming growth factor-beta 1 up-regulates biglycan (PGI), and versican (large fibroblast PG) but down-regulates decorin (PGII) mRNA levels in human fibroblasts in culture. *J Biol Chem.* 1991;266:10608-10615.
238. Schonherr E, Beavan LA, Hausser H, Kresse H, Culp LA. Differences in decorin expression by papillary and reticular fibroblasts in vivo and in vitro. *Biochem J.* 1993;290 (Pt 3):893-899.
239. Evanko SP, Angello JC, Wight TN. Formation of hyaluronan- and versican-rich pericellular matrix is required for proliferation and migration of vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1004-1013.
240. Evanko SP, Johnson PY, Braun KR, Underhill CB, Dudhia J, Wight TN. Platelet-derived growth factor stimulates the formation of versican-hyaluronan aggregates and pericellular matrix expansion in arterial smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys.* 2001;394:29-38.
241. Kinsella MG, Tsoi CK, Jarvelainen HT, Wight TN. Selective expression and processing of biglycan during migration of bovine aortic endothelial cells. The role of endogenous basic fibroblast growth factor. *J Biol Chem.* 1997;272:318-325.
242. Edwards IJ, Xu H, Obunike JC, Goldberg IJ, Wagner WD. Differentiated macrophages synthesize a heparan sulfate proteoglycan and an oversulfated

- chondroitin sulfate proteoglycan that bind lipoprotein lipase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:400-409.
243. Nikkari ST, Jarvelainen HT, Wight TN, Ferguson M, Clowes AW. Smooth muscle cell expression of extracellular matrix genes after arterial injury. *Am J Pathol.* 1994;144:1348-1356.
244. Radhakrishnamurthy B, Tracy RE, Dalferes ER, Jr., Berenson GS. Proteoglycans in human coronary arteriosclerotic lesions. *Exp Mol Pathol.* 1998;65:1-8.
245. Evanko SP, Raines EW, Ross R, Gold LI, Wight TN. Proteoglycan distribution in lesions of atherosclerosis depends on lesion severity, structural characteristics, and the proximity of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta. *Am J Pathol.* 1998;152:533-546.
246. Wight TN, Lara S, Riessen R, Le Baron R, Isner J. Selective deposits of versican in the extracellular matrix of restenotic lesions from human peripheral arteries. *Am J Pathol.* 1997;151:963-973.
247. Riessen R, Isner JM, Blessing E, Loushin C, Nikol S, Wight TN. Regional differences in the distribution of the proteoglycans biglycan and decorin in the extracellular matrix of atherosclerotic and restenotic human coronary arteries. *Am J Pathol.* 1994;144:962-974.
248. Kinsella MG, Tran PK, Weiser-Evans MC, Reidy M, Majack RA, Wight TN. Changes in perlecan expression during vascular injury: role in the inhibition of smooth muscle cell proliferation in the late lesion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:608-614.
249. Cizmeci-Smith G, Langan E, Youkey J, Showalter LJ, Carey DJ. Syndecan-4 is a primary-response gene induced by basic fibroblast growth factor and arterial injury in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:172-180.
250. Chait A, Wight TN. Interaction of native and modified low-density lipoproteins with extracellular matrix. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11:457-463.
251. Boren J, Gustafsson M, Skalen K, Flood C, Innerarity TL. Role of extracellular retention of low density lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 2000;11:451-456.
252. O'Brien KD, Olin KL, Alpers CE, Chiu W, Ferguson M, Hudkins K, Wight TN, Chait A. Comparison of apolipoprotein and proteoglycan deposits in human coronary atherosclerotic plaques: colocalization of biglycan with apolipoproteins. *Circulation.* 1998;98:519-527.
253. Chang MY, Potter-Perigo S, Tsoi C, Chait A, Wight TN. Oxidized low density lipoproteins regulate synthesis of monkey aortic smooth muscle cell proteoglycans that have enhanced native low density lipoprotein binding properties. *J Biol Chem.* 2000;275:4766-4773.
254. Buton X, Mamdouh Z, Ghosh R, Du H, Kuriakose G, Beatini N, Grabowski GA, Maxfield FR, Tabas I. Unique cellular events occurring during the initial interaction of macrophages with matrix-retained or methylated aggregated low density lipoprotein (LDL). Prolonged cell-surface contact during which ldl-cholesteryl ester hydrolysis exceeds ldl protein degradation. *J Biol Chem.* 1999;274:32112-32121.

-
255. Ismail NA, Alavi MZ, Moore S. Lipoprotein-proteoglycan complexes from injured rabbit aortas accelerate lipoprotein uptake by arterial smooth muscle cells. *Atherosclerosis*. 1994;105:79-87.
 256. Marcum JA, Rosenberg RD. Anticoagulant active heparan sulfate proteoglycan and the vascular endothelium. *Semin Thromb Hemost*. 1987;13:464-474.
 257. Cadroy Y, Hanson SR, Harker LA. Dermatan sulfate inhibition of fibrin-rich thrombus formation in nonhuman primates. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:1213-1217.
 258. Bingley JA, Hayward IP, Campbell JH, Campbell GR. Arterial heparan sulfate proteoglycans inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and phenotype change in vitro and neointimal formation in vivo. *J Vasc Surg*. 1998;28:308-318.
 259. Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring--the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J*. 1985;53:363-373.
 260. Matrisian LM. The matrix-degrading metalloproteinases. *Bioessays*. 1992;14:455-463.
 261. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest*. 1994;94:2493-2503.
 262. Suzuki M, Raab G, Moses MA, Fernandez CA, Klagsbrun M. Matrix metalloproteinase-3 releases active heparin-binding EGF-like growth factor by cleavage at a specific juxtamembrane site. *J Biol Chem*. 1997;272:31730-31737.
 263. Preece G, Murphy G, Ager A. Metalloproteinase-mediated regulation of L-selectin levels on leucocytes. *J Biol Chem*. 1996;271:11634-11640.
 264. Kayagaki N, Kawasaki A, Ebata T, Ohmoto H, Ikeda S, Inoue S, Yoshino K, Okumura K, Yagita H. Metalloproteinase-mediated release of human Fas ligand. *J Exp Med*. 1995;182:1777-1783.
 265. Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. 1997;385:729-733.
 266. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol*. 2000;18:1135-1149.
 267. Okada Y, Nakanishi I. Activation of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) and matrix metalloproteinase 2 ('gelatinase') by human neutrophil elastase and cathepsin G. *FEBS Lett*. 1989;249:353-356.
 268. Nagase H, Enghild JJ, Suzuki K, Salvesen G. Stepwise activation mechanisms of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl)mercuric acetate. *Biochemistry*. 1990;29:5783-5789.
 269. Koklitis PA, Murphy G, Sutton C, Angal S. Purification of recombinant human prostromelysin. Studies on heat activation to give high-Mr and low-Mr active

- forms, and a comparison of recombinant with natural stromelysin activities. *Biochem J.* 1991;276 (Pt 1):217-221.
270. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem.* 1997;378:151-160.
271. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:5578-5582.
272. Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knauper V, Atkinson S, Gavrilovic J. Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS.* 1999;107:38-44.
273. Woessner JF, Jr. Role of matrix proteases in processing enamel proteins. *Connect Tissue Res.* 1998;39:69-73; discussion 141-149.
274. Madri JA, Graesser D, Haas T. The roles of adhesion molecules and proteinases in lymphocyte transendothelial migration. *Biochem Cell Biol.* 1996;74:749-757.
275. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Jr., Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1995;92:1355-1374.
276. Wesley RB, 2nd, Meng X, Godin D, Galis ZS. Extracellular matrix modulates macrophage functions characteristic to atheroma: collagen type I enhances acquisition of resident macrophage traits by human peripheral blood monocytes in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998;18:432-440.
277. Gudewicz PW, Frewin MB, Heinel LA, Minnear FL. Priming of human monocyte superoxide production and arachidonic acid metabolism by adherence to collagen- and basement membrane-coated surfaces. *J Leukoc Biol.* 1994;55:423-429.
278. Fabunmi RP, Baker AH, Murray EJ, Booth RF, Newby AC. Divergent regulation by growth factors and cytokines of 95 kDa and 72 kDa gelatinases and tissue inhibitors or metalloproteinases-1, -2, and -3 in rabbit aortic smooth muscle cells. *Biochem J.* 1996;315 (Pt 1):335-342.
279. Pauly RR, Passaniti A, Bilato C, Monticone R, Cheng L, Papadopoulos N, Gluzband YA, Smith L, Weinstein C, Lakatta EG, et al. Migration of cultured vascular smooth muscle cells through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation. *Circ Res.* 1994;75:41-54.
280. Galis ZS, Muszynski M, Sukhova GK, Simon-Morrissey E, Unemori EN, Lark MW, Amento E, Libby P. Cytokine-stimulated human vascular smooth muscle cells synthesize a complement of enzymes required for extracellular matrix digestion. *Circ Res.* 1994;75:181-189.
281. Aoyagi M, Yamamoto M, Azuma H, Nagashima G, Niimi Y, Tamaki M, Hirakawa K, Yamamoto K. Immunolocalization of matrix metalloproteinases in rabbit carotid arteries after balloon denudation. *Histochem Cell Biol.* 1998;109:97-102.

-
282. Reidy MA, Irvin C, Lindner V. Migration of arterial wall cells. Expression of plasminogen activators and inhibitors in injured rat arteries. *Circ Res.* 1996;78:405-414.
283. Webb KE, Henney AM, Anglin S, Humphries SE, McEwan JR. Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitor TIMP-1 in the rat carotid artery after balloon injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1837-1844.
284. Hasenstab D, Forough R, Clowes AW. Plasminogen activator inhibitor type 1 and tissue inhibitor of metalloproteinases-2 increase after arterial injury in rats. *Circ Res.* 1997;80:490-496.
285. Jenkins GM, Crow MT, Bilato C, Gluzband Y, Ryu WS, Li Z, Stetler-Stevenson W, Nater C, Froehlich JP, Lakatta EG, Cheng L. Increased expression of membrane-type matrix metalloproteinase and preferential localization of matrix metalloproteinase-2 to the neointima of balloon-injured rat carotid arteries. *Circulation.* 1998;97:82-90.
286. Galis ZS, Kranzhofer R, Fenton JW, 2nd, Libby P. Thrombin promotes activation of matrix metalloproteinase-2 produced by cultured vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:483-489.
287. Forough R, Koyama N, Hasenstab D, Lea H, Clowes M, Nikkari ST, Clowes AW. Overexpression of tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 inhibits vascular smooth muscle cell functions in vitro and in vivo. *Circ Res.* 1996;79:812-820.
288. Kenagy RD, Hart CE, Stetler-Stevenson WG, Clowes AW. Primate smooth muscle cell migration from aortic explants is mediated by endogenous platelet-derived growth factor and basic fibroblast growth factor acting through matrix metalloproteinases 2 and 9. *Circulation.* 1997;96:3555-3560.
289. Hong BK, Kwon HM, Lee BK, Kim D, Kim IJ, Kang SM, Jang Y, Cho SH, Kim HK, Jang BC, Cho SY, Kim HS, Kim MS, Kwon HC, Lee N. Coexpression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinases in human aortic atherosclerotic lesions. *Yonsei Med J.* 2000;41:82-88.
290. Smith JR, Osborne TF, Goldstein JL, Brown MS. Identification of nucleotides responsible for enhancer activity of sterol regulatory element in low density lipoprotein receptor gene. *J Biol Chem.* 1990;265:2306-2310.
291. Colicelli J. Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE.* 2004;2004:RE13.
292. Bucci C, Thomsen P, Nicoziani P, McCarthy J, van Deurs B. Rab7: a key to lysosome biogenesis. *Mol Biol Cell.* 2000;11:467-480.
293. Kinbara K, Goldfinger LE, Hansen M, Chou FL, Ginsberg MH. Ras GTPases: integrins' friends or foes? *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:767-776.
294. Ridley AJ, Schwartz MA, Burridge K, Firtel RA, Ginsberg MH, Borisy G, Parsons JT, Horwitz AR. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science.* 2003;302:1704-1709.
295. Mitin N, Rossman KL, Der CJ. Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol.* 2005;15:R563-574.

-
296. Malliri A, Collard JG. Role of Rho-family proteins in cell adhesion and cancer. *Curr Opin Cell Biol.* 2003;15:583-589.
 297. Newey SE, Velamoor V, Govek EE, Van Aelst L. Rho GTPases, dendritic structure, and mental retardation. *J Neurobiol.* 2005;64:58-74.
 298. Cernuda-Morollon E, Ridley AJ. Rho GTPases and leukocyte adhesion receptor expression and function in endothelial cells. *Circ Res.* 2006;98:757-767.
 299. Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature.* 2002;420:629-635.
 300. Barbacid M. ras genes. *Annu Rev Biochem.* 1987;56:779-827.
 301. Rossman KL, Der CJ, Sondek J. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005;6:167-180.
 302. Olofsson B. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal.* 1999;11:545-554.
 303. Santos E, Nebreda AR, Bryan T, Kempner ES. Oligomeric structure of p21 ras proteins as determined by radiation inactivation. *J Biol Chem.* 1988;263:9853-9858.
 304. Hancock JF, Paterson H, Marshall CJ. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell.* 1990;63:133-139.
 305. Casey PJ. Mechanisms of protein prenylation and role in G protein function. *Biochem Soc Trans.* 1995;23:161-166.
 306. Hancock JF, Magee AI, Childs JE, Marshall CJ. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell.* 1989;57:1167-1177.
 307. Apolloni A, Prior IA, Lindsay M, Parton RG, Hancock JF. H-ras but not K-ras traffics to the plasma membrane through the exocytic pathway. *Mol Cell Biol.* 2000;20:2475-2487.
 308. Choy E, Chiu VK, Silletti J, Feoktistov M, Morimoto T, Michaelson D, Ivanov IE, Philips MR. Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell.* 1999;98:69-80.
 309. Magee T, Marshall C. New insights into the interaction of Ras with the plasma membrane. *Cell.* 1999;98:9-12.
 310. Thissen JA, Gross JM, Subramanian K, Meyer T, Casey PJ. Prenylation-dependent association of Ki-Ras with microtubules. Evidence for a role in subcellular trafficking. *J Biol Chem.* 1997;272:30362-30370.
 311. Prior IA, Harding A, Yan J, Sluimer J, Parton RG, Hancock JF. GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat Cell Biol.* 2001;3:368-375.
 312. Roy S, Luetterforst R, Harding A, Apolloni A, Etheridge M, Stang E, Rolls B, Hancock JF, Parton RG. Dominant-negative caveolin inhibits H-Ras function by disrupting cholesterol-rich plasma membrane domains. *Nat Cell Biol.* 1999;1:98-105.

-
313. Jaumot M, Yan J, Clyde-Smith J, Sluimer J, Hancock JF. The linker domain of the Ha-Ras hypervariable region regulates interactions with exchange factors, Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem.* 2002;277:272-278.
 314. Michaelson D, Ali W, Chiu VK, Bergo M, Silletti J, Wright L, Young SG, Philips M. Postprenylation CAAX processing is required for proper localization of Ras but not Rho GTPases. *Mol Biol Cell.* 2005;16:1606-1616.
 315. Wennerberg K, Der CJ. Rho-family GTPases: it's not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci.* 2004;117:1301-1312.
 316. Lowy DR, Willumsen BM. Function and regulation of ras. *Annu Rev Biochem.* 1993;62:851-891.
 317. Harvey JJ. An Unidentified Virus Which Causes the Rapid Production of Tumours in Mice. *Nature.* 1964;204:1104-1105.
 318. Kirsten WH, Mayer LA. Malignant lymphomas of extrathymic origin induced in rats by murine erythroblastosis virus. *J Natl Cancer Inst.* 1969;43:735-746.
 319. Santos E, Nebreda AR. Structural and functional properties of ras proteins. *FASEB J.* 1989;3:2151-2163.
 320. Ma J, Karplus M. Molecular switch in signal transduction: reaction paths of the conformational changes in ras p21. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:11905-11910.
 321. Malumbres M, Pellicer A. RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci.* 1998;3:d887-912.
 322. Hancock JF. Ras proteins: different signals from different locations. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:373-384.
 323. Wennerberg K, Rossman KL, Der CJ. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci.* 2005;118:843-846.
 324. Vojtek AB, Hollenberg SM, Cooper JA. Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf. *Cell.* 1993;74:205-214.
 325. Stokoe D, Macdonald SG, Cadwallader K, Symons M, Hancock JF. Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science.* 1994;264:1463-1467.
 326. Marshall CJ. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev.* 1994;4:82-89.
 327. Kapeller R, Cantley LC. Phosphatidylinositol 3-kinase. *Bioessays.* 1994;16:565-576.
 328. Rodriguez-Viciano P, Warne PH, Dhand R, Vanhaesebroeck B, Gout I, Fry MJ, Waterfield MD, Downward J. Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature.* 1994;370:527-532.
 329. Downward J. Ras signalling and apoptosis. *Curr Opin Genet Dev.* 1998;8:49-54.
 330. Vanhaesebroeck B, Waterfield MD. Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp Cell Res.* 1999;253:239-254.
 331. Coffey PJ, Jin J, Woodgett JR. Protein kinase B (c-Akt): a multifunctional mediator of phosphatidylinositol 3-kinase activation. *Biochem J.* 1998;335 (Pt 1):1-13.
 332. Galetic I, Andjelkovic M, Meier R, Brodbeck D, Park J, Hemmings BA. Mechanism of protein kinase B activation by insulin/insulin-like growth factor-1 revealed by

- specific inhibitors of phosphoinositide 3-kinase--significance for diabetes and cancer. *Pharmacol Ther.* 1999;82:409-425.
333. Kawai-Kowase K, Owens GK. Multiple repressor pathways contribute to phenotypic switching of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007;292:C59-69.
334. Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 1992;70:389-399.
335. Meadows KN, Bryant P, Pumiglia K. Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires Ras activation. *J Biol Chem.* 2001;276:49289-49298.
336. Rennel E, Cross MJ, Klint P, Bai X, Arbiser JL, Gerwins P. Regulation of endothelial cell differentiation and transformation by H-Ras. *Exp Cell Res.* 2003;291:189-200.
337. Stice LL, Vaziri C, Faller DV. Regulation of platelet-derived growth factor signaling by activated p21Ras. *Front Biosci.* 1999;4:D72-86.
338. Heldin CH. Structural and functional studies on platelet-derived growth factor. *EMBO J.* 1992;11:4251-4259.
339. Williams LT. Signal transduction by the platelet-derived growth factor receptor. *Science.* 1989;243:1564-1570.
340. Jin G, Chieh-Hsi Wu J, Li YS, Hu YL, Shyy JY, Chien S. Effects of active and negative mutants of Ras on rat arterial neointima formation. *J Surg Res.* 2000;94:124-132.
341. Miyamoto T, Fox JC. Autocrine signaling through Ras prevents apoptosis in vascular smooth muscle cells in vitro. *J Biol Chem.* 2000;275:2825-2830.
342. Indolfi C, Avvedimento EV, Rapacciuolo A, Di Lorenzo E, Esposito G, Stabile E, Feliciello A, Mele E, Giuliano P, Condorelli G, et al. Inhibition of cellular ras prevents smooth muscle cell proliferation after vascular injury in vivo. *Nat Med.* 1995;1:541-545.
343. Sugita M, Sugita H, Kaneki M. Farnesyltransferase inhibitor, manumycin a, prevents atherosclerosis development and reduces oxidative stress in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1390-1395.
344. Mattingly RR, Gibbs RA, Menard RE, Reiners JJ, Jr. Potent suppression of proliferation of a10 vascular smooth muscle cells by combined treatment with lovastatin and 3-allylfarnesol, an inhibitor of protein farnesyltransferase. *J Pharmacol Exp Ther.* 2002;303:74-81.
345. Negre-Aminou P, van Vliet AK, van Erck M, van Thiel GC, van Leeuwen RE, Cohen LH. Inhibition of proliferation of human smooth muscle cells by various HMG-CoA reductase inhibitors; comparison with other human cell types. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1345:259-268.
346. Madaule P, Axel R. A novel ras-related gene family. *Cell.* 1985;41:31-40.
347. Wheeler AP, Ridley AJ. Why three Rho proteins? RhoA, RhoB, RhoC, and cell motility. *Exp Cell Res.* 2004;301:43-49.

-
348. Pfitzer G, Sonntag-Bensch D, Brkic-Koric D. Thiophosphorylation-induced Ca(2+) sensitization of guinea-pig ileum contractility is not mediated by Rho-associated kinase. *J Physiol*. 2001;533:651-664.
349. Miano JM. Serum response factor: toggling between disparate programs of gene expression. *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35:577-593.
350. Liu HW, Halayko AJ, Fernandes DJ, Harmon GS, McCauley JA, Kocieniewski P, McConville J, Fu Y, Forsythe SM, Kogut P, Bellam S, Dowell M, Churchill J, Lesso H, Kassiri K, Mitchell RW, Hershenson MB, Camoretti-Mercado B, Solway J. The RhoA/Rho kinase pathway regulates nuclear localization of serum response factor. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2003;29:39-47.
351. Loirand G, Rolli-Derkinderen M, Pacaud P. RhoA and resistance artery remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H1051-1056.
352. Ai S, Kuzuya M, Koike T, Asai T, Kanda S, Maeda K, Shibata T, Iguchi A. Rho-Rho kinase is involved in smooth muscle cell migration through myosin light chain phosphorylation-dependent and independent pathways. *Atherosclerosis*. 2001;155:321-327.
353. Seasholtz TM, Majumdar M, Kaplan DD, Brown JH. Rho and Rho kinase mediate thrombin-stimulated vascular smooth muscle cell DNA synthesis and migration. *Circ Res*. 1999;84:1186-1193.
354. Liu B, Itoh H, Louie O, Kubota K, Kent KC. The signaling protein Rho is necessary for vascular smooth muscle migration and survival but not for proliferation. *Surgery*. 2002;132:317-325.
355. Seibold S, Schurle D, Heinloth A, Wolf G, Wagner M, Galle J. Oxidized LDL induces proliferation and hypertrophy in human umbilical vein endothelial cells via regulation of p27Kip1 expression: role of RhoA. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15:3026-3034.
356. Hengst L, Reed SI. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science*. 1996;271:1861-1864.
357. Lai JM, Wu S, Huang DY, Chang ZF. Cytosolic retention of phosphorylated extracellular signal-regulated kinase and a Rho-associated kinase-mediated signal impair expression of p21(Cip1/Waf1) in phorbol 12-myristate-13-acetate-induced apoptotic cells. *Mol Cell Biol*. 2002;22:7581-7592.
358. Han JS, Macarak E, Rosenbloom J, Chung KC, Chaqour B. Regulation of Cyr61/CCN1 gene expression through RhoA GTPase and p38MAPK signaling pathways. *Eur J Biochem*. 2003;270:3408-3421.
359. Lockman K, Hinson JS, Medlin MD, Morris D, Taylor JM, Mack CP. Sphingosine 1-phosphate stimulates smooth muscle cell differentiation and proliferation by activating separate serum response factor co-factors. *J Biol Chem*. 2004;279:42422-42430.
360. Marinissen MJ, Chiariello M, Tanos T, Bernard O, Narumiya S, Gutkind JS. The small GTP-binding protein RhoA regulates c-jun by a ROCK-JNK signaling axis. *Mol Cell*. 2004;14:29-41.

-
361. Amano M, Fukata Y, Kaibuchi K. Regulation and functions of Rho-associated kinase. *Exp Cell Res*. 2000;261:44-51.
362. Fukata Y, Amano M, Kaibuchi K. Rho-Rho-kinase pathway in smooth muscle contraction and cytoskeletal reorganization of non-muscle cells. *Trends Pharmacol Sci*. 2001;22:32-39.
363. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol*. 2001;3:339-345.
364. Lichtenstein AH. Dietary fat: a history. *Nutr Rev*. 1999;57:11-14.
365. Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature*. 1990;347:645-650.
366. Mangelsdorf DJ, Evans RM. The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*. 1995;83:841-850.
367. A unified nomenclature system for the nuclear receptor superfamily. *Cell*. 1999;97:161-163.
368. Willson TM, Brown PJ, Sternbach DD, Henke BR. The PPARs: from orphan receptors to drug discovery. *J Med Chem*. 2000;43:527-550.
369. Castillo G, Brun RP, Rosenfield JK, Hauser S, Park CW, Troy AE, Wright ME, Spiegelman BM. An adipogenic cofactor bound by the differentiation domain of PPARgamma. *EMBO J*. 1999;18:3676-3687.
370. Sakai J, Duncan EA, Rawson RB, Hua X, Brown MS, Goldstein JL. Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell*. 1996;85:1037-1046.
371. Shao D, Rangwala SM, Bailey ST, Krakow SL, Reginato MJ, Lazar MA. Interdomain communication regulating ligand binding by PPAR-gamma. *Nature*. 1998;396:377-380.
372. Kliewer SA, Umesono K, Noonan DJ, Heyman RA, Evans RM. Convergence of 9-cis retinoic acid and peroxisome proliferator signalling pathways through heterodimer formation of their receptors. *Nature*. 1992;358:771-774.
373. Zhu Y, Qi C, Calandra C, Rao MS, Reddy JK. Cloning and identification of mouse steroid receptor coactivator-1 (mSRC-1), as a coactivator of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Gene Expr*. 1996;6:185-195.
374. Dowell P, Ishmael JE, Avram D, Peterson VJ, Nevriy DJ, Leid M. p300 functions as a coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha. *J Biol Chem*. 1997;272:33435-33443.
375. Zhu Y, Qi C, Jain S, Rao MS, Reddy JK. Isolation and characterization of PBP, a protein that interacts with peroxisome proliferator-activated receptor. *J Biol Chem*. 1997;272:25500-25506.
376. Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM. A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell*. 1998;92:829-839.

-
377. Treuter E, Albrechtsen T, Johansson L, Leers J, Gustafsson JA. A regulatory role for RIP140 in nuclear receptor activation. *Mol Endocrinol.* 1998;12:864-881.
378. Heinlein CA, Ting HJ, Yeh S, Chang C. Identification of ARA70 as a ligand-enhanced coactivator for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem.* 1999;274:16147-16152.
379. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem.* 1997;272:18779-18789.
380. Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* 1998;438:55-60.
381. Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:7614-7619.
382. Mukherjee R, Jow L, Croston GE, Paterniti JR, Jr. Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPARgamma2 versus PPARgamma1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem.* 1997;272:8071-8076.
383. Werman A, Hollenberg A, Solanes G, Bjorbaek C, Vidal-Puig AJ, Flier JS. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma). Differential activity of PPARgamma1 and -2 isoforms and influence of insulin. *J Biol Chem.* 1997;272:20230-20235.
384. Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell.* 1994;79:1147-1156.
385. Hulin B, Newton LS, Lewis DM, Genereux PE, Gibbs EM, Clark DA. Hypoglycemic activity of a series of alpha-alkylthio and alpha-alkoxy carboxylic acids related to ciglitazone. *J Med Chem.* 1996;39:3897-3907.
386. Pershadsingh HA, Szollosi J, Benson S, Hyun WC, Feuerstein BG, Kurtz TW. Effects of ciglitazone on blood pressure and intracellular calcium metabolism. *Hypertension.* 1993;21:1020-1023.
387. Itoh H, Doi K, Tanaka T, Fukunaga Y, Hosoda K, Inoue G, Nishimura H, Yoshimasa Y, Yamori Y, Nakao K. Hypertension and insulin resistance: role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26:558-560.
388. Satoh H, Tsukamoto K, Hashimoto Y, Hashimoto N, Togo M, Hara M, Maekawa H, Isoo N, Kimura S, Watanabe T. Thiazolidinediones suppress endothelin-1 secretion from bovine vascular endothelial cells: a new possible role of PPARgamma on vascular endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;254:757-763.
389. Kato K, Satoh H, Endo Y, Yamada D, Midorikawa S, Sato W, Mizuno K, Fujita T, Tsukamoto K, Watanabe T. Thiazolidinediones down-regulate plasminogen

- activator inhibitor type 1 expression in human vascular endothelial cells: A possible role for PPARgamma in endothelial function. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;258:431-435.
390. Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B. Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem.* 1998;273:25573-25580.
391. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature.* 1998;391:82-86.
392. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature.* 1998;391:79-82.
393. Pasceri V, Wu HD, Willerson JT, Yeh ET. Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators. *Circulation.* 2000;101:235-238.
394. Law RE, Goetze S, Xi XP, Jackson S, Kawano Y, Demer L, Fishbein MC, Meehan WP, Hsueh WA. Expression and function of PPARgamma in rat and human vascular smooth muscle cells. *Circulation.* 2000;101:1311-1318.
395. Marx N, Schonbeck U, Lazar MA, Libby P, Plutzky J. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit gene expression and migration in human vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1998;83:1097-1103.
396. Wakino S, Kintscher U, Kim S, Yin F, Hsueh WA, Law RE. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1--> S transition in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 2000;275:22435-22441.
397. Goetze S, Xi XP, Kawano H, Gotlibowski T, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. PPAR gamma-ligands inhibit migration mediated by multiple chemoattractants in vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;33:798-806.
398. Graf K, Xi XP, Yang D, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Mitogen-activated protein kinase activation is involved in platelet-derived growth factor-directed migration by vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 1997;29:334-339.
399. Xi XP, Graf K, Goetze S, Fleck E, Hsueh WA, Law RE. Central role of the MAPK pathway in ang II-mediated DNA synthesis and migration in rat vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:73-82.
400. Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell.* 1993;75:187-197.
401. Tontonoz P, Kim JB, Graves RA, Spiegelman BM. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol Cell Biol.* 1993;13:4753-4759.
402. Miserez AR, Cao G, Probst LC, Hobbs HH. Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein 2 (SREBF2). *Genomics.* 1997;40:31-40.

-
403. Shimomura I, Shimano H, Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. Differential expression of exons 1a and 1c in mRNAs for sterol regulatory element binding protein-1 in human and mouse organs and cultured cells. *J Clin Invest.* 1997;99:838-845.
404. Rawson RB. The SREBP pathway--insights from Insigs and insects. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:631-640.
405. DeBose-Boyd RA, Brown MS, Li WP, Nohturfft A, Goldstein JL, Espenshade PJ. Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell.* 1999;99:703-712.
406. Sakai J, Nohturfft A, Goldstein JL, Brown MS. Cleavage of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) at site-1 requires interaction with SREBP cleavage-activating protein. Evidence from in vivo competition studies. *J Biol Chem.* 1998;273:5785-5793.
407. Nohturfft A, Brown MS, Goldstein JL. Sterols regulate processing of carbohydrate chains of wild-type SREBP cleavage-activating protein (SCAP), but not sterol-resistant mutants Y298C or D443N. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:12848-12853.
408. Wang X, Zelenski NG, Yang J, Sakai J, Brown MS, Goldstein JL. Cleavage of sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) by CPP32 during apoptosis. *EMBO J.* 1996;15:1012-1020.
409. Oliner JD, Andresen JM, Hansen SK, Zhou S, Tjian R. SREBP transcriptional activity is mediated through an interaction with the CREB-binding protein. *Genes Dev.* 1996;10:2903-2911.
410. Ericsson J, Edwards PA. CBP is required for sterol-regulated and sterol regulatory element-binding protein-regulated transcription. *J Biol Chem.* 1998;273:17865-17870.
411. Vallett SM, Sanchez HB, Rosenfeld JM, Osborne TF. A direct role for sterol regulatory element binding protein in activation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene. *J Biol Chem.* 1996;271:12247-12253.
412. Athanikar JN, Osborne TF. Specificity in cholesterol regulation of gene expression by coevolution of sterol regulatory DNA element and its binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95:4935-4940.
413. Magana MM, Koo SH, Towle HC, Osborne TF. Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase. *J Biol Chem.* 2000;275:4726-4733.
414. Shimano H, Horton JD, Hammer RE, Shimomura I, Brown MS, Goldstein JL. Overproduction of cholesterol and fatty acids causes massive liver enlargement in transgenic mice expressing truncated SREBP-1a. *J Clin Invest.* 1996;98:1575-1584.
415. Shimano H, Yahagi N, Amemiya-Kudo M, Hasty AH, Osuga J, Tamura Y, Shionoiri F, Iizuka Y, Ohashi K, Harada K, Gotoda T, Ishibashi S, Yamada N. Sterol regulatory element-binding protein-1 as a key transcription factor for nutritional induction of lipogenic enzyme genes. *J Biol Chem.* 1999;274:35832-35839.

416. Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, Shimano H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J Clin Invest.* 1998;101:2331-2339.
417. Pai JT, Guryev O, Brown MS, Goldstein JL. Differential stimulation of cholesterol and unsaturated fatty acid biosynthesis in cells expressing individual nuclear sterol regulatory element-binding proteins. *J Biol Chem.* 1998;273:26138-26148.
418. Shimomura I, Shimano H, Korn BS, Bashmakov Y, Horton JD. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J Biol Chem.* 1998;273:35299-35306.
419. Apfel R, Benbrook D, Lernhardt E, Ortiz MA, Salbert G, Pfahl M. A novel orphan receptor specific for a subset of thyroid hormone-responsive elements and its interaction with the retinoid/thyroid hormone receptor subfamily. *Mol Cell Biol.* 1994;14:7025-7035.
420. Willy PJ, Umesono K, Ong ES, Evans RM, Heyman RA, Mangelsdorf DJ. LXR, a nuclear receptor that defines a distinct retinoid response pathway. *Genes Dev.* 1995;9:1033-1045.
421. Repa JJ, Liang G, Ou J, Bashmakov Y, Lobaccaro JM, Shimomura I, Shan B, Brown MS, Goldstein JL, Mangelsdorf DJ. Regulation of mouse sterol regulatory element-binding protein-1c gene (SREBP-1c) by oxysterol receptors, LXRalpha and LXRbeta. *Genes Dev.* 2000;14:2819-2830.
422. Teboul M, Enmark E, Li Q, Wikstrom AC, Pelto-Huikko M, Gustafsson JA. OR-1, a member of the nuclear receptor superfamily that interacts with the 9-cis-retinoic acid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:2096-2100.
423. Dietschy JM, Turley SD. Control of cholesterol turnover in the mouse. *J Biol Chem.* 2002;277:3801-3804.
424. Kaneko E, Matsuda M, Yamada Y, Tachibana Y, Shimomura I, Makishima M. Induction of intestinal ATP-binding cassette transporters by a phytosterol-derived liver X receptor agonist. *J Biol Chem.* 2003;278:36091-36098.
425. Zelcer N, Tontonoz P. SUMOylation and PPARgamma: wrestling with inflammatory signaling. *Cell Metab.* 2005;2:273-275.
426. Joseph SB, Castrillo A, Laffitte BA, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Reciprocal regulation of inflammation and lipid metabolism by liver X receptors. *Nat Med.* 2003;9:213-219.
427. Pasterkamp G, Schoneveld AH, Hijnen DJ, de Kleijn DP, Teepen H, van der Wal AC, Borst C. Atherosclerotic arterial remodeling and the localization of macrophages and matrix metalloproteases 1, 2 and 9 in the human coronary artery. *Atherosclerosis.* 2000;150:245-253.
428. Freeman MW, Moore KJ. eLiXiRs for restraining inflammation. *Nat Med.* 2003;9:168-169.

-
429. Chawla A, Boisvert WA, Lee CH, Laffitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell*. 2001;7:161-171.
430. Laffitte BA, Repa JJ, Joseph SB, Wilpitz DC, Kast HR, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. LXRs control lipid-inducible expression of the apolipoprotein E gene in macrophages and adipocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:507-512.
431. Endo A, Kuroda M, Tsujita Y. ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterologenesis produced by *Penicillium citrinium*. *J Antibiot (Tokyo)*. 1976;29:1346-1348.
432. Endo A, Kuroda M, Tanzawa K. Competitive inhibition of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase by ML-236A and ML-236B fungal metabolites, having hypocholesterolemic activity. 1976. *Atheroscler Suppl*. 2004;5:39-42.
433. Roth BD, Blankley CJ, Chucholowski AW, Ferguson E, Hoefle ML, Ortwine DF, Newton RS, Sekerke CS, Sliskovic DR, Stratton CD, et al. Inhibitors of cholesterol biosynthesis. 3. Tetrahydro-4-hydroxy-6-[2-(1H-pyrrol-1-yl)ethyl]-2H-pyran-2-one inhibitors of HMG-CoA reductase. 2. Effects of introducing substituents at positions three and four of the pyrrole nucleus. *J Med Chem*. 1991;34:357-366.
434. Lea AP, McTavish D. Atorvastatin. A review of its pharmacology and therapeutic potential in the management of hyperlipidaemias. *Drugs*. 1997;53:828-847.
435. Nakamura CE, Abeles RH. Mode of interaction of beta-hydroxy-beta-methylglutaryl coenzyme A reductase with strong binding inhibitors: compactin and related compounds. *Biochemistry*. 1985;24:1364-1376.
436. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994;344:1383-1389.
437. Sacks FM, Pfeffer MA, Moyer LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med*. 1996;335:1001-1009.
438. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. *N Engl J Med*. 1998;339:1349-1357.
439. West of Scotland Coronary Prevention Study: implications for clinical practice. The WOSCOPS Study Group. *Eur Heart J*. 1996;17:163-164.
440. Hueb WA, Bellotti G, de Oliveira SA, Arie S, de Albuquerque CP, Jatene AD, Pileggi F. The Medicine, Angioplasty or Surgery Study (MASS): a prospective, randomized trial of medical therapy, balloon angioplasty or bypass surgery for single proximal left anterior descending artery stenoses. *J Am Coll Cardiol*. 1995;26:1600-1605.

-
441. Buchwald H, Campos CT. Program on the surgical control of the hyperlipidemias: 1994 report. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;25 Suppl 4:S3-10.
442. MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2002;360:7-22.
443. Waters DD, Schwartz GG, Olsson AG, Zeiher A, Oliver MF, Ganz P, Ezekowitz M, Chaitman BR, Leslie SJ, Stern T. Effects of atorvastatin on stroke in patients with unstable angina or non-Q-wave myocardial infarction: a Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) substudy. *Circulation*. 2002;106:1690-1695.
444. Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet*. 2003;361:1149-1158.
445. Koh KK. Effects of statins on vascular wall: vasomotor function, inflammation, and plaque stability. *Cardiovasc Res*. 2000;47:648-657.
446. Fukumoto Y, Libby P, Rabkin E, Hill CC, Enomoto M, Hirouchi Y, Shiomi M, Aikawa M. Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation*. 2001;103:993-999.
447. Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y, Shiomi M, Schoen FJ, Libby P. An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation*. 2001;103:276-283.
448. Bourcier T, Libby P. HMG CoA reductase inhibitors reduce plasminogen activator inhibitor-1 expression by human vascular smooth muscle and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20:556-562.
449. Soma MR, Donetti E, Parolini C, Mazzini G, Ferrari C, Fumagalli R, Paoletti R. HMG CoA reductase inhibitors. In vivo effects on carotid intimal thickening in normocholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb*. 1993;13:571-578.
450. Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Human and porcine smooth muscle cells share similar proliferation dependence on the mevalonate pathway: implication for in vivo interventions in the porcine model. *Eur J Clin Invest*. 1996;26:1023-1032.
451. Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Alonso C, Ortiz A, Plaza JJ, Diaz C, Hernandez G, Egido J. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res*. 1998;83:490-500.
452. Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho

- GTPase-induced down-regulation of p27(Kip1). *J Biol Chem.* 1999;274:21926-21931.
453. Vaughan CJ, Gotto AM, Jr., Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2000;35:1-10.
454. Ortego M, Bustos C, Hernandez-Presa MA, Tunon J, Diaz C, Hernandez G, Egido J. Atorvastatin reduces NF-kappaB activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis.* 1999;147:253-261.
455. Hernandez-Presa MA, Martin-Ventura JL, Ortego M, Gomez-Hernandez A, Tunon J, Hernandez-Vargas P, Blanco-Colio LM, Mas S, Aparicio C, Ortega L, Vivanco F, Gerique JG, Diaz C, Hernandez G, Egido J. Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis and in cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 2002;160:49-58.
456. Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasuhara M, Nishi H, Inoue N, Yokoyama M. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis.* 2001;154:87-96.
457. Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK. Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation.* 1998;97:1129-1135.
458. Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K. The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med.* 2000;6:1004-1010.
459. Laufs U, Liao JK. Post-transcriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase mRNA stability by Rho GTPase. *J Biol Chem.* 1998;273:24266-24271.
460. Badimon JJ, Badimon L, Turitto VT, Fuster V. Platelet deposition at high shear rates is enhanced by high plasma cholesterol levels. In vivo study in the rabbit model. *Arterioscler Thromb.* 1991;11:395-402.
461. Rosenson RS, Tangney CC. Antiatherothrombotic properties of statins: implications for cardiovascular event reduction. *JAMA.* 1998;279:1643-1650.
462. Lacoste L, Lam JY, Hung J, Letchacovski G, Solymoss CB, Waters D. Hyperlipidemia and coronary disease. Correction of the increased thrombogenic potential with cholesterol reduction. *Circulation.* 1995;92:3172-3177.
463. Alfon J, Pueyo Palazon C, Royo T, Badimon L. Effects of statins in thrombosis and aortic lesion development in a dyslipemic rabbit model. *Thromb Haemost.* 1999;81:822-827.
464. Alfon J, Royo T, Garcia-Moll X, Badimon L. Platelet deposition on eroded vessel walls at a stenotic shear rate is inhibited by lipid-lowering treatment with atorvastatin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:1812-1817.
465. Rauch U, Osende JI, Chesebro JH, Fuster V, Vorchheimer DA, Harris K, Harris P, Sandler DA, Fallon JT, Jayaraman S, Badimon JJ. Statins and cardiovascular diseases: the multiple effects of lipid-lowering therapy by statins. *Atherosclerosis.* 2000;153:181-189.

466. Dangas G, Smith DA, Unger AH, Shao JH, Meraj P, Fier C, Cohen AM, Fallon JT, Badimon JJ, Ambrose JA. Pravastatin: an antithrombotic effect independent of the cholesterol-lowering effect. *Thromb Haemost.* 2000;83:688-692.
467. Notarbartolo A, Davi G, Averna M, Barbagallo CM, Ganci A, Giammarresi C, La Placa FP, Patrono C. Inhibition of thromboxane biosynthesis and platelet function by simvastatin in type IIa hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:247-251.
468. Osamah H, Mira R, Sorina S, Shlomo K, Michael A. Reduced platelet aggregation after fluvastatin therapy is associated with altered platelet lipid composition and drug binding to the platelets. *Br J Clin Pharmacol.* 1997;44:77-83.
469. Lijnen P, Echevaria-Vazquez D, Petrov V. Influence of cholesterol-lowering on plasma membrane lipids and function. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1996;18:123-136.
470. Szczeklik A, Musial J, Undas A, Gajewski P, Gora P, Swadzba J, Jankowski M. Inhibition of thrombin generation by simvastatin and lack of additive effects of aspirin in patients with marked hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol.* 1999;33:1286-1293.
471. Undas A, Brummel KE, Musial J, Mann KG, Szczeklik A. Simvastatin depresses blood clotting by inhibiting activation of prothrombin, factor V, and factor XIII and by enhancing factor Va inactivation. *Circulation.* 2001;103:2248-2253.
472. Neumann FJ. Chlamydia pneumoniae-atherosclerosis link: a sound concept in search for clinical relevance. *Circulation.* 2002;106:2414-2416.
473. Golub LM, Lee HM, Ryan ME, Giannobile WV, Payne J, Sorsa T. Tetracyclines inhibit connective tissue breakdown by multiple non-antimicrobial mechanisms. *Adv Dent Res.* 1998;12:12-26.
474. Ryan ME, Ramamurthy S, Golub LM. Matrix metalloproteinases and their inhibition in periodontal treatment. *Curr Opin Periodontol.* 1996;3:85-96.
475. Greenwald RA. Treatment of destructive arthritic disorders with MMP inhibitors. Potential role of tetracyclines. *Ann N Y Acad Sci.* 1994;732:181-198.
476. Curci JA, Petrincec D, Liao S, Golub LM, Thompson RW. Pharmacologic suppression of experimental abdominal aortic aneurysms: a comparison of doxycycline and four chemically modified tetracyclines. *J Vasc Surg.* 1998;28:1082-1093.
477. Prall AK, Longo GM, Mayhan WG, Waltke EA, Fleckten B, Thompson RW, Baxter BT. Doxycycline in patients with abdominal aortic aneurysms and in mice: comparison of serum levels and effect on aneurysm growth in mice. *J Vasc Surg.* 2002;35:923-929.
478. Guerin C, Laterra J, Masnyk T, Golub LM, Brem H. Selective endothelial growth inhibition by tetracyclines that inhibit collagenase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;188:740-745.
479. Yao JS, Chen Y, Zhai W, Xu K, Young WL, Yang GY. Minocycline exerts multiple inhibitory effects on vascular endothelial growth factor-induced smooth muscle

- cell migration: the role of ERK1/2, PI3K, and matrix metalloproteinases. *Circ Res.* 2004;95:364-371.
480. Bendeck MP, Conte M, Zhang M, Nili N, Strauss BH, Farwell SM. Doxycycline modulates smooth muscle cell growth, migration, and matrix remodeling after arterial injury. *Am J Pathol.* 2002;160:1089-1095.
481. Loftus IM, Porter K, Peterson M, Boyle J, London NJ, Bell PR, Thompson MM. MMP inhibition reduces intimal hyperplasia in a human vein graft stenosis model. *Ann N Y Acad Sci.* 1999;878:547-550.
482. Nikodemova M, Duncan ID, Watters JJ. Minocycline exerts inhibitory effects on multiple mitogen-activated protein kinases and IkappaBalpha degradation in a stimulus-specific manner in microglia. *J Neurochem.* 2006;96:314-323.
483. Sanders TA. Polyunsaturated fatty acids in the food chain in Europe. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:176S-178S.
484. Kromhout D, Bosschieter EB, de Lezenne Coulander C. The inverse relation between fish consumption and 20-year mortality from coronary heart disease. *N Engl J Med.* 1985;312:1205-1209.
485. Daviglius ML, Stamler J, Orenca AJ, Dyer AR, Liu K, Greenland P, Walsh MK, Morris D, Shekelle RB. Fish consumption and the 30-year risk of fatal myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1997;336:1046-1053.
486. Albert CM, Hennekens CH, O'Donnell CJ, Ajani UA, Carey VJ, Willett WC, Ruskin JN, Manson JE. Fish consumption and risk of sudden cardiac death. *JAMA.* 1998;279:23-28.
487. Kromhout D. N-3 fatty acids and coronary heart disease: epidemiology from Eskimos to Western populations. *J Intern Med Suppl.* 1989;731:47-51.
488. *Report of the British Nutrition Foundation's Task Force: n-3 fatty acids and health.* The British Nutrition Foundation. New York & London: Chapman & Hall.; 1999.
489. Connor WE. Importance of n-3 fatty acids in health and disease. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:171S-175S.
490. *The British Nutrition Foundation: Diet and heart disease, a round table of factors. Segunda Edición.* London: Chapman & Hall; 1997.
491. Williams CM, Maunder K. Fatty acid compositions of inositol and choline phospholipids of breast tumours and normal breast tissue. *Eur J Clin Nutr.* 1993;47:260-267.
492. Visioli F, Rise P, Plasmati E, Pazzucconi F, Sirtori CR, Galli C. Very low intakes of N-3 fatty acids incorporated into bovine milk reduce plasma triacylglycerol and increase HDL-cholesterol concentrations in healthy subjects. *Pharmacol Res.* 2000;41:571-576.
493. Cobiac L, Clifton PM, Abbey M, Belling GB, Nestel PJ. Lipid, lipoprotein, and hemostatic effects of fish vs fish-oil n-3 fatty acids in mildly hyperlipidemic males. *Am J Clin Nutr.* 1991;53:1210-1216.

-
494. Schectman G, Boerboom LE, Hannah J, Howard BV, Mueller RA, Kissebah AH. Dietary fish oil decreases low-density-lipoprotein clearance in nonhuman primates. *Am J Clin Nutr.* 1996;64:215-221.
495. Harris WS. n-3 fatty acids and serum lipoproteins: human studies. *Am J Clin Nutr.* 1997;65:1645S-1654S.
496. Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. *Lipids.* 2003;38:343-352.
497. Yaqoob P, Calder PC. The effects of dietary lipid manipulation on the production of murine T cell-derived cytokines. *Cytokine.* 1995;7:548-553.
498. Weber C, Erl W, Pietsch A, Danesch U, Weber PC. Docosahexaenoic acid selectively attenuates induction of vascular cell adhesion molecule-1 and subsequent monocytic cell adhesion to human endothelial cells stimulated by tumor necrosis factor-alpha. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:622-628.
499. Hughes DA, Pinder AC, Piper Z, Johnson IT, Lund EK. Fish oil supplementation inhibits the expression of major histocompatibility complex class II molecules and adhesion molecules on human monocytes. *Am J Clin Nutr.* 1996;63:267-272.
500. Miles EA, Wallace FA, Calder PC. Reduction of scavenger receptor expression and function by dietary fish oil is accompanied by a reduction in scavenger receptor mRNA. *Lipids.* 1999;34 Suppl:S215-216.
501. Baumann KH, Hessel F, Larass I, Muller T, Angerer P, Kiefl R, von Schacky C. Dietary omega-3, omega-6, and omega-9 unsaturated fatty acids and growth factor and cytokine gene expression in unstimulated and stimulated monocytes. A randomized volunteer study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999;19:59-66.
502. Thies F, Garry JM, Yaqoob P, Rerkasem K, Williams J, Shearman CP, Gallagher PJ, Calder PC, Grimble RF. Association of n-3 polyunsaturated fatty acids with stability of atherosclerotic plaques: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2003;361:477-485.
503. Lee TH, Hoover RL, Williams JD, Sperling RI, Ravalese J, 3rd, Spur BW, Robinson DR, Corey EJ, Lewis RA, Austen KF. Effect of dietary enrichment with eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on in vitro neutrophil and monocyte leukotriene generation and neutrophil function. *N Engl J Med.* 1985;312:1217-1224.
504. Sperling RI, Benincaso AI, Knoell CT, Larkin JK, Austen KF, Robinson DR. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. *J Clin Invest.* 1993;91:651-660.
505. Mayer K, Merfels M, Muhly-Reinholz M, Gokorsch S, Rosseau S, Lohmeyer J, Schwarzer N, Krull M, Suttorp N, Grimminger F, Seeger W. Omega-3 fatty acids suppress monocyte adhesion to human endothelial cells: role of endothelial PAF generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H811-818.
506. Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM, Otsuka K. Brief review: molecular mechanisms of neutrophil binding to endothelium involving platelet-activating factor and cytokines. *J Lipid Mediat.* 1990;2 Suppl:S31-43.

507. Wallace JM, Turley E, Gilmore WS, Strain JJ. Dietary fish oil supplementation alters leukocyte function and cytokine production in healthy women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:185-189.
508. Finstad HS, Drevon CA, Kulseth MA, Synstad AV, Knudsen E, Kolset SO. Cell proliferation, apoptosis and accumulation of lipid droplets in U937-1 cells incubated with eicosapentaenoic acid. *Biochem J.* 1998;336 (Pt 2):451-459.
509. Sweeney B, Puri P, Reen DJ. Polyunsaturated fatty acids influence neonatal monocyte survival. *Pediatr Surg Int.* 2001;17:254-258.
510. De Caterina R, Bernini W, Carluccio MA, Liao JK, Libby P. Structural requirements for inhibition of cytokine-induced endothelial activation by unsaturated fatty acids. *J Lipid Res.* 1998;39:1062-1070.
511. Marx N, Sukhova G, Murphy C, Libby P, Plutzky J. Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro. *Am J Pathol.* 1998;153:17-23.
512. Brown AA, Hu FB. Dietary modulation of endothelial function: implications for cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2001;73:673-686.
513. Harris WS, Rambjor GS, Windsor SL, Diederich D. n-3 fatty acids and urinary excretion of nitric oxide metabolites in humans. *Am J Clin Nutr.* 1997;65:459-464.
514. Lopez D, Moller M, Denicola A, Casos K, Rubbo H, Ruiz-Sanz JI, Mitjavila MT. Long-chain n-3 polyunsaturated fatty acid from fish oil modulates aortic nitric oxide and tocopherol status in the rat. *Br J Nutr.* 2008:1-9.
515. Appel LJ, Miller ER, 3rd, Seidler AJ, Whelton PK. Does supplementation of diet with 'fish oil' reduce blood pressure? A meta-analysis of controlled clinical trials. *Arch Intern Med.* 1993;153:1429-1438.
516. Morris MC, Sacks F, Rosner B. Does fish oil lower blood pressure? A meta-analysis of controlled trials. *Circulation.* 1993;88:523-533.
517. Nenseter MS, Drevon CA. Dietary polyunsaturates and peroxidation of low density lipoprotein. *Curr Opin Lipidol.* 1996;7:8-13.
518. Ross R. The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol.* 1971;50:172-186.
519. 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.
520. Rosati C, Garay R. Flow-dependent stimulation of sodium and cholesterol uptake and cell growth in cultured vascular smooth muscle. *J Hypertens.* 1991;9:1029-1033.
521. Rao RS, Miano JM, Olson EN, Seidel CL. The A10 cell line: a model for neonatal, neointimal, or differentiated vascular smooth muscle cells? *Cardiovasc Res.* 1997;36:118-126.

-
522. Sindermann JR, Fan L, Weigel KA, Troyer D, Muller JG, Schmidt A, March KL, Breithardt G. Differences in the effects of HMG-CoA reductase inhibitors on proliferation and viability of smooth muscle cells in culture. *Atherosclerosis*. 2000;150:331-341.
523. Franco C, Ho B, Mulholland D, Hou G, Islam M, Donaldson K, Bendeck MP. Doxycycline alters vascular smooth muscle cell adhesion, migration, and reorganization of fibrillar collagen matrices. *Am J Pathol*. 2006;168:1697-1709.
524. Galaria II, Nicholl SM, Roztocil E, Davies MG. Urokinase-induced smooth muscle cell migration requires PI3-K and Akt activation. *J Surg Res*. 2005;127:46-52.
525. McGuire TF, Qian Y, Vogt A, Hamilton AD, Sebti SM. Platelet-derived growth factor receptor tyrosine phosphorylation requires protein geranylgeranylation but not farnesylation. *J Biol Chem*. 1996;271:27402-27407.
526. Qian Y, Vogt A, Vasudevan A, Sebti SM, Hamilton AD. Selective inhibition of type-I geranylgeranyltransferase in vitro and in whole cells by CAAL peptidomimetics. *Bioorg Med Chem*. 1998;6:293-299.
527. Stark WW, Jr., Blaskovich MA, Johnson BA, Qian Y, Vasudevan A, Pitt B, Hamilton AD, Sebti SM, Davies P. Inhibiting geranylgeranylation blocks growth and promotes apoptosis in pulmonary vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*. 1998;275:L55-63.
528. Peterkofsky B, Diegelmann R. Use of a mixture of proteinase-free collagenases for the specific assay of radioactive collagen in the presence of other proteins. *Biochemistry*. 1971;10:988-994.
529. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-254.
530. Pickering JG, Ford CM, Tang B, Chow LH. Coordinated effects of fibroblast growth factor-2 on expression of fibrillar collagens, matrix metalloproteinases, and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by human vascular smooth muscle cells. Evidence for repressed collagen production and activated degradative capacity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:475-482.
531. Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*. 1993;15:532-534, 536-537.
532. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-408.
533. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29:e45.
534. Antoniv TT, De Val S, Wells D, Denton CP, Rabe C, de Crombrughe B, Ramirez F, Bou-Gharios G. Characterization of an evolutionarily conserved far-upstream enhancer in the human alpha 2(I) collagen (COL1A2) gene. *J Biol Chem*. 2001;276:21754-21764.

-
535. Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 1995;75:487-517.
536. McCarthy NJ, Bennett MR. The regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000;45:747-755.
537. Slomp J, Gittenberger-de Groot AC, Glukhova MA, Conny van Munsteren J, Kockx MM, Schwartz SM, Koteliensky VE. Differentiation, dedifferentiation, and apoptosis of smooth muscle cells during the development of the human ductus arteriosus. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:1003-1009.
538. Linares A, Perales S, Palomino-Morales RJ, Castillo M, Alejandre MJ. Nutritional control, gene regulation, and transformation of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2006;6:151-168.
539. Regan CP, Adam PJ, Madsen CS, Owens GK. Molecular mechanisms of decreased smooth muscle differentiation marker expression after vascular injury. *J Clin Invest.* 2000;106:1139-1147.
540. 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 Angiol.* 1985;31:121-127.
541. Alejandre MJ, Ramirez H, Segovia JL, Garcia-Peregrin E. Effect of dietary cholesterol and cholestyramine on developmental pattern of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase. *Ann Nutr Metab.* 1985;29:111-118.
542. Garcia-Gonzalez M, Segovia JL, Alejandre MJ. Homeostatic restoration of microsomal lipids and enzyme changes in HMG-CoA reductase and acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in chick liver. *Mol Cell Biochem.* 1992;115:173-178.
543. Carazo A, Alejandre MJ, Louktibi A, Linares A. The reversal of the inhibition on lipids synthesis by L-659,699 in arterial smooth muscle cells cultures. *Mol Cell Biochem.* 2001;221:25-31.
544. Carazo A, Alejandre MJ, Suarez MD, Linares A. Alterations in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase mRNA concentration in cultured chick aortic smooth muscle cells. *Lipids.* 2000;35:587-593.
545. Alejandre MJ, Perales S, Carazo A, Palomino-Morales R, Linares A. Cyclic fluctuations of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase in aortic smooth muscle cell cultures. *Lipids.* 2006;41:1089-1099.
546. Ang AH, Tachas G, Campbell JH, Bateman JF, Campbell GR. Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth-muscle cells. Alteration with phenotype. *Biochem J.* 1990;265:461-469.
547. Andreeva ER, Pugach IM, Orekhov AN. Collagen-synthesizing cells in initial and advanced atherosclerotic lesions of human aorta. *Atherosclerosis.* 1997;130:133-142.
548. Moczar M, Robert L. Action of human hyperlipemic sera on the biosynthesis of intercellular matrix macromolecules in aorta organ cultures. *Paroi Arterielle.* 1976;3:105-113.

-
549. Kahn MB, Boesze-Battaglia K, Stepp DW, Petrov A, Huang Y, Mason RP, Tulenko TN. Influence of serum cholesterol on atherogenesis and intimal hyperplasia after angioplasty: inhibition by amlodipine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H591-600.
550. Absood A, Furutani A, Kawamura T, Graham LM. A comparison of oxidized LDL-induced collagen secretion by graft and aortic SMCs: role of PDGF. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;287:H1200-1206.
551. Bachem MG, Wendelin D, Schneiderhan W, Haug C, Zorn U, Gross HJ, Schmid-Kotsas A, Grunert A. Depending on their concentration oxidized low density lipoproteins stimulate extracellular matrix synthesis or induce apoptosis in human coronary artery smooth muscle cells. *Clin Chem Lab Med*. 1999;37:319-326.
552. Tziakas DN, Lazarides MK, Tentis IK, Georgiadis GS, Eleftheriadou E, Chalikias GK, Kortsaris A, Hatseras DI. Gelatinases [matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and MMP-9] induce carotid plaque instability but their systemic levels are not predictive of local events. *Ann Vasc Surg*. 2005;19:529-533.
553. Newby AC. Dual role of matrix metalloproteinases (matrixins) in intimal thickening and atherosclerotic plaque rupture. *Physiol Rev*. 2005;85:1-31.
554. Sime PJ. The antifibrogenic potential of PPARgamma ligands in pulmonary fibrosis. *J Investig Med*. 2008;56:534-538.
555. Hao GH, Niu XL, Gao DF, Wei J, Wang NP. Agonists at PPAR-gamma suppress angiotensin II-induced production of plasminogen activator inhibitor-1 and extracellular matrix in rat cardiac fibroblasts. *Br J Pharmacol*. 2008;153:1409-1419.
556. Teunissen BE, Smeets PJ, Willemsen PH, De Windt LJ, Van der Vusse GJ, Van Bilsen M. Activation of PPARdelta inhibits cardiac fibroblast proliferation and the transdifferentiation into myofibroblasts. *Cardiovasc Res*. 2007;75:519-529.
557. Yang L, Chan CC, Kwon OS, Liu S, McGhee J, Stimpson SA, Chen LZ, Harrington WW, Symonds WT, Rockey DC. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in liver fibrosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2006;291:G902-911.
558. Ferrari A, Maretto S, Giroto D, Volpin D, Bressan GM. SREBP contributes to induction of collagen VI transcription by serum starvation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313:600-605.
559. Castrillo A, Joseph SB, Marathe C, Mangelsdorf DJ, Tontonoz P. Liver X receptor-dependent repression of matrix metalloproteinase-9 expression in macrophages. *J Biol Chem*. 2003;278:10443-10449.
560. Siegel-Axel DI, Runge H, Seipel L, Riessen R. Effects of cerivastatin on human arterial smooth muscle cell growth and extracellular matrix expression at varying glucose and low-density lipoprotein levels. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2003;41:422-433.
561. Riessen R, Axel DI, Fenchel M, Herzog UU, Rossmann H, Karsch KR. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on extracellular matrix expression in human vascular smooth muscle cells. *Basic Res Cardiol*. 1999;94:322-332.

-
562. Luan Z, Chase AJ, Newby AC. Statins inhibit secretion of metalloproteinases-1, -2, -3, and -9 from vascular smooth muscle cells and macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:769-775.
563. Bao-xiang C, **Mei-lin X**. Simvastatin inhibits plaque rupture and subsequent thrombus formation in atherosclerotic rabbits with hyperlipidemia. *Journal of Chinese Clinical Medicine.* 2006;1:6-11.
564. Crisby M, Nordin-Fredriksson G, Shah PK, Yano J, Zhu J, Nilsson J. Pravastatin treatment increases collagen content and decreases lipid content, inflammation, metalloproteinases, and cell death in human carotid plaques: implications for plaque stabilization. *Circulation.* 2001;103:926-933.
565. Liao JK, Laufs U. Pleiotropic effects of statins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2005;45:89-118.
566. Worth NF, Campbell GR, Rolfe BE. A role for rho in smooth muscle phenotypic regulation. *Ann N Y Acad Sci.* 2001;947:316-322.
567. Yano M, Matsumura T, Senokuchi T, Ishii N, Murata Y, Taketa K, Motoshima H, Taguchi T, Sonoda K, Kukidome D, Takuwa Y, Kawada T, Brownlee M, Nishikawa T, Araki E. Statins activate peroxisome proliferator-activated receptor gamma through extracellular signal-regulated kinase 1/2 and p38 mitogen-activated protein kinase-dependent cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Circ Res.* 2007;100:1442-1451.
568. Martin G, Duez H, Blanquart C, Berezowski V, Poulain P, Fruchart JC, Najib-Fruchart J, Glineur C, Staels B. Statin-induced inhibition of the Rho-signaling pathway activates PPARalpha and induces HDL apoA-I. *J Clin Invest.* 2001;107:1423-1432.
569. Sheng Z, Otani H, Brown MS, Goldstein JL. Independent regulation of sterol regulatory element-binding proteins 1 and 2 in hamster liver. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92:935-938.
570. Scharnagl H, Schinker R, Gierens H, Nauck M, Wieland H, Marz W. Effect of atorvastatin, simvastatin, and lovastatin on the metabolism of cholesterol and triacylglycerides in HepG2 cells. *Biochem Pharmacol.* 2001;62:1545-1555.
571. Yao M, Zhou RH, Petreaca M, Zheng L, Shyy J, Martins-Green M. Activation of sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) is critical in IL-8-induced angiogenesis. *J Leukoc Biol.* 2006;80:608-620.
572. Janowski BA, Grogan MJ, Jones SA, Wisely GB, Kliewer SA, Corey EJ, Mangelsdorf DJ. Structural requirements of ligands for the oxysterol liver X receptors LXRalpha and LXRBeta. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96:266-271.
573. Lehmann JM, Kliewer SA, Moore LB, Smith-Oliver TA, Oliver BB, Su JL, Sundseth SS, Winegar DA, Blanchard DE, Spencer TA, Willson TM. Activation of the nuclear receptor LXR by oxysterols defines a new hormone response pathway. *J Biol Chem.* 1997;272:3137-3140.
574. Forman BM, Ruan B, Chen J, Schroepfer GJ, Jr., Evans RM. The orphan nuclear receptor LXRalpha is positively and negatively regulated by distinct products of mevalonate metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94:10588-10593.

-
575. Wong J, Quinn CM, Brown AJ. Statins inhibit synthesis of an oxysterol ligand for the liver x receptor in human macrophages with consequences for cholesterol flux. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:2365-2371.
576. Wong J, Quinn CM, Gelissen IC, Jessup W, Brown AJ. The effect of statins on ABCA1 and ABCG1 expression in human macrophages is influenced by cellular cholesterol levels and extent of differentiation. *Atherosclerosis.* 2008;196:180-189.
577. Argmann CA, Edwards JY, Sawyez CG, O'Neil CH, Hegele RA, Pickering JG, Huff MW. Regulation of macrophage cholesterol efflux through hydroxymethylglutaryl-CoA reductase inhibition: a role for RhoA in ABCA1-mediated cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 2005;280:22212-22221.
578. Nofer JR, Feuerborn R, Levkau B, Sokoll A, Seedorf U, Assmann G. Involvement of Cdc42 signaling in apoA-I-induced cholesterol efflux. *J Biol Chem.* 2003;278:53055-53062.
579. Nofer JR, Remaley AT, Feuerborn R, Wolinnska I, Engel T, von Eckardstein A, Assmann G. Apolipoprotein A-I activates Cdc42 signaling through the ABCA1 transporter. *J Lipid Res.* 2006;47:794-803.
580. Hirano K, Matsuura F, Tsukamoto K, Zhang Z, Matsuyama A, Takaishi K, Komuro R, Suehiro T, Yamashita S, Takai Y, Matsuzawa Y. Decreased expression of a member of the Rho GTPase family, Cdc42Hs, in cells from Tangier disease - the small G protein may play a role in cholesterol efflux. *FEBS Lett.* 2000;484:275-279.
581. Utech M, Hobbel G, Rust S, Reinecke H, Assmann G, Walter M. Accumulation of RhoA, RhoB, RhoG, and Rac1 in fibroblasts from Tangier disease subjects suggests a regulatory role of Rho family proteins in cholesterol efflux. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280:229-236.
582. Brown DL, Desai KK, Vakili BA, Nouneh C, Lee HM, Golub LM. Clinical and biochemical results of the metalloproteinase inhibition with subantimicrobial doses of doxycycline to prevent acute coronary syndromes (MIDAS) pilot trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:733-738.
583. Axisa B, Loftus IM, Naylor AR, Goodall S, Jones L, Bell PR, Thompson MM. Prospective, randomized, double-blind trial investigating the effect of doxycycline on matrix metalloproteinase expression within atherosclerotic carotid plaques. *Stroke.* 2002;33:2858-2864.
584. Liu J, Xiong W, Baca-Regen L, Nagase H, Baxter BT. Mechanism of inhibition of matrix metalloproteinase-2 expression by doxycycline in human aortic smooth muscle cells. *J Vasc Surg.* 2003;38:1376-1383.
585. Islam MM, Franco CD, Courtman DW, Bendeck MP. A nonantibiotic chemically modified tetracycline (CMT-3) inhibits intimal thickening. *Am J Pathol.* 2003;163:1557-1566.
586. Courtman DW, Franco CD, Meng Q, Bendeck MP. Inward remodeling of the rabbit aorta is blocked by the matrix metalloproteinase inhibitor doxycycline. *J Vasc Res.* 2004;41:157-165.

587. Cole AA, Boyd T, Luchene L, Kuettner KE, Schmid TM. Type X collagen degradation in long-term serum-free culture of the embryonic chick tibia following production of active collagenase and gelatinase. *Dev Biol.* 1993;159:528-534.
588. TeKoppele JM, Beekman B, Verzijl N, Koopman JL, DeGroot J, Bank RA. Doxycycline inhibits collagen synthesis by differentiated articular chondrocytes. *Adv Dent Res.* 1998;12:63-67.
589. Parks JS, Johnson FL, Wilson MD, Rudel LL. Effect of fish oil diet on hepatic lipid metabolism in nonhuman primates: lowering of secretion of hepatic triglyceride but not apoB. *J Lipid Res.* 1990;31:455-466.
590. Castillo M, Amalik F, Garcia-Fuentes E, Garcia-Peregrin E. Effects of dietary fish oil on the fatty acid composition of the main lipid classes of chick plasma lipoproteins. *J Physiol Biochem.* 2002;58:125-134.
591. Castillo M, Amalik F, Linares A, Garcia-Peregrin E. Fish oil reduces cholesterol and arachidonic acid levels in plasma and lipoproteins from hypercholesterolemic chicks. *Mol Cell Biochem.* 2000;210:121-130.
592. Castillo M, Amalik F, Linares A, Garcia-Peregrin E. Dietary fish oil reduces cholesterol and arachidonic acid levels in chick plasma and very low density lipoprotein. *Mol Cell Biochem.* 1999;200:59-67.
593. Castillo M, Hortal JH, Gil-Villarino A, Luque P, Iglesias J, Garcia-Peregrin E. Differential effects of dietary fat on chick plasma and liver composition and HMG-CoA reductase activity. *J Nutr Biochem.* 1999;10:198-204.
594. Perales-Romero S. Proliferación y apoptosis en células de músculo liso arteriales en cultivo *Tesis doctoral de la Universidad de Granada*; 2006.
595. Bousserouel S, Raymondjean M, Brouillet A, Bereziat G, Andreani M. Modulation of cyclin D1 and early growth response factor-1 gene expression in interleukin-1beta-treated rat smooth muscle cells by n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids. *Eur J Biochem.* 2004;271:4462-4473.
596. Hostetler HA, Petrescu AD, Kier AB, Schroeder F. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacts with high affinity and is conformationally responsive to endogenous ligands. *J Biol Chem.* 2005;280:18667-18682.
597. Hannah VC, Ou J, Luong A, Goldstein JL, Brown MS. Unsaturated fatty acids down-regulate srebp isoforms 1a and 1c by two mechanisms in HEK-293 cells. *J Biol Chem.* 2001;276:4365-4372.
598. Xu J, Cho H, O'Malley S, Park JH, Clarke SD. Dietary polyunsaturated fats regulate rat liver sterol regulatory element binding proteins-1 and -2 in three distinct stages and by different mechanisms. *J Nutr.* 2002;132:3333-3339.
599. Jia Y, Turek JJ. Polyenoic fatty acid ratios alter fibroblast collagen production via PGE2 and PGE receptor subtype response. *Exp Biol Med (Maywood).* 2004;229:676-683.
600. Varga J, Diaz-Perez A, Rosenbloom J, Jimenez SA. PGE2 causes a coordinate decrease in the steady state levels of fibronectin and types I and III procollagen

- mRNAs in normal human dermal fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun.* 1987;147:1282-1288.
601. Hankenson KD, Watkins BA, Schoenlein IA, Allen KG, Turek JJ. Omega-3 fatty acids enhance ligament fibroblast collagen formation in association with changes in interleukin-6 production. *Proc Soc Exp Biol Med.* 2000;223:88-95.
602. Sorota S, Zhang XS, Margulis M, Tucker K, Priestley T. Characterization of a hERG screen using the IonWorks HT: comparison to a hERG rubidium efflux screen. *Assay Drug Dev Technol.* 2005;3:47-57.
603. Riquet FB, Lai WF, Birkhead JR, Suen LF, Karsenty G, Goldring MB. Suppression of type I collagen gene expression by prostaglandins in fibroblasts is mediated at the transcriptional level. *Mol Med.* 2000;6:705-719.
604. Zhang J, Fang NY, Gao PJ, Wu LY, Han WQ, Guo SJ, Shen WL, Zhu DL. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonists attenuate angiotensin II-induced collagen type I expression in adventitial fibroblasts. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2008;35:72-77.
605. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev.* 1999;79:1193-1226.
606. Negishi M, Sugimoto Y, Ichikawa A. Molecular mechanisms of diverse actions of prostanoid receptors. *Biochim Biophys Acta.* 1995;1259:109-119.
607. Thampatty BP, Li H, Im HJ, Wang JH. EP4 receptor regulates collagen type-I, MMP-1, and MMP-3 gene expression in human tendon fibroblasts in response to IL-1 beta treatment. *Gene.* 2007;386:154-161.
608. Moore BB, Ballinger MN, White ES, Green ME, Herrygers AB, Wilke CA, Toews GB, Peters-Golden M. Bleomycin-induced E prostanoid receptor changes alter fibroblast responses to prostaglandin E2. *J Immunol.* 2005;174:5644-5649.
609. Burelout C, Thibault N, Harbour D, Naccache PH, Bourgoin SG. The PGE2-induced inhibition of the PLD activation pathway stimulated by fMLP in human neutrophils is mediated by PKA at the PI3-Kgamma level. *Biochem Pharmacol.* 2007;74:730-741.
610. Scott G, Fricke A, Fender A, McClelland L, Jacobs S. Prostaglandin E2 regulates melanocyte dendrite formation through activation of PKCzeta. *Exp Cell Res.* 2007;313:3840-3850.
611. Matsumoto M, Sata M, Fukuda D, Tanaka K, Soma M, Hirata Y, Nagai R. Orally administered eicosapentaenoic acid reduces and stabilizes atherosclerotic lesions in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis.* 2008;197:524-533.
612. Kim HH, Lee Y, Eun HC, Chung JH. Eicosapentaenoic acid inhibits TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in human keratinocytes, HaCaT cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;368:343-349.
613. Suzuki I, Iigo M, Ishikawa C, Kuhara T, Asamoto M, Kunimoto T, Moore MA, Yazawa K, Araki E, Tsuda H. Inhibitory effects of oleic and docosahexaenoic acids on lung metastasis by colon-carcinoma-26 cells are associated with reduced matrix metalloproteinase-2 and -9 activities. *Int J Cancer.* 1997;73:607-612.

614. Tsuzuki T, Shibata A, Kawakami Y, Nakagawa K, Miyazawa T. Conjugated eicosapentaenoic acid inhibits vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by suppressing the migration of human umbilical vein endothelial cells. *J Nutr.* 2007;137:641-646.
615. Cipollone F, Prontera C, Pini B, Marini M, Fazia M, De Cesare D, Iezzi A, Ucchino S, Boccoli G, Saba V, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation.* 2001;104:921-927.
616. Cipollone F, Fazia M, Iezzi A, Ciabattoni G, Pini B, Cuccurullo C, Ucchino S, Spigonardo F, De Luca M, Prontera C, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A. Balance between PGD synthase and PGE synthase is a major determinant of atherosclerotic plaque instability in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1259-1265.

Anexo: Publicaciones

Nutritional Control, Gene Regulation, and Transformation of Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis

Linares, A.^{*#}, Perales, S.[#], Palomino-Morales R.J., Castillo, M. and Alexandre, M.J.

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain

Abstract: Contractile-state smooth muscle cells (SMC), the only cell type in the arterial media, undergoes migration to the intima, proliferation, and abundant extracellular matrix production during the early stages of atherosclerosis. This involves the ingestion of low-density lipoprotein (LDL) and modified or oxidised LDL by macrophages together with SMC by several pathways including a scavenger pathway leading to accumulation of cholesterol esters and formation of foam cells. High-plasma cholesterol levels constitute a major causative risk for atherosclerosis. The membrane-bound transcription factor called sterol regulatory element binding protein (SREBP) activates gene-encoding enzymes of cholesterol and fatty acid biosynthesis. The SREBP expression, in response to diet, shows that are involved in both lipogenesis and cholesterol homeostasis, moreover SREBPs are regulated directly by cholesterol. Animal models were used in trials of atherosclerosis, and cholesterol feeding has been described elsewhere as producing atherosclerotic lesions. We have examined the morphological, molecular and proliferative change in arterial SMC mimicking such a cholesterol diet, this transformed SMC is a good model to study the alterations of the differentiated state of SMC, and the transformation into foam cell, caused by cholesterol-rich diet. Despite the complexity of the interactions in atherosclerosis, there are many opportunities to affect the homeostatic balance of the artery wall at SMC levels. We have considered here some of the possible targets for intervention with promising strategies for the nutritional control of the genes, and, in a general way, the possibilities for modulating the expression of genes influencing atherosclerosis

Key Words: Smooth muscle cells, cholesterol, extracellular matrix, proliferation, apoptosis, SREBP, atherosclerosis, nutritional control, gene regulation.

INTRODUCTION

Vascular diseases, not only atherosclerosis but also restenosis following angioplasty or transplantation, are due to abnormal vascular smooth-muscle-cell (VSMC) growth and gene expression. Atherosclerosis is responsible for myocardial infarction and stroke, representing 50% of all mortality in the USA, Europe and Japan. Atherosclerosis is an accumulative process characterized by the progression of a lesion in the artery wall resulting from an excessive inflammatory-fibroproliferative response to various forms of injury to the endothelium and smooth muscle of the artery wall [1]. A large number of growth factors, cytokines, and vasoregulatory molecules participate in this process. A recent review focuses on the current state of knowledge of molecular mechanisms/processes that control differentiation of VSMC during normal development and maturation of the vasculatures as well as how these mechanisms/processes are altered in vascular injury or disease [2]. The control of the expression of genes encoding these molecules and to target specific cell types provides opportunities to develop new diagnostic and therapeutic agents to induce the regression of the lesions and, possibly, to prevent their formation.

The earliest recognizable lesion of atherosclerosis is the so-called "fatty streak", an aggregation of lipid-rich macro-

phages and T lymphocytes within the innermost layer of artery wall, the intima. Intermediate lesions [3,4] are composed of layers of macrophages, and SMC in turn develop into the more advanced, complex, occlusive lesions called fibrous plaques. The fibrous plaques increase in size and, projecting into the arterial lumen, may impede the flow of blood. Studies of animals with artificially induced hypercholesterolaemia [5,6,7,8] have confirmed that three processes are involved in the formation of atherosclerotic lesions: 1. the proliferation of SMC, macrophages and lymphocytes; 2. the formation by SMC of a connective-tissue matrix comprising elastic fibre proteins, collagen and proteoglycans; and 3. the accumulation of lipids and mostly free and esterified cholesterol in the surrounding matrix and the associated cells. The cellular events that occur during progression of lesions in hypercholesterolaemic animals are almost exactly mirrored by those observed in human atherosclerotic coronary arteries in heart removed in transplant operations [9]. Progression of atherosclerotic lesions is thus marked by accumulation of alternating layers of lipid-laden SMC and macrophages surrounded by extracellular matrix.

Two different phenotypes have been described for SMC based on the distribution of myosin filaments and the formation of large amounts of rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus for secreted protein. When cells are in a contractile phenotype, they respond to agents that induce either vasoconstriction or vasodilation, such as catecholamines [10], neuropeptides [11] or nitric oxide (NO) [12]. By contrast, in the synthetic state, these are capable of expressing genes for a number of growth-regulatory molecules and

*Address correspondence to this author at the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University of Granada, Fuentenueva s/n, Granada, Spain; Tel: 34-958-243088; Fax: 34-958-249945; E-mail: analinar@ugr.es.

principal authors.

cytokines [2]. Thus, SMC play the main role in the fibro-proliferative component of this disease process [13]. Atherosclerotic plaque is located within the intima, and consists of a necrotic core overlaid by a fibrous cap composed mainly of proliferated SMCs, T-cell lymphocytes, a few neutrophils, and dense connective tissue consisting of collagen, elastin and proteoglycans. The necrotic core contains cellular debris, extracellular lipids, cholesterol crystals, and calcium deposits. Around the edges are numerous lipid-laden foam cells of both macrophage and smooth-muscle origin. The death of these cells contributes to the necrotic core. The focus of this review is to provide an overview of the current state of knowledge of molecular mechanisms, gene regulation, and nutritional control of the proliferation of vascular SMC and of their transformation into foam cells in atherosclerosis process. We will not review the control of differentiation of vascular SMC during vascular injury or disease, since this topic was reviewed very recently by Owens *et al.* [2]. With the increased understanding of the molecular and cellular interactions, extracellular matrix protein role, as well as gene expression and regulation, new potential targets for pharmacologic intervention are promising.

THE TRANSFORMATION OF VASCULAR SMOOTH-MUSCLE CELLS IN ATHEROSCLEROSIS

Vascular Smooth-Muscle Cells

Vascular smooth-muscle cells (VSMC) play a key role in atherogenic process, it is widely known that SMC migrate, proliferate, produce extracellular matrix components and are transformed by accumulating lipids [14]. This modulation process is conditioned by a change in their phenotypic state: the adult contractile phenotype expressed in both atherogenic and remodelling process and also in embryonic aorta. The concept of SMC phenotypic modulation gained currency many years ago [15]. Arterial SMC in culture reveal a similar modulation from contractile-like to synthetic state [15,8] characterized by their cytoskeletal and cytoenzymatic features [16] during passages; i.e. the harvested SMC progressively lose their contractile phenotype at confluency and exhibit synthetic characteristics identical to those observed in the synthetic SMC of the diffuse intimal thickening [15,16]. In long term culture, they develop a transformed phenotype [15,17,8] with increased proliferation [8,18] providing a good model to study SMC transformation and gene regulation during the modulation process *in vitro*.

More recently, the term “swirling-type” has been used to denote SMC phenotypes having elongated, spindle-shaped cell bodies which form typical SMC “hills-and-valleys” morphology at confluence [19]. The predominant cell type found in the normal media of arteries, this type corresponds to a contractile phenotype. Another SMC is called “epithelioid-type” which has cuboidal cell bodies, grows to a monolayer after reaching confluence and would correspond to synthetic-phenotype [19]. This phenotype represents only a small fraction of SMCs from normal arterial media, but is believed to be the major SMC type to migrate from the media and proliferate into neointima during the progression of

atherosclerosis and restenosis after angioplasty. Recently, the “swirling” and an “epithelioid” SMC phenotypes have been isolated and cloned from normal rat carotid arteries [20]. These authors have shown that, when stimulated with various agonists, the “epithelioid” SMC phenotype secreted more proteinases than did the “swirling” SMC, while both phenotypes secreted similar amounts of proteinase inhibitors when cultured under similar conditions [20]. The conclusion was that higher proteolytic potential of “epithelioid” SMC supports the idea that it is the active SMC phenotype that proliferates and migrates under pathological conditions.

Cytoskeleton and the VSMC Phenotypic Modulation

As mentioned above, VSMCs undergo a phenotypic transformation and exhibit a functional plasticity, modulating from the mature phenotype (in which the primary function is contraction) to a less differentiated state with increased capacities for motility, protein synthesis, and proliferation. Change in phenotypic expression of rabbit aortic SMC in culture could be correlated with alterations in expression and distribution of structural proteins [21]. Contractile state SMC (day 1 and 3 of primary culture) showed distinct sorting of proteins into subcellular domains, consistent with the theory that the SMC structural machinery is compartmentalised within the cell. Proteins specialised for contraction (α -SM actin, SM-MHC, and calponin) were amply expressed in these cells and concentrated in the upper central region of the cell [21]. Vimentin was confined to the body of the cell, providing support for the contractile apparatus but not colocalising with it. In line with its role in cell attachment and motility, -MN actin was localised to the cell periphery and basal cortex [21]. The dense body protein α -actinin was concentrated at the cell periphery, possibly stabilising both the contractile and the motile apparatus. Vinculin-containing focal adhesions were well developed, indicating the cells' strong adhesion to the substrate. In synthetic-state SMC (passage 2-3 of culture), there was decreased expression of contractile and adhesion (vinculin) proteins with a concomitant increase in cytoskeletal proteins -no-muscle [NM] actin and vimentin. These quantitative changes in structural proteins were associated with dramatic changes in their distribution [21] the distinct compartmentalisation of structural proteins observed in contractile state SMC was no longer obvious with proteins were more evenly distributed throughout the cytoplasm to accommodate altered cell function. This, SMC phenotypic modulation involves not only quantitative changes in contractile and cytoskeletal proteins, but also reorganisation of these proteins. Since the cytoskeleton acts as a spatial regulator of intracellular signalling, reorganisation of the cytoskeleton may lead to the realignment of signalling molecules, which, in turn, may mediate the changes in function associated with SMC phenotypic modulation [21]. The morphological changes associated with the establishment of the differentiated phenotype were also found to include changes in the expression of the cytoskeletal-extracellular matrix complex. The integrins are linked to both the cytoskeleton and extracellular matrix, [22], integrins are transmembrane heterodimers proteins that bind to a

number of signal-transduction pathways [23]. There is evidence for a role of integrins in cell survival promoted by ECM, and blockade of integrins can trigger apoptosis of endothelial cells *in vivo* [24]. Cell morphogenesis is determined to a large extent by the type of cell-to-cell and cell-to-substrate interaction. Change in these various kinds of cell adhesion, which are established through specific transmembrane receptors, can alter the organization of cytoskeletal elements which are anchored to the receptors. These alterations in cytoskeletal structure may affect physiological and pathological processes in the cell. Environmental modulations of receptor-cytoskeletal interaction have been shown by numerous investigators to influence patterns of gene expression related to cell growth and differentiation. The possibility that the cytoskeleton is a major mechanical-chemical coordinator of signal transduction from the cell surface to the nucleus has been extensively discussed [25]. Changes in the state of cytoskeletal organization are transduced to influence the expression of the respective cytoskeletal protein gene to reflect the "new cytoskeletal state" established after such cell-environment interaction.

The Extracellular Matrix and VSMC Proliferation

The vascular smooth-muscle cell (SMC) is responsible for maintaining both arterial tone *via* contraction-relaxation and vessel integrity by proliferation and synthesis of extracellular matrix (ECM) [26]. The extracellular matrix (ECM) is a complex mixture of insoluble structural proteins and diffusible metabolites. The cell-attachment protein contains one domain involved in binding the cell surface, and another domain for extracellular molecules [27,28]. Fibronectin, type I collagen and type III collagen genes code for the three major proteins of the ECM [29,30]. The regulation of the genes coding for ECM is an important part of many cellular functions such as adhesion, proliferation, migration and differentiation. Quantitative and qualitative modifications in ECM gene expression vary as a function of cell type, age and related pathological processes [31,32]. Various amount and types of collagens, adhesion molecules, proteoglycans growth factors and cytokines or chemokines are present in the extracellular matrices [33]. Matrix breakdown is of fundamental importance to many normal and pathological conditions such as tissue remodelling, wound healing, tumour invasion and plaque destabilization. Plaque destabilization is considered to be the greatest causative factor for acute coronary syndrome (ACS) [34,35]. Matrix breakdown requires a battery of enzymes working together, since many of the components are efficiently degraded only by specific proteases [36]. Moreover, matrix metalloproteinase-2 (MMP2) is associated with basement membrane and ECM degradation, important processes for cell migration. Thrombospondin-1 (TSP-1), an ECM glycoprotein associated with VSMC migration, induced MMP2 activation through transcriptional and posttranscriptional mechanisms, implying that MMP2 activation is relevant to the mechanism of TSP-1-induced VSMC migration [37].

During postnatal development, SMC located in the arterial tunica media are maintained in the resting, or G₀/G₁,

stage of the cell cycle and express high levels of contractile protein isoforms [38]. However, in response to vascular injury and the concomitant release of growth factors, vascular SMC re-enter the cell cycle, proliferate, and modulate their phenotype to serve a primarily synthetic function, increasing expression of ECM proteins [39-43]. This phenotype of VSMC synthesise and secrete a variety of macromolecules that form the ECM of the vascular tissue, e. g., proteoglycans [44-46], glycoproteins [47], collagen [47-49], and elastin [47]. ECM proteins are a prominent target for non-enzymatic glycation because of their slow turnover rates. Non-enzymatic glycation of human fibronectin reportedly impairs adhesive and proliferative properties of human VSMC [50]. ECM synthesis could be affected by diet supplementation, and thus elastin production is modulated not only by calcium-dependent steroid hormones but also by vitamin D₃. Vitamin D₃ is involved in the regulation of calcium metabolism and influences the expression of various ECM proteins—for example, vitamin D₃ had no effect or decreased tropoelastin expression (depending of dosage and exposure time), suggesting that vitamin D₃ may be an important modulator of elastin expression [51]. Ascorbate supplementation of cultured foetal bovine aortic SMC leads to increased deposition of ECM proteins and stimulation of cell-protein synthesis. This phenomenon has been investigated at the level of gene expression [52]. ECM protein synthesis is also affected by the ECM; in fact, ECM plays a major role in modulating VSMC, thus the proteoglycans (PG) synthesis increased both secreted and cellular by VSMC cultured in ECM derived from vascular endothelial cells (VEC), as well as ECM derived from VSMC or THP-1 macrophages. Selective enzymatic removal of chondroitin sulphates, collagen, and elastin from SMC matrix stimulated PG synthesis, as did the removal of chondroitin sulphates from the macrophage matrix [53]. Moreover, the newly synthesised PG from cultures plated on SMC- or macrophages-derived matrices had greater charge density, large molecular size, and a longer glycosaminoglycan chain than did those from VEC matrix cultures [53]. Proliferating SMC secrete proteoglycans with elongated glycosaminoglycan side chains, which have an increased binding affinity to LDL. Notably, statin-exposure increased the molecular weight and hydrodynamic size of secreted proteoglycans. Thus, statins may induce atheroprotective changes in vascular proteoglycans, and lower LDL retention in the vessel wall [54]. These findings suggest a mechanism whereby statins may benefit atherosclerosis in a manner unrelated to the lowering of serum LDL.

As discussed above, SMC modulating from a contractile to a synthetic phenotype in atherosclerosis synthesise ECM molecules excessively, in particular collagens [15,55-59]. Moreover, cells of the atherosclerotic vessel synthesise type I collagen in preference to type III collagen, unlike cells of the healthy arterial wall [60,61]. With regard to the quantity of totally synthesised collagens as well as to their composition, the cells of the atherosclerotic vessel would appear to be functioning more as fibroblasts than as SMC [61]. The increase in steady-state RNA levels for type IV collagen is not shared by similarly treated fibroblasts and may provide a

useful marker for SMC in culture [62]. Collagen synthesis by cultured rabbit aortic SMC at the protein and mRNA levels undergo a change in phenotypic state; upon modulating to the synthetic phenotype, SMC synthesised 25-30 time more collagen than did contractile cells [63]. At the same time, non-collagen-protein synthesis increased only 5-6 fold. Phenotypic modulation was also associated with an alteration in the relative proportions of type I and III collagens synthesised: contractile SMC synthesise 78.1 % type I collagen and 17.5 % type III collagen while synthetic cells synthesise 90.3 % type I collagen and 5.8 % type III collagen. Enrichment in type I collagen was similarly noted at the mRNA level. On return to the contractile state, at confluency, collagen production and the percentage of type I collagen decreased [63]. This further illustrates the close association between the phenotypic state of SMC and their collagen-biosynthetic phenotype.

Elastin is a critical regulatory molecule that regulates the phenotypic modulation, proliferation and migration of SMCs [64]. Elastin expression and SMC proliferation are inversely coupled: powerful stimulators of cell proliferation may potentially inhibit elastin expression and strong inhibitors of cell proliferation may stimulate elastin expression [64,65]. Moreover this proliferation may change in atherosclerosis. Elastin was found to be expressed maximally at the G₀ and minimally at the G₂/M phase, suggesting that its expression is regulated by the growth state [66]. NO, an endothelium-dependent relaxing factor, continuously produces NO synthetase in the endothelium. Endothelial dysfunction decreases NO release, resulting in a shared process involving the pathogenesis of atherosclerosis and neointima formation after angioplasty. It has been demonstrated that NO inhibits SMC proliferation, while enhancing elastin expression [67]. Endothelin-1, a potent vasoconstrictor, has been isolated from cultured porcine aortic endothelial cells. Endothelin-1 is known as a powerful stimulator of cell proliferation and of the development of arterial diseases such as atherosclerosis. It has been demonstrated that endothelin-1 stimulates cell proliferation and suppresses the elastin expression. The inhibition of elastin synthesis is completely prevented by an endothelin receptor A antagonist. Thus, endothelin-1 can modulate elastin mRNA expression *via* endothelin receptor A in cultured SMC, and regulators of elastin expression may play an important role in SMC proliferation during the development of atherosclerosis [68].

In vitro experiments have demonstrated that the extracellular matrix influences the morphology and metabolic properties of mesenchymal cells through chemical and physical effects. Fibronectin has been reported to accelerate the morphological modulation of SMC from the contractile state to a synthetic state [69] whereas laminin may have the opposite effect while helping to maintain the contractile state of SMC [48]. The relationship between growth factor and integrin signalling pathways in VSMCs has been analysed and the results show that integrin-signalling pathways have a profound effect on VSMC proliferation and phenotype and that focal adhesion kinase (FAK) is an important intermediate in

these signalling pathways [70]. Mechanical confinement by the extracellular matrix surrounding itself shows regulating effects on the activity of fibroblasts [71]. Thus, a cell might create an environment which then acts back on the cell itself and perhaps also on its neighbours. Aortic SMC from several species have been shown to produce and accumulate significant amounts of extracellular collagen and elastin when grown in culture (for review see Franzblau & Faris 1982, [72]). It is well known that cultured SMC proliferate in response to a variety of growth factors, including epidermal growth factor (EGF) [73], platelet-derived growth factor (PDGF) [74] and fibroblast growth factor (FGF) [75]. PDGF alone stimulates SMC migration, whereas proliferation of SMC requires additional growth factors [74]. The interactions of growth factors and ECM may also play an important role in the response of SMC to injury and subsequent vessel reconstruction. *In vitro* studies have shown that SMC proliferation is modulated in the presence of ECM. Thrombospondin, a glycoprotein component of the ECM, acts synergistically with EGF to stimulate SMC proliferation, an effect which is inhibited by heparin [76]. Heparin also inhibits SMC migration [77]. Heparin and related compounds can inhibit cell proliferation [78] by maintaining cells in the G₁ phase [79]. Heparin can also modulate the biosynthetic phenotype of SMC, particularly the biosynthesis of collagens [80].

In an effort to ascertain the mutual interaction between changing functional properties of SMC and changing composition of the ECM during pathogenesis of atherosclerosis the behaviour of vascular SMC has been studied in different collagen matrix. The advantage of the three-dimensional culture system is that it more closely simulates the *in vivo* environment than two-dimensional cultures [81-83]. Cultivation of SMC within a collagen lattice results in the suppression of cell proliferation and reduction of collagen synthesis as well as total protein synthesis, although cells exist in the synthetic state as cytoplasm is filled by organelles such as endoplasmic reticulum, Golgi complex, and abundant mitochondria [84]. This suggests that synthetic state SMC can exhibit differential biosynthetic activity dependent on the actual matrix environment. In fact, the structure and composition of the extracellular matrix has been shown to have a significant influence on the proliferation, differentiation, and phenotypic expression of cells [85]. Under conditions of hypertension, arterial SMC appear to respond to the increases in wall tension by increasing elastin and collagen synthesis [86,87]. The accumulation of these matrix fibres in the artery wall has been shown to bear a linear relationship to tangential tension. Aortic SMC in tissue culture respond to increased tension both by proliferation and by increased matrix synthesis. Elastin growth substrate increases cholesteryl ester synthesis and induces foam-cell formation by smooth muscle cells in culture [88]. Since elastin binds lipids in arteries [88], it is likely that a similar lipid-elastin binding occurs *in vitro* and that the uptake of hyperlipemic LDL is bound to elastin [89]. On the other hand, 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors reportedly suppress SMC growth and arterial neo-intimal thickening;

that is, lovastatin and simvastatin predominantly decrease the expression of the glycoprotein thrombospondin-1, which is functionally associated with SMC migration and proliferation. By contrast, expression of plaque-stabilization, extracellular proteins such as collagen type I and biglycan are much less affected [89]. Another example is that fibronectin and type I collagen were significantly decreased by the transcription factor NK-104 [90]. In addition, vascular statins act directly on the blood-vessel walls to stabilize plaques already formed [91].

The extracellular matrix surrounding VSMCs is also considered a cell-cycle control element in atherosclerosis [92]. Infection of the aorta with adenoviruses encoding a constitutively active mutant of the retinoblastoma protein (pRb) leads to a dramatic prevention of SMC intimal lesion after balloon injury [93]. These results demonstrate that VSMCs proliferation, as in most cell types, is controlled by phosphorylation of pRb and pRb is phosphorylated by the G1 phase cyclin-dependent kinases (cdks) [93]. These enzymes are typically expressed constitutively, but they are inactive in the absence of their cyclin partners. It now seems that mitogenic growth factors and the ECM are required for cell proliferation because they allow for G1 phase induction of cyclin D-cdk 4/6 and cyclin E-cdk2 kinase activities and the matrix is further required for translation of the mRNA [92]. The selective inhibition of ECM, presumably by blocking the integrin-signalling cascade that the ECM controls, would therefore be one means of inhibiting both Rb phosphorylation and VSMC proliferation. Cyclin D1 is considered an attractive target because its expression is ECM-dependent and it (together with cdk 4/6) plays an essential role in pRb phosphorylation [92]. Moreover integrins are involved in maintaining active ERK (subfamily of MAP kinase) in G1 phase, it has been suggested that integrin-dependent activation of MAP kinase (mitogen activated protein kinase) may play an important role in the adhesion-dependent expression of cyclin D1 and phosphorylation of pRb in VSMCs. Also, change in the nature of the VSMC extracellular matrix and/or integrins that are expressed by VSMCs may therefore affect MAP kinase activity, cyclin D1 expression, pRb phosphorylation and, ultimately, cell proliferation [92].

Vascular SMC Proliferation and Apoptosis

The fact that SMC proliferation is a key feature of atherosclerotic plaque formation suggests reduced apoptosis (programmed cell death) in the diseased tissue. In fact, atherosclerosis is a disease of cell proliferation and cell death. When vessels remodel under either physiological or pathological conditions, apoptosis and cell proliferation are intimately coupled. However, vascular atrophy in aneurysm formation is accompanied by excessive apoptosis. Thus, too little or too much apoptosis within the vessel wall may be deleterious [94]. The normal adult artery shows very low levels of SMC turnover and hence low apoptotic and mitotic indices [95]. In SMC from diseased tissue, additional factors are present, both locally, such as transcription factors and their co-regulators involved in the early stages of vascular diseases.

Vascular lesions arise in part from excessive accumulation of vascular smooth-muscle cells (VSMCs) in the intima attributed to increased migration and proliferation of VSMCs [96]. Apoptosis has been postulated to play a central part in plaque development [97]. There is now much evidence that VSMC apoptotic cell death occurs in the vasculature in both physiological as well as pathological contexts and that these deaths are regulated by proteins that serve either to induce or protect against apoptosis. This results in sensitivity to apoptosis that is determined by expression of cell-death receptors and ligands as well as by the presence and response to survival cytokines, mitogens, and local cell and matrix interactions [94]. Thus, growth arrest often triggers resistance to apoptosis in response to specific signals, and in some cases cells may undergo apoptosis at defined points in the cell cycle [98]. There is ample evidence suggesting that genes that act to regulate the cell cycle, when mutated also induce death or profound growth arrest [94]. Thus, exposure of VSMC to inflammatory cytokines and other cytokines such as platelet-derived growth factor and -FGF initiates a mitogenic signal within the VSMC, but if a survival signal is not present, the cells enter non-proliferation and apoptosis.

Apoptosis of macrophages is present mainly in regions showing signs of DNA synthesis or repair; however, SMC apoptosis is present primarily in less cellular regions not associated with DNA synthesis/repair [99]. Furthermore, SMC loss diminishes the biosynthesis of interstitial collagen fibres [100]. SMC can disappear in the plaque *via* apoptosis [101], drastically reducing the type I collagen synthesis and thereby greatly affecting plaque stability. Moreover, apoptotic SMC in the plaque, often not scavenged, could be the main source of the calcifying matrix vesicles [101], and these matrix vesicles could lead to plaque calcification. Apoptotic SMC can also increase the plaque thrombogenicity [102]. Thus, apoptosis of SMC in primary atherosclerosis plaque could be detrimental for plaque stability, thereby augmenting the risk for thrombosis [99].

The current knowledge of the occurrence of and mechanisms underlying VSMC apoptosis in atherosclerosis, arterial remodelling, and plaque rupture has been reviewed [103]. Apoptosis is regulated by the interaction between cell-surface signals, (death receptors and survival cytokines) and the expression of specific intracellular gene products: proto-oncogenes, tumour-suppressing genes and the Bcl-2 family of genes. The TNF-receptor (TNF-R), (tumour necrosis factor receptor) family of death receptors are type I membrane proteins, -TNF-R 1 (p55), Fas (CD95)- and death receptors (DR)-3, 4 (TRAIL R 1) and 5 (TRAIL R 2) that consist of an extracellular domain, a hydrophobic transmembrane domain, and a cytoplasmic domain, containing the death domain, a protein motif responsible for protein-protein interactions with adapter molecules. A ligand binding to a receptor recruits an adapter molecule, FADD (factor associated death domain) (to Fas), TRADD (TNF-R1 associated death domain) (to TNF-R1) or RIP (receptor interaction protein) (to both), to the receptor, which then activates a cascade of cysteine proteases (caspases), leading to cell death. Apoptosis is

also regulated by the expression of specific intracellular proteins such as the Bcl-2 family of proteins. Bcl-2 is a membrane protein which protects against the stimuli that induce apoptosis. Bcl-2 family members can homodimerise or heterodimerise with other family members, such as the proapoptotic proteins Bax, Bad or Bik, and the balance of expression between family-family members can cause predisposition to or provide protection against apoptosis. VSMCs express many of the known caspase family members required to execute apoptosis [104,105]. However, the importance of any particular pathway regulating apoptosis depends upon the cell type and the stimulus for apoptosis. Thus, different pathways may be responsible for inducing apoptosis in VSMCs at different stages of the disease [103].

There is good evidence that the phenotype of plaque VSMCs are senescent. Populations of plaque VSMC show increased hypophosphorylated pRb (the active form), which may account for their slow proliferation and senescence [94]. However, whenever these cells are stimulated to proliferate, for example by virus gene products or elongation factor-1 (E2F-1), cells undergo massive apoptosis, partly mediated by p53 [106]. However, p53 alone does not induce apoptosis in either normal human or rat VSMCs *in vitro* or *in vivo* unless the cells are primed to die [98] or massive expression is used *via* adenovirus vectors [107]. The role of p53 in atherosclerotic lesion development might be associated with its function in controlling cell replication, and p53-independent mechanisms can mediate the apoptotic response in atherosclerosis [108]. This indicates that the effect of p53 in VSMC biology in atherosclerosis may be growth arrest rather than the induction of apoptosis [109]. However, stabilisation of p53 may sensitise the cells to other apoptotic triggers such as Fas ligand. *In vivo*, plaque VSMCs show increased expression of p53 and p21, the cell-cycle inhibitor expressed upon stabilisation of p53. Moreover, cells which express p53 and p21 do not express proliferative markers such as ki67, suggesting that these cells are a non-proliferative, basal expression, and the activity of p53 in plaque and normal VSMCs is similar [98]. It is possible that a combination of profound growth arrest and lack of survival signals, complexed with proliferative stimuli generated by inflammatory cytokines or mitogens, may lead to the sensitisation of VSMC to apoptotic triggers [94].

REGULATION OF TARGET GENES INVOLVED IN THE TRANSFORMATION OF VSMC INTO FOAM CELLS

Regulation of Cholesterol Synthesis and Cellular Uptake

Because an important characteristic of the VSMC transformation into foam cell is the accumulation of cholesterol inside, it would be worthwhile to examine gene regulation of both cholesterol synthesis and cellular uptake. The metabolism of cholesterol is highly regulated, and a cholesterol-rich diet leads to high levels of cholesterol in liver cells, repressing the synthesis of receptors for low-density lipoprotein (LDL), thereby raising the concentration of cholesterol in the bloodstream. Joe Goldstein and Mike Brown have worked

for over 30 years on the molecular basis of cholesterol homeostasis. Through the systematic use of genetic, biochemistry, molecular biology and cell biology, they have identified a complex set of interacting molecules that work in coordination to regulate cholesterol import and synthesis [110]. Moreover, cholesterol, together with sphingomyelin, forms plasma membrane rafts or caveola, which are sites where signalling molecules are concentrated [111,112]. The important role that cholesterol play in modulating fluidity and phase transitions in the plasma membrane of animal cells is well known [113]. A review by Liscum and Underwood [114] reports works on cellular cholesterol distribution, membrane cholesterol domains, and the intracellular trafficking of cholesterol. Thus, cholesterol homeostasis is controlled by a feedback regulatory system that senses the level of cholesterol in cell membranes and modulates the transcription of gene-encoding enzymes of cholesterol biosynthesis and uptake from plasma lipoproteins. The enzymatic reactions necessary for the biosynthesis of cholesterol from acetate were studied long ago [115,116] Feed-back repression of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl Co A (HMG-CoA) reductase, the rate-limiting step in cholesterol and polyisoprenoid biosynthesis, has been reported with the earliest examples in mammals. Hepatic synthesis of cholesterol decreased when dogs were fed excess dietary cholesterol [117], while in chicken it has been demonstrated that the shunt pathway of mevalonate not leading to sterol is regulated by cholesterol feeding in a reverse fashion to the sterol pathway [118]. Cholesterol and its hydroxylated derivative, 25-hydroxycholesterol (25HC) inhibit cholesterol synthesis, the inhibitory actions of cholesterol require the 3-hydroxyl group and the 25HC is more potent than cholesterol [119]. Oxysterols can function as a feed-forward ligand that binds to and activates the nuclear hormone receptors LXR_a and LXR_b [120].

In a rat aortal SMC culture model –including contractile, synthetic, and transformed cells– it been shown that increased cholesterol biosynthesis associated with phenotypic changes [121] plus dedifferentiation in arterial SMC *in vitro* are associated with decreased intracellular cholesterol efflux and also a decrease in high-affinity binding sites for native high-density lipoprotein (HDL) [122]. A high-cholesterol diet not only decreases cholesterol synthesis but also leads to transformation of aortic SMC. A culture model of SMC, isolated from arteries of cholesterol-fed chicks (Ch-SMC) and from control-fed chicks (C-SMC), under the same culture conditions is suitable for the study of SMC transformation into foam cells *in vitro* induced by cholesterol diet *in vivo* and before to the plaque formation. Intracellular cholesterol concentrations is the same in C-SMC and Ch-SMC during the first 14 days of culture; however, Ch-SMC developed the characteristics of macrophage-like foam cells after 30 days in culture with identical maintenance as in the C-SMC culture [8]. A recent work describes a process of trans-differentiation of mouse aortic SMC to a macrophage-like foam-cell state after cholesterol loading *in vitro* [124]. The result of this work agree with the *in vivo/in vitro* transformation of SMC in chick after cholesterol-rich diets [8]. Other cell-culture models use different additional elements in the

culture to obtain foam cells *in vitro*, such as an elastin substrate [88] or lipid droplets isolated from cultured macrophages [123]; also water-soluble cholesterol:methyl- β -cyclodextrin complexes are used, as are cyclic polysaccharides that can enhance the solubility of hydrophobic compounds such as cholesterol [124]. In the chicken SMC *in vivo/in vitro* model, the two lines of SMC cultures C-SMC and Ch-SMC exhibit marked differences in their proliferation, as well as their DNA, RNA, and protein synthesis [8]. Lipid synthesis (especially cholesterol and the effects of inhibition on the first step in the cholesterol biosynthesis also show marked differences [125]. Moreover, young Ch-SMC and C-SMC cultures present alterations in HMG-CoA reductase activity and gene expression at the transcriptional level as soon as 4 h after feeding the cells, while the reductase mRNA concentration in Ch-SMC was almost 50% lower after feeding the cells for 8 h [126]. However, this increase of reductase mRNA concentration in senescent cultures was lower and showed small changes after feeding [126]. In the mouse SMC cholesterol-loaded model [124] evaluations have been made of the *in vitro* early phenotypic change at the molecular level as the cholesterol content of SMC increased, and at the protein and mRNA levels, the rapid phenotypic change was associated with a decline and rise, respectively, in the expression of SMC and macrophage-related genes. Furthermore, the change in protein and gene expression were associated with the acquisition of macrophage-like functional properties. Thus, the results for the *in vivo/in vitro* model of transformation of chicken aortic SMC [8] agree with the suggestion of the transdifferentiation SMC *in vitro* model [124], in the sense that foam cells of neointimal lesions identified as macrophages by immunostaining with macrophage markers could have a SMC origin.

Sterol Regulatory Element-Binding Proteins

The endocytic pathway involved in the cellular uptake of cholesterol LDL [127,128] has been identified and characterized, as has the subsequent repression of HMG-CoA reductase and cholesterol synthesis [127-129]. A major breakthrough for understanding the mechanism involved in feedback repression came when the gene encoding the LDL receptor was isolated, the promoter of this gene being shown to contain a 10-bp cis element that was named sterol regulatory element 1 (SRE-1) [127,129,130]. The activity of an LDL receptor promoter-reporter gene increased when the transfected cells were incubated in cholesterol-free medium but decreased when LDL or oxysterols were added to this lipid-poor medium [130]. Mutation of the SRE-1 motif resulted in a defective reporter gene that was not activated when cells were incubated in sterol-depleted medium [127,130]. Such studies eventually led to the purification and cloning of a family of transcription factors termed sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) that bind to the SRE-1 (or to one of the many variants) and activate transcription [127,129]. SREs function as conditional positive elements that are necessary for activated transcription in sterol-depleted cells. The SREs are not required for the basal transcription that occurs in cholesterol-loaded cells.

The SREBPs were identified by two groups working on cholesterol metabolism [131,132] and fat-cell differentiation [133]. Several reviews have been published on this topic [127,129, 134,135]. Studies have demonstrated that there are three major SREBP isoforms encoded by two different genes. The SREBPs must be released proteolytically from membranes to act [127]. A review that summarizes the progress in understanding the SREBPs and the sterol-regulated proteases that release them has been reported [136]. Three SREBPs has been demonstrated, two of the three major isoforms are produced from the SREBP-1 gene, which contains two promoters, transcription from each promoter produces an mRNA with a unique first exon that encodes one of the alternative amino termini referred to as 1a and 1c, respectively [138]. These alternate exons are attached during mRNA splicing to a common second exon in the same reading frame, and therefore the remaining protein-coding information of both isoforms is identical. There is alternative mRNA splicing at the 3'-end as well [139], but this does not appear to be conserved in all mammalian species and its functional significance remains unclear. By contrast, mRNAs produced through alternative promoter usage at the 5'-end yield proteins with significant differences in their capacity to activate gene expression [140]. The longer amino-terminal region in SREBP-1a contains a high percentage of acidic amino acids that make it a potent transcriptional activation domain. The SREBP-1c isoform is a much weaker activator of gene expression because it lacks 29 acidic amino acids present in 1a.

Different tissues express different ratios of SREBP-1a and 1-c. It is possible that the more active 1a isoform is preferentially expressed when there is a high demand for cholesterol and fatty acids such as when new membrane is required during periods of rapid cell division, suggesting that this transcription factor and their co-regulators are involved in the early stages of vascular diseases where there are a high SMC proliferation and before cholesterol-loaded cells appear. SREBP-1a stimulates gene expression *in vitro* and in cultured cells by interacting with the transcriptional co-activators CBP and P300 [141,142]. These are long, ubiquitous transcriptional co-activator proteins that are recruited to specific promoters through binding to activation domains of several DNA-binding transcription factors in addition to SREBPs [143]. In the cholesterol-biosynthesis pathway, well-defined target genes include HMG-CoA synthase, HMG-CoA reductase, farnesyl diphosphate synthase, squalene synthase [144]. The targets in the fatty acid and triglyceride biosynthetic pathways include acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase, stearoil-CoA desaturase, and glycerol-3-phosphate acyltransferase [127,144,145]. SREBP-2 were evaluated in porcine and human SMC and vascular wall from normolipid and hyperlipemic pigs. SREBP-2 gene expression was significantly decreased in the vascular wall of diet-induced hypercholesterolemic swine [146], this work suggesting the involvement of SREBP-2 in LDL-modulated expression of cholesterol biosynthesis enzymes in the vascular wall. Atherogenic levels of native LDL (nLDL) down-regulate vascular endothelial CYP51 mRNA levels through a

reduction in SRE-SREBP-2 interaction [147]. Additionally, SREBP-2 and CYP51 mRNA levels were decreased in the arterial wall of hypercholesterolemic pigs [147].

SREBP-1 and -2 have been studied mainly in rodents in which lipogenesis was regulated in both liver and adipose tissue. In birds, lipogenesis occurs essentially in the liver as in humans. Before the study the role of SREBP in lipid metabolism regulation in chicken, it is of interest to note the sequence of the cDNA, encoding the mature nuclear form of chicken SREBP-2 protein, mapped SREBP-1, and SREBP-2 [148]. The predicted chicken SREBP-2 amino acid sequence shows a 77 to 79 % identity with human, mouse, and hamster homologues, with nearly perfect conservation in all the important functional motifs, as in the human genome, SREBP-1 and SREBP-2 chicken genes are located on two separate chromosomes, respectively, microchromosome 14 and macrochromosome 1. Tissue-expression data show that SREBP-1 and SREBP-2 are expressed in a wide variety of chicken tissues [148]. In human it has been postulated that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the SREBP-2 gene might influence lipid parameters and the risk of coronary atherosclerosis [149]. A significant association was found between the 1784 G C polymorphism and intima-media thickness (IMT) measured in 497 subjects. Thus, a common variation in the SREBP-2 gene is related to early-stage carotid atherosclerosis in subjects with a cardiovascular risk without detectable change in plasma-lipid levels. A study was made of the insertion/deletion (Ins/Del) and XbaI polymorphisms of the apolipoprotein B (APOB) gene and the -36deIG polymorphism in the SREBP-1a gene in 298 patients with coronary artery disease (CAD) and 188 healthy control. A significant interaction between APOB and SREBP-1a polymorphisms was observed in the patient sample in total cholesterol (TC, $p=0.005$) and in LDL-C ($p=0.019$) levels [150]. By a search for mutation or polymorphisms within the sequences of the SREBP-1a gene critical for the synthesis and/or activity of the protein in 204 asymptomatic men, a single G deletion at base pair -36 of the translation initiation site (designated G-) was found using single-strand conformation polymorphism (SSCP) [151]. This new marker has been assessed for its influence on the lipid parameters of 812 men at high cardiovascular risk, and on the presence of echographic atherosclerotic plaque in their peripheral arteries [151].

The SREBPs also enhance transcription of the LDL receptor, which mediates cholesterol uptake from plasma lipoproteins. Over-expression of the NH₂-terminal nuclear domains of SREBPs also elevates mRNAs, encoding many others enzymes required for lipids synthesis, including enzymes that generate acetyl CoA and reduced pyridine nucleotides [152]. When sterols build up within cells, the proteolytic release of SREBPs from membranes is blocked. The NH₂-terminal domains that have already entered the nucleus are rapidly degraded in a process that is blocked by proteasome inhibitors [153], the consequence being that the transcription of all of the targets genes declines. This decline is complete for the cholesterol biosynthetic enzymes, the tran-

scription of which depends entirely on SREBPs. The decline is less complete for the fatty acid biosynthetic enzymes for which the basal transcription can be maintained by other factors [154]. To enhance transcription of the gene-encoding enzymes of cholesterol and fatty acid biosynthesis, the active NH₂-terminal domains of SREBPs cleavage by site-1 protease (S1P) and site-2 protease (S2P). Sterols block the proteolytic release process, inhibiting cleavage by S1P directly and S2P indirectly. Site-1 cleavage is regulated by a SREBP cleavage-activating protein (SCAP), a regulatory protein that activates S1P and also serves as a sterol sensor, losing its activity when sterols over-accumulate in cells. These regulated proteolytic cleavage reactions are ultimately responsible for controlling the level of cholesterol in membranes, cells, and blood [136].

SREBP Cleavage-Activating Protein

SCAP is an integral membrane protein and the target for sterol suppression of S1P cleavage. Sterols normally suppress S1P activity by interacting with SCAP [137]. Transport of the SCAP/SREBP complex from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi is the central event mediating the cholesterol-feedback process in mammalian cells. Integrin activation and fluid shear stress can modulate the activity of SREBPs in vascular endothelial cells. Mechanistically, the transport of SCAP from the endoplasmic reticulum to the Golgi body requires the actin-based cytoskeleton [155]. An insulin-induced gene (INSIG) retention protein were identified as ER resident proteins that bind the SCAP/SREBP complex and promote its ER retention when cells are treated with sterols [156]. A conformational change in SCAP is a crucial step when cholesterol levels are high; the conformation of SCAP enables the SCAP-SREBP complex to associate with the INSIG-retention protein in the ER when cells are treated with sterols [157]. By contrast, when cholesterol levels are low, SCAP switches to a conformation that enables dissociation of the retention protein and the association of SCAP-SREBP with COPII vesicles [157]. The enhancement of the SREBP-mediated cholesterol metabolism may contribute to vascular endothelial cell functions under flow and probably the SMC transformation in the early stages of atheromatose plaque formation.

Sterol-resistance mutations of SCAP fall within a 160-aa segment, which comprises five of the eight membrane-spanning sequences of SCAP, termed the sterol-sensing domain. A similar stretch of five membrane-spanning sequences has been identified in three other proteins, each of which is influenced by cholesterol [158]. A sterol-sensing domain is found in the membrane-attachment region of the ER enzyme, HMG-CoA reductase [159]. This domain is responsible for the enhanced degradation of HMG-CoA reductase that occurs when oxysterols are added to the cell [160,161]. After the second cleavage of SREBPs, the mature proteins enter the nucleus, bind to SREs in the promoters of target genes, and activate transcription. However, such activation requires additional transcription factors. Activated genes identified to date include many that are involved in the control of cholesterol synthesis, LDL uptake, fatty acid syn-

thesis and desaturation, triglyceride synthesis, and glucose metabolism. Indeed, the list of SREBP target genes is rapidly growing. The nucleotide sequence that comprises a functional SRE can vary enormously, making it difficult to assign a consensus sequence that can be used to identify SREs [134].

Therapeutic Strategies Via SREBP

A recent study identified a new class of compounds designated as SCAP ligands, which presumably bind to SCAP, leading to increased LDL-receptor (LDLR) expression. The effects of SCAP ligand GW707 in comparison with lovastatin and cytokine oncostatin M (OM) on the regulation of LDLR, provide the first evidence that higher levels of LDLR expression and function can be achieved through simultaneous stimulation of the SREBP-dependent pathways, suggesting a strategy to develop an adjunct therapeutic intervention utilizing both pathways [162]. The role of SREBP-2 on the influence of simvastatin on the antioxidant enzyme paraoxonase expression and serum of the paraoxonase levels has been reported [163]. Simvastatin upregulated the activity of the promoter of the paraoxonase gene, upregulation that could be blocked by mevalonate and other intermediates of the cholesterol biosynthetic pathway. Simvastatin increased SREBP-2 capable of binding to the paraoxonase. This is consistent with effects of simvastatin treatment, which have the potential of beneficially influencing anti-atherogenic mechanisms at the HDL level. The molecular mechanism of action of lowering cholesterol by statins is *via* SREBP activation. Although it is widely accepted that most clinical benefit gained with statins is a direct result of their lipid-lowering properties, there is still some debate as to whether statins contribute to the clinical outcome in vascular disease, or whether all the beneficial effects of statins are due simply to lipid-lowering. In fact, cholesterol-independent effects on various aspects of cardiovascular disease, including decreasing vascular inflammation and enhancing plaque stability has been reported [164]. Statins decrease the scavenger receptor CD40 expression and CD40-related activation of SMC, these effects being partially reversed by HMG-CoA reductase product L-mevalonate (MVA) and mediated by NO- or peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR)- dependent pathways [165]. The inhibition of MVA synthesis by statins and consequently the prenylated-protein products signalling –signalling molecules in the cellular cycle— slow down SMC proliferation. Thus, because the transcription factors SREBP are involved not only in the regulation of both cholesterol synthesis and cellular uptake but also in the molecular mechanism of action of statins, further studies are needed to understand the full impact of statins therapy on each of these processes and whether these effects contribute to clinical benefits/side effects of statins and therefore help in the search for new potential drug targets for treatment of coronary syndromes and strokes.

SMC Scavenger Receptors

Another potential pharmacologic target is the metabolism of free-radical-mediated modification of low-density lipopro-

tein (LDL) to led highly oxidized lipoproteins. Oxidized low-density lipoproteins (ox LDL) play a role in atherogenesis [166] and induce a wide range of biological effects on SMC. Ox-LDL induces dramatic alterations in gene expression in aortic SMC. With the use of two commercial c-DNA microarray systems with a total of 35932 human genes, it has been demonstrated that ox-LDL elevates gene expression involved in cell-cell interactions, membrane transport, oncogenesis, apoptosis, and transcription; this decreases expression of genes responsible for protein and nucleic acid biosynthesis, lipid metabolism, and humoral responses [167]. In vascular smooth muscle, the same authors have identified transcripts for metastasis-related proteins (MB2) and SREC-II (a novel scavenger receptor), which have not previously been identified in vascular smooth muscle and which show a 12- and 3-fold increase in MB2 and SREC-II expression in response to ox-LDL, respectively [167].

Oxidative modification of LDL alters its structure allowing LDL to be taken by scavenger receptors. Scavenger receptor, a non-regulated receptor, recognizes the highly modified forms of LDL and is the responsible for the rapid lipoprotein uptake by intimal macrophages [168, 169, 170, 171]. SMC can also express the scavenger receptors, providing an additional link between oxidized lipoproteins and the formation of SMC-derived foam cells during atherogenesis [172]. The expression of the scavenger receptors SR-AI/II (acetyl low density lipoprotein receptor) [172], CD36 (macrophage scavenger receptor) [173], and LOX-1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor) in SMC has described [174]. Furthermore, the expression of scavenger receptor including SR-PSOX (scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized lipoprotein) in SMC-derived foam cells during atherogenesis and the influence of cytokines on the expression of SR-POX in SMC has been reported [175]. In human SMC, SR-PSOX is more strongly expressed than LOX-1 and SR-AI/II [176]. Moreover, SR-PSOX is governed by pathways other than those reported for SR-AI/II, which is stimulated by TNF- α , (tumour necrosis factor) IL-1 (interleukin 1) and IFN- γ (interferon γ) [177,178] and for LOX-1, which is stimulated by TNF- α [179]. In SMC debate persists as to whether SR-PSOX is more strongly expressed than LOX-1 [176] or whether SR-PSOX is undetectable and LOX-1 expression is prominent [180]. Although the techniques used were reverse transcriptase-PCR and immunohistochemical studies, respectively, on the other hand, the different stages of the atherosclerotic lesions from which the SMC were identified or the number of passages or the confluency of the SMC cultures could change the results.

The LOX-1 receptor and oxidized LDL induce apoptosis in SMC [181,182]. The role of the LOX-1 receptor and its soluble forms in atherogenesis have been reviewed [182]. LOX-1 is a type II membrane protein belonging to the lectin family of molecules, which can act as a cell-surface endocytosis receptor for atherogenic oxidized LDL. LOX-1 is initially synthesised as a precursor protein with an N-linked high mannose-type carbohydrate, which is further glycosy-

lated and processed into a mature form. LOX-1 expression is not constitutive, but can be induced by pro-inflammatory stimuli, such as tumour necrosis-factor alpha, transforming growth-factor beta and bacterial endotoxin, as well as angiotensin II, oxidized LDL itself and fluid shear stress. LOX-1 expression is detectable in cultured macrophages and activated vascular SMCs. *In vivo*, endothelial cells that cover early atherosclerotic lesions while intimal macrophages and SMCs in advanced atherosclerotic plaques can express LOX-1 [182]. LOX-1 and SR-PSOX may play important roles in atherogenesis and atherogenic plaque rupture. Moreover, LOX-1 can be cleaved, in part, and released as soluble molecules, suggesting the diagnostic significance of plasma soluble LOX-1 levels [182]. Exon 1b of CD36 promoter in human SMC is specifically transcribed in activated aortic SMC and expressed mainly in atherosclerotic plaques [183]. These authors suggest that switching to exon-1b transcription may be an important step for the activation of SMC and their conversion to foam cells, as well as the possibility of a novel anti-atherosclerotic therapy and the use of exon 1b as a marker of atherosclerosis. The human scavenger receptor BI (hSR-BI/CLA-1) has been identified as a receptor for human high-density lipoprotein (HDL) and may be expressed in human SMC [184]. Moreover, it may be modulated by the cytokine interferon-gamma (IFN-gamma), IFN-gamma inhibited the hSR-BI/CLA-1 protein expression, but not mRNA expression. This observation confirmed that selective cholesterol ester uptake from HDL was inhibited by IFN-gamma. The protective effect of HDL is thought to involve the reverse transport of cholesterol from cells in the arterial wall to the liver for disposal, as hSR-BI/CLA-1 bind HDL and mediate the selective uptake of HDL lipids, this scavenger receptor could be important in atherogenesis.

NUTRITIONAL CONTROL AND GENE REGULATION

Many clinical trials have demonstrated the benefit of lipid-lowering for the prevention of coronary heart disease. The intervention studies have shown that some hypolipidaemic and hypotensive drugs such as fibrates, HMG-CoA reductase inhibitors, angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and Ca-antagonists prevent atherosclerosis. The effects of these drugs on the arterial wall have very recently been reviewed [185]. Statin therapy low LDL-cholesterol and its consequences, including plaque stabilization, decrease the inflammatory process, slow the progression of plaque, and exert anti-thrombotic effects. However, the evaluation of statin effects has given conflicting results [186]. By inhibiting L-mevalonic acid synthesis, statins also prevent the prenylation of small-GTP-binding proteins such as Rho and Ras. In animal and *in vitro* models, the inhibition of Rho with statins depresses PPAR alpha activation and HDL production, diminishes Ca²⁺ stores in VSMC and stimulates VSMC apoptosis. However, most of these effects resulted from high statin concentrations, further evidence is needed for a full assessment of the clinical importance of isoprenylation blockage with therapeutic concentrations of statins [186].

The recognition that the regulation of cholesterol metabolism is linked with that of other metabolic pathways opens new perspectives for intervention at the nutritional-control level. A review by Gibbons [187], which includes the roles of the SREBP, LXR alpha, and PPAR in the coordination of cholesterol and fatty acid synthesis, describes how some of the results can best be interpreted by analysing the metabolic regulation of the pathway carbon fluxes. In fact, the regulation of SREBP gene expression in response to diet is a new area of investigation for metabolic control and lipid-lowering. Thus, in response to dietary intake, the SREBP gene regulation depends on changes in the levels of oxysterols, insulin/glucose, and polyunsaturated fatty acids (PUFAs). These transcription factors have been defined as key regulators of nutritional homeostasis and have important clinical implications relevant to hyperlipidaemia, diabetes and atherosclerosis. Two reviews examine the links between insulin resistance, PUFAs and SREBPs, with cholesterol, fatty acids, and glucose homeostasis [134,138].

It is known that a high-carbohydrate low-fat diet induces the expression of several lipogenic and glycolytic enzymes [188] and that these changes in gene expression are a consequence of the activation of SREBP-1c mRNA dependent on insulin [189]. However, the induction of mRNA for fatty acid synthase (FAS) requires an addition of insulin and a high level of glucose. SREBP-1c mRNA expression was activated during a fasting/refeeding regimen in normal animals [174,190]. A liver-specific transcript of INSIG-2 (insulin-induced gene 2) designated INSIG-2a, has been discovered [191], this transcript differing from the ubiquitous INSIG-2b in the use of different promoters. Although the INSIG-2a and -2b mRNAs encode identical proteins, they differ in regulation patterns. INSIG-2a is the predominant transcript in livers of fed animals, and it is selectively down-regulated by insulin; that is, INSIG-2a mRNA increases when mice are starved, and declines when they are re-fed [191].

As described above, SREBPs are involved in both lipogenesis and cholesterol homeostasis. The addition of excess cholesterol resulted in the inhibition of processing for membrane-bound precursors of both SREBP-1 and SREBP-2 [180,181]. Recently it has been demonstrated that the SREBP-2 gene is regulated by thyroid hormones and that increased nuclear SREBP-2 in hypothyroid animals results in the thyroid hormone-independent activation of LDL receptor-gene expression and in the reversal of the associated hypercholesterolaemia [192], this occurs without effects on other thyroid hormone-regulated genes. These authors propose that the decreased LDL receptor and increased serum cholesterol associated with hypothyroidism are secondary to the thyroid hormone effects on SREBP-2 and suggest that hypercholesterolaemia associated with hypothyroidism can be reversed by agents that directly increase SREBP-2 and that mutations or drugs that lower SREBP-2 would cause hypercholesterolaemia [192]. In animal-feeding studies the addition of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) or fish oil to diets results in a significant suppression of the mRNA en-

coding the SREBP-1 genes [193-195]. Moreover, dietary PUFAs repress the cleavage of SREBP-1, but have no effect on SREBP-2 cleavage [196]. These results, indicate that when diet is supplemented with PUFAs or fish oil, a decline results in the mRNAs encoding the SREBP-1c gene and consequently the gene expression of lipogenic and glycolytic enzymes declines, the opposite results from those found with a high carbohydrate/low fat diet. These results agree with earlier studies in cultured cells, reviewed by Edwards *et al.* [134].

Plasma-cholesterol and -triacylglycerol levels increased in the duodenum of hamsters fed palm oil and decreased in animals ingested fish oil [197]. In the intestine, dietary PUFA suppressed SREBP-1c mRNA without altering the expression of its targets genes, fatty acid synthase, acetyl-CoA carboxylase, or ATP citrate lyase, however, fatty acid influx depresses intestinal fatty synthesis by a posttranscriptional mechanism independent of the SREBP pathway [197]. Elevated cholesterol found in human fibroblast, incubated with various natural sphingolipids (SLs), was derived primarily for LDL and resulted from up-regulation of LDL receptors induced by the cleavage of SREBP-1 [198]. These authors suggest a model in which excess SLs present in endocytic compartments serve as a "molecular trap" for cholesterol, leading to a reduction in cholesterol in the endoplasmic reticulum, induction of SREBP-1 cleavage, and up-regulation of LDL receptors. As noted above, the addition of excess cholesterol or PUFAs in experiments performed both in animals and in cultured cells resulted in the inhibition of processing for membrane-bound precursor forms of SREBP-1 and -2 or only SREBP-1. However, how SREBPs expression and activity are modulated by insulin signalling and dietary changes, and moreover, how SREBPs could be considered key regulators of nutritional control that could lead the transformation of SMC into foam cells are important topic that requires further studies and could be considered news targets for diagnostic and therapeutic of cardiovascular diseases.

Certain eicosanoids, such as PGI₁ and PGE₂, appear to maintain the endothelium in a quiescent state, characterized by a non-adhesive, non-thrombotic surface. They also appear to participate in maintaining SMC in a contractile state and to influence cholesterol metabolism in macrophages as well as SMC. However, leukotrienes, such as LTB₄ and LTC₄, appear to have proatherogenic effects. The influx of macrophages which express glucocorticoids regulated prostaglandin synthase and nitric oxide synthase, is likely to alter homeostatic process mediated by eicosanoids and NO. Studies with an inhibitor of thromboxane A₂ (TXA₂) synthesis resulting in a shift in metabolism from TXA₂ to PGE₂, suppressed lesion development in hypercholesterolaemic rabbits [199]. Endothelium-dependent relaxation, mediated by NO, is impaired in atherosclerotic arteries, and NO has an anti-proliferative effect on SMC in culture. Strong evidence for the importance of NO in atherogenesis was provided by a study showing that dietary supplementation of L-arginine, the substrate for synthesis of nitric oxide, reduce both the size and thickness of aortic lesions in cholesterol-fed rabbits

[200]. Advanced glycosylation end-products, associated with diabetes, block the cytostatic effect of NO on SMC, providing a link between diabetes and heart disease [201].

On the other hand, PUFAs and prostaglandin (PG) regulate the activities of PPAR. PPAR are nuclear receptors acting as transcription factors of numerous target genes after heterodimerization with the retinoid X receptor. Three types of PPAR have been identified: PPAR-alpha, PPAR-beta/delta and PPAR-gamma. PPAR-alpha is mainly involved in fatty acid oxidation, and PPAR-gamma is involved principally in fat-cell differentiation and insulin sensitivity, both expressed in VSMC. Activators of PPAR-alpha, such as fatty acids and fibrates as well as PPAR-gamma such as thiazolidinediones (TZDs) have been shown to exert antiproliferative effects, antagonize angiotensin II actions, and exert antioxidant activity by inhibiting the generation of reactive oxygen species [202]. TZDs (widely used as insulin-sensitising agents for the treatment of type 2 diabetes) induce caspase-mediated apoptosis in VSMC [203].

PPARs are involved in the regulation of the lipids metabolism in the vasculature, and inhibits VSMC migration and proliferation while affecting foam-cell formation by changing the expression of scavenger receptors [204]. A recent review [205] presented structure and tissue distribution of PPAR nuclear receptors and discussed the action and regulation mechanisms as well as its impact on the cardiovascular system, especially in insulin-resistance syndrome (syndrome X) including obesity, diabetes, hypertension, and dislipidaemia. Expression of PPARs may be involved not only in the progression of atherosclerosis but also in regression. PPAR-gamma and dual PPAR-alpha/gamma agonist improve insulin resistance and its dyslipidaemia, both in rodent and in man [205]. In VSMC can partially reverse possible atherogenic changes in the production of matrix proteoglycans induced by exposure to non-esterified fatty acids (NEFA) [206]. Transforming-growth-factor beta (TGF beta) can regulate PPAR gamma expression. TGF beta 1 and 2 exert a biphasic effect (early stimulation and late repression) on PPAR-gamma gene expression in VSMC. TGF beta rapidly and transiently induces early expression of growth-response factor-1 (Egr-1) through the mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase 1 (MEK 1)/ ERK-mediate pathway [207]. With regard to the TGF beta repression of PPAR-gamma expression, activator protein 1 (AP 1) dramatically inhibits the PPAR-gamma promoter activity [207].

Although PPAR-gamma ligands attenuate the increase in intima-media thickness in diabetic patients, although long-term effects remain to be seen. Recently, it has been reported that PPAR-gamma activators such as 15-deoxy-Delta (12,14) prostaglandin J₂ (15-d-PGJ₂) and TZDs activate extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathway through phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) and induce proliferation of VSMCs. It was shown that 15-d-PGJ₂ and TZDs activate the PI3-K / ERK pathway through Src family kinase and matrix metalloproteinase-dependent transactivation of EGF-R and PDGF-R. Both receptors appear to be associated

constitutively [208]. Activators of PPARs may become useful therapeutic agents in the prevention of cardiovascular disease in the prevention of carbohydrate and lipid metabolism. Some side effects such as weight gain as well as documented aggravation of advanced heart failure through fluid retention may, however, limit their therapeutic application in cardiovascular prevention [209].

With the increased understanding of the molecular and cellular interactions underlying atherosclerosis at the levels of the artery wall, new potential targets for pharmacological and nutritional intervention have been revealed. In particular, a large body of evidence implicates: extracellular matrix and cytoskeleton proteins, proliferation and apoptosis of SMC, as well as regulation of gene expression related to cholesterol uptake and metabolism leading to the transformation of SMC into foam cells. All this illustrates the complexity of pharmacologic intervention in atherosclerosis. There are promising strategies for inhibiting SMC dedifferentiation, proliferation, apoptosis, ECM synthesis and SREBP regulation modifying gene expression in the artery wall, not only to prevent the atheromatous plaque development but also to maintain the stability of the plaque in later atherosclerosis. Despite the complexity of the interactions in atherosclerosis, there are many opportunities to affect the homeostatic balance of the artery wall at SMC levels. We have considered here some of the possible targets for intervention with promising strategies for the nutritional control of the genes, and, in a general way, the possibilities for modulating the expression of genes influencing atherosclerosis.

ABBREVIATIONS

ACE	=	Angiotensin converting enzyme	FADD	=	factor associated death domain
ACS	=	Acute coronary syndrome	FAS	=	Fatty acid synthase
AEC	=	Angiotensin converting enzyme	FGF	=	Fibroblast growth factor
AP-1	=	Activator protein 1	25HC	=	25 hydroxycholesterol
APOB	=	Apolipoprotein B	HDL	=	High density lipoprotein
CAD	=	Coronary artery disease	HMG-CoA	=	3-Hydroxy 3-methyl glutaryl Co A
Cdks	=	Cyclin-dependent kinases	hSR-BI	=	Human scavenger receptor BI
Ch-SMC	=	SMC isolated from arterial of cholesterol fed chicks	IFN	=	Interferon
CXCL16	=	membrane-anchored chemokine directed to CXCR6-positive lymphocytes	IL-1	=	interleukina 1 α
C-SMC	=	SMC isolated from arterial of control fed chicks	IMT	=	Intima-media thickness
DR	=	Death receptors	INSIG	=	Insulin-induced gene
ECM	=	Extracellular matrix	LDL	=	Low density lipoprotein
E2F-1	=	Elongation factor-1	LDLR	=	LDL receptor
EGF	=	Epidermal growth factor	LOX-1	=	Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor
ER	=	Endoplasmic reticulum	LTB4	=	Leukotriene B4
ERK	=	Extracellular signal-regulated kinase 1	LTC4	=	Leukotriene C4
			LXR _a	=	Liver receptor X (nuclear hormone receptor)
			MAP	=	mitogen activated protein
			MB2	=	Metastasis-related protein
			MEK-1	=	Mitogen-activated protein kinase
			MMP2	=	Matrix metalloproteinase-2
			-MN	=	no muscle cytoskeletal protein
			MVA	=	Mevalonate
			NEFA	=	Non-esterified fatty acids
			NK-104	=	transcription factor
			nLDL	=	Native LDL
			ox-LDL	=	Oxidized low density lipoproteins
			OM	=	Oncostatin M cytokine
			PDGF	=	Platelet derived growth factor
			PG	=	Prostaglandin
			PGI1	=	Prostaglandin I1
			PGE2	=	Prostaglandin E2
			PI3-K	=	Phosphatidylinositol 3-kinase
			PPAR	=	Proliferators-activated receptor
			PRb	=	Retinoblastoma protein
			PUFAs	=	Polyunsaturated fatty acids
			TRADD	=	Receptor interaction protein
			SCAP	=	SREBP cleavage-activating protein

SIP	= Site-1 protease
SLs	= Sphingolipids
SMC	= Smooth muscle cells
SNPs	= Single nucleotide polymorphism
SR-AI/II	= Acetyl low density lipoprotein receptor
SRE-1	= Sterol regulatory element 1
SREBP	= Sterol regulatory element binding protein
SREC-II	= Scavenger receptor -II
SR-PSOX	= Scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized lipoprotein
SSCP	= single strand conformation polymorphism
TGF	= Transforming growth factor beta
THP-1	= macrophages
TNF-	= Tumour necrosis factor alpha
TRADD	= TNF-R1 associated death domain.
TSP-1	= Trombosponding-1
TXA2	= Thromboxane A2
TZDs	= Thiazolidinediones
VEC	= Vascular endothelial cells
VSMC	= Vascular smooth muscle cell

ACKNOWLEDGEMENT

Research in our laboratory is supported in part by grant from Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Sanidad y Consumo, Subdirección General de Investigación Sanitaria (PI030829) and also from the Research grant from Junta de Andalucía (Group code CTS168), Spain.

REFERENCES

- Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, **1993**, 362(6423), 801-809.
- Owens, G. K., Kumar, M. S., Wamhoff, B. R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol. Rev.*, **2004**, 84(3), 767-801.
- Masuda, J., Ross, R. Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Fatty streak formation. *Arteriosclerosis*, **1990**, 10(2), 164-177.
- Masuda, J., Ross, R. Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis*, **1990**, 10(2), 178-187.
- Faggiotto, A., Ross, R., Harker, L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis*, **1984**, 4(4), 323-340.
- Mora, R., Lupu, F., Simionescu, N. Prelesional events in atherogenesis. Colocalization of apolipoprotein B, unesterified cholesterol and extracellular phospholipid liposomes in the aorta of hyperlipidemic rabbit. *Atherosclerosis*, **1987**, 67(2-3), 143-154.
- Tsukada, T., Rosenfeld, M., Ross, R., Gown, A. M. Immunocytochemical analysis of cellular components in atherosclerotic lesions. Use of monoclonal antibodies with the Watanabe and fat-fed rabbit. *Arteriosclerosis*, **1986**, 6(6), 601-613.
- Carazo, A., Alejandre, J., Diaz, R., Rios, A., Castillo, M., Linares, A. Changes in cultured arterial smooth muscle cells isolated from chicks upon cholesterol feeding. *Lipids*, **1998**, 33(2), 181-190.
- Davies, M. J., Woolf, N., Rowles, P. M., Pepper, J. Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Br. Heart J.*, **1988**, 60(6), 459-464.
- Majesky, M. W., Daemen, M. J., Schwartz, S. M. Alpha 1-adrenergic stimulation of platelet-derived growth factor A-chain gene expression in rat aorta. *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265(2), 1082-1088.
- Nilsson, J., von Euler, A. M., Dalsgaard, C. J. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature*, **1985**, 315(6014), 61-63.
- Moncada, S.; Higgs, E. A. *Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system*, Elsevier Science Pub. Co.: New York, **1990**.
- Sjolund, M., Hedin, U., Sejersen, T., Heldin, C. H., Thyberg, J. Arterial smooth muscle cells express platelet-derived growth factor (PDGF) A chain mRNA, secrete a PDGF-like mitogen, and bind exogenous PDGF in a phenotype- and growth state-dependent manner. *J. Cell. Biol.*, **1988**, 106(2), 403-413.
- Campbell, J. H., Campbell, G. R. The role of smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, **1994**, 5(5), 323-330.
- Chamley-Campbell, J., Campbell, G. R., Ross, R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol. Rev.*, **1979**, 59(1), 1-61.
- Bochaton-Piallat, M. L., Ropraz, P., Gabbiani, F., Gabbiani, G. Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones. Implications for the development of experimental intimal thickening. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **1996**, 16(6), 815-820.
- Perez-Reyes, N., Halbert, C. L., Smith, P. P., Benditt, E. P., McDougall, J. K. Immortalization of primary human smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89(4), 1224-1228.
- Dusserre, E., Bourdillon, M. C., Ciavatti, M., Covacho, C., Renaud, S. Lipid biosynthesis in cultured arterial smooth muscle cells is related to their phenotype. *Lipids*, **1993**, 28(7), 589-592.
- Frid, M. G., Moiseeva, E. P., Stenmark, K. R. Multiple phenotypically distinct smooth muscle cell populations exist in the adult and developing bovine pulmonary arterial media *in vivo*. *Circ. Res.*, **1994**, 75(4), 669-681.
- Lau, H. K. Regulation of proteolytic enzymes and inhibitors in two smooth muscle cell phenotypes. *Cardiovasc. Res.*, **1999**, 43(4), 1049-1059.
- Worth, N. F., Rolfe, B. E., Song, J., Campbell, G. R. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **2001**, 49(3), 130-145.
- Huang, H., Kamm, R. D., So, P. T., Lee, R. T. Receptor-based differences in human aortic smooth muscle cell membrane stiffness. *Hypertension*, **2001**, 38(5), 1158-61.
- Hynes, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **1992**, 69(1), 11-25.
- Ruoslahti, E., Reed, J. C. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell*, **1994**, 77(4), 477-478.
- Ben-Ze'ev, A. Application of two-dimensional gel electrophoresis in the study of cytoskeletal protein regulation during growth activation and differentiation. *Electrophoresis*, **1990**, 11(3), 191-200.
- Campbell, G. R., Campbell, J. H., Manderson, J. A., Horrigan, S., Rennick, R. E. Arterial smooth muscle. A multifunctional mesenchymal cell. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **1988**, 112(10), 977-986.
- Mayne, R. In *Connective Tissue Disease: Molecular Pathology of the Extracellular Matrix*, Uitto, J.; Perejda, A.J., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, **1987**; pp.163-183.
- Hedin, U. Extracellular matrix components and integrins in the control of arterial smooth muscle cell structure and function. *J. Atheroscler. Thromb.*, **1994**, 1(Suppl. 1), S39-46.
- Hay, E. *Cell Biology of the Extracellular Matrix, 2nd Edition*. Plenum Press.: New York, **1983**.
- Hawkes, S., Wang, J. *The Extracellular Matrix*. Academic Press: New York, **1982**.
- Robert, L.; Labat-Robert, J.; Homebeck, W. In *Atherosclerosis Review*, Gotto, A. M.; Paoletti R., Eds.; Raven Press: New York, **1986**; pp. 143-170.
- Labat-Robert, J. In *Front Matrix Biology*, Labat-Robert, J. T. R.; Robert, L., Eds.; Karger: Basel, 1986; Vol. 11, pp. 17-29.
- Kleinman, H. K., Philp, D., Hoffman, M. P. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr. Op. Biotech.* **2003**, 14, 526-532.

- [34] Liao, J. K. Endothelium and acute coronary syndromes. *Clin. Chem.*, **1998**, *44*(8 Pt 2), 1799-1808.
- [35] MacIsaac, A. I., Thomas, J. D., Topol, E. J. Toward the quiescent coronary plaque. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **1993**, *22*(4), 1228-1241.
- [36] Harris, E. D., Krane, S. M. Collagenases (second of three parts). *N. Engl. J. Med.*, **1974**, *291*(12), 605-609.
- [37] Lee, T., Esemuede, N., Sumpio, B. E., Gahtan, V. Thrombospondin-1 induces matrix metalloproteinase-2 activation in vascular smooth muscle cells. *J. Vasc. Surg.*, **2003**, *38*(1), 147-154.
- [38] Ross, R. Rous-Whipple Award Lecture. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. *Am. J. Pathol.*, **1993**, *143*(4), 987-1002.
- [39] Mulvany, M. J., Baumbach, G. L., Aalkjaer, C., Heagerty, A. M., Korsgaard, N., Schiffrin, E. L., Heistad, D. D. Vascular remodeling. *Hypertension*, **1996**, *28*(3), 505-506.
- [40] Owens, G. K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.*, **1995**, *75*(3), 487-517.
- [41] Tan, E. M., Glassberg, E., Olsen, D. R., Noveral, J. P., Unger, G. A., Peltonen, J., Chu, M. L., Levine, E., Sollberg, S. Extracellular matrix gene expression by human endothelial and smooth muscle cells. *Matrix*, **1991**, *11*(6), 380-387.
- [42] Turley, E. A. Extracellular matrix remodeling: multiple paradigms in vascular disease. *Circ. Res.*, **2001**, *88*(1), 2-4.
- [43] Chaponnier, C., Kocher, O., Gabbiani, G. Modulation of gelsolin content in rat aortic smooth muscle cells during development, experimental intimal thickening and culture. An immunohistochemical and biochemical study. *Eur. J. Biochem.*, **1990**, *190*(3), 559-565.
- [44] Asundi, V., Cowan, K., Matzura, D., Wagner, W., Dreher, K. L. Characterization of extracellular matrix proteoglycan transcripts expressed by vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Cell Biol.*, **1990**, *52*(1), 98-104.
- [45] Dreher, K. L., Asundi, V., Matzura, D., Cowan, K. Vascular smooth muscle biglycan represents a highly conserved proteoglycan within the arterial wall. *Eur. J. Cell Biol.*, **1990**, *53*(2), 296-304.
- [46] Wight, T. N., Ross, R. Proteoglycans in primate arteries. I. Ultrastructural localization and distribution in the intima. *J. Cell Biol.*, **1975**, *67*(3), 660-674.
- [47] Ross, R., Klebanoff, S. J. The smooth muscle cell. I. *In vivo* synthesis of connective tissue proteins. *J. Cell Biol.*, **1971**, *50*(1), 159-171.
- [48] Burke, J. M., Balian, G., Ross, R., Bornstein, P. Synthesis of types I and III procollagen and collagen by monkey aortic smooth muscle cells *in vitro*. *Biochemistry*, **1977**, *16*(14), 3243-3249.
- [49] Layman, D. L., Epstein, E. H., Dodson, R. F., Titus, J. L. Biosynthesis of type I and III collagens by cultured smooth muscle cells from human aorta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, *74*(2), 671-675.
- [50] Cavalot, F., Anfossi, G., Russo, I., Mularoni, E., Massucco, P., Mattiello, L., Burzacca, S., Hahn, A. W., Trovati, M. Nonenzymatic glycation of fibronectin impairs adhesive and proliferative properties of human vascular smooth muscle cells. *Metabolism*, **1996**, *45*(3), 285-292.
- [51] Hinek, A., Botney, M. D., Mecham, R. P., Parks, W. C. Inhibition of tropoelastin expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Connect. Tissue Res.*, **1991**, *26*(3), 155-166.
- [52] Zern, M. A., Schwartz, E., Giambone, M. A., Blumenfeld, O. O. Ascorbate-generated endogenous extracellular matrix affects cell protein synthesis in calf aortic smooth muscle cells. *Exp. Cell Res.*, **1985**, *160*(2), 307-318.
- [53] Figueroa, J. E., Oubre, J., Vijayagopal, P. Modulation of vascular smooth muscle cells proteoglycan synthesis by the extracellular matrix. *J. Cell Physiol.*, **2004**, *198*(2), 302-309.
- [54] Meyers, C. D., Tannock, L. R., Wight, T. N., Chait, A. Statin-exposed vascular smooth muscle cells secrete proteoglycans with decreased binding affinity for LDL. *J. Lipid Res.*, **2003**, *44*(11), 2152-2160.
- [55] Corda, S., Samuel, J.L., Rappaport, L. Extracellular matrix and growth factor during heart growth. *Heart F. Rev.*, **2000**, *5*, 119-130.
- [56] Campbell, G. R., Campbell, J. H. Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp. Mol. Pathol.*, **1985**, *42*(2), 139-162.
- [57] Chamley-Campbell, J. H., Campbell, G. R., Ross, R. Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. *J. Cell Biol.*, **1981**, *89*(2), 379-383.
- [58] Seyama, Y., Wachi, H. Atherosclerosis and Matrix Dystrophy. *J. Atheroscler. Thromb.* **2004**, *11*, 236-245.
- [59] Thyberg, J., Nilsson, J., Palmberg, L., Sjolund, M. Adult human arterial smooth muscle cells in primary culture. Modulation from contractile to synthetic phenotype. *Cell Tissue Res.*, **1985**, *239*(1), 69-74.
- [60] McCullagh, K. A., Balian, G. Collagen characterisation and cell transformation in human atherosclerosis. *Nature*, **1975**, *258*(5530), 73-75.
- [61] Murata, K., Motayama, T., Kotake, C. Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis*, **1986**, *60*(3), 251-262. ⁶⁰ Murata, K.; Motayama, T. and Kotake, C. (1986) *Atherosclerosis*, *60*, 251-262.
- [62] Liau, G., Chan, L. M. Regulation of extracellular matrix RNA levels in cultured smooth muscle cells. Relationship to cellular quiescence. *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*(17), 10315-10320
- [63] Ang, A. H., Tachas, G., Campbell, J. H., Bateman, J. F., Campbell, G. R. Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth-muscle cells. Alteration with phenotype. *Biochem. J.*, **1990**, *265*(2), 461-469.
- [64] Seyama, Y., Wachi, H. Atherosclerosis and matrix dystrophy. *J. Atheroscler. Thromb.*, **2004**, *11*(5), 236-245.
- [65] Tajima, S. In *Molecules to diseases*, Ninomiya, Y.; Olsen B.R.; Ooyama, T. Eds.; Japan Scientific Societies Press: Tokyo, **1998**; pp. 109-121.
- [66] Wachi, H., Seyama, Y., Yamashita, S., Tajima, S. Cell cycle-dependent regulation of elastin gene in cultured chick vascular smooth-muscle cells. *Biochem. J.*, **1995**, *309*(Pt 2), 575-579.
- [67] Sugitani, H., Wachi, H., Tajima, S., Seyama, Y. Nitric oxide stimulates elastin expression in chick aortic smooth muscle cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **2001**, *24*(5), 461-464.
- [68] Wachi, H., Sugitani, H., Tajima, S., Seyama, Y. Endothelin-1 Down-Regulates Expression of Tropoelastin and Lysyl Oxidase mRNA in Cultured Chick Aortic Smooth Muscle Cells. *J. Health Sci.*, **2001**, *47*, 525-532.
- [69] Hedin, U., Thyberg, J. Plasma fibronectin promotes modulation of arterial smooth-muscle cells from contractile to synthetic phenotype. *Differentiation*, **1987**, *33*(3), 239-246.
- [70] Morla, A. O., Mogford, J. E. Control of smooth muscle cell proliferation and phenotype by integrin signaling through focal adhesion kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2000**, *272*(1), 298-302.
- [71] Thie, M., Schlumberger, W., Rauterberg, J., Robenek, H. Mechanical confinement inhibits collagen synthesis in gel-cultured fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.*, **1989**, *48*(2), 294-302.
- [72] Franzblau, C., Faris, B. Biosynthesis of insoluble elastin in cell and organ cultures. *Methods Enzymol.*, **1982**, *82*(Pt A), 615-637.
- [73] Majack, R. A., Cook, S. C., Bornstein, P. Control of smooth muscle cell growth by components of the extracellular matrix: autocrine role for thrombospondin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, *83*(23), 9050-9054.
- [74] Bernstein, L. R., Antoniadis, H., Zetter, B. R. Migration of cultured vascular cells in response to plasma and platelet-derived factors. *J. Cell Sci.*, **1982**, *56*, 71-82.
- [75] Gospodarowicz, D., Ill, C. R. Do plasma and serum have different abilities to promote cell growth? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, *77*(5), 2726-2730.
- [76] Majack, R. A., Bornstein, P. Heparin regulates the collagen phenotype of vascular smooth muscle cells: induced synthesis of an Mr 60,000 collagen. *J. Cell Biol.*, **1985**, *100*(2), 613-619.
- [77] Majack, R. A., Clowes, A. W. Inhibition of vascular smooth muscle cell migration by heparin-like glycosaminoglycans. *J. Cell Physiol.*, **1984**, *118*(3), 253-256.
- [78] Clowes, A. W., Karnowsky, M. J. Suppression by heparin of smooth muscle cell roliferation in injured arteries. *Nature*, **1977**, *265*(5595), 625-626.
- [79] Reilly, C. F., Kindy, M. S., Brown, K. E., Rosenberg, R. D., Sonenshein, G. E. Heparin prevents vascular smooth muscle cell progression through the G1 phase of the cell cycle. *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*(12), 6990-5.
- [80] Majack, R. A., Bornstein, P. Heparin regulates the collagen phenotype of vascular smooth muscle cells: induced synthesis of an Mr 60,000 collagen. *J. Cell Biol.*, **1985**, *100*(2), 613-619.
- [81] Bell, E., Ivarsson, B., Merrill, C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different

- proliferative potential *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1979**, 76(3), 1274-1278.
- [82] Nakagawa, S, Pawelek, P, Grinnell, F. Long-term culture of fibroblasts in contracted collagen gels: effects on cell growth and biosynthetic activity. *J. Invest. Dermatol.*, **1989**, 93(6), 792-8.
- [83] Schlumberger, W, Thie, M, Rauterberg, J, Kresse, H, Robenek, H. Deposition and ultrastructural organization of collagen and proteoglycans in the extracellular matrix of gel-cultured fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.*, **1989**, 50(1), 100-110.
- [84] Thie, M, Schlumberger, W, Semich, R, Rauterberg, J, Robenek, H. Aortic smooth muscle cells in collagen lattice culture: effects on ultrastructure, proliferation and collagen synthesis. *Eur. J. Cell Biol.*, **1991**, 55(2), 295-304.
- [85] Bissell, M. J, Barcellos-Hoff, M. H. The influence of extracellular matrix on gene expression: is structure the message? *J Cell Sci Suppl*, **1987**, 8, 327-343.
- [86] Wolinsky, H., Long-term effects of hypertension on the rat aortic wall and their relation to concurrent aging changes. Morphological and chemical studies. *Circ. Res.* **1972**, 30(3), 301-309.
- [87] Olivetti, G, Melissari, M, Marchetti, G, Anversa, P. Quantitative structural changes of the rat thoracic aorta in early spontaneous hypertension. Tissue composition, and hypertrophy and hyperplasia of smooth muscle cells. *Circ. Res.*, **1982**, 51(1), 19-26.
- [88] Grande, J, Davis, H. R, Bates, S, Mathews, M. B, Glagov, S. Effect of an elastin growth substrate on cholesteryl ester synthesis and foam cell formation by cultured aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, **1987**, 68(1-2), 87-93.
- [89] Grande, J. P, Glagov, S, Bates, S. R, Horwitz, A. L, Mathews, M. B. Effect of normolipemic and hyperlipemic serum on biosynthetic response to cyclic stretching of aortic smooth muscle cells. *Arteriosclerosis*, **1989**, 9(4), 446-452.
- [90] Kitahara, M, Kanaki, T, Toyoda, K, Miyakoshi, C, Tanaka, S, Tamaki, T, Saito, Y. NK-104, a newly developed HMG-CoA reductase inhibitor, suppresses neointimal thickening by inhibiting smooth muscle cell growth and fibronectin production in balloon-injured rabbit carotid artery. *Jpn. J. Pharmacol.*, **1998**, 77(2), 117-128.
- [91] Morishita, R, Tomita, N, Ogihara, T. HMG-Co A reductase inhibitors in the treatment of cardiovascular diseases: stabilization of coronary artery plaque. *Curr Drug Targets*, **2002**, 3(5), 379-385.
- [92] Assoian, R. K, Marcantonio, E. E. The extracellular matrix as a cell cycle control element in atherosclerosis and restenosis. *J. Clin. Invest.*, **1996**, 98(11), 2436-2439.
- [93] Chang, M. W, Barr, E, Seltzer, J, Jiang, Y. Q, Nabel, G. J, Nabel, E. G, Parmacek, M. S, Leiden, J. M. Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product. *Science*, **1995**, 267(5197), 518-522.
- [94] McCarthy, N. J, Bennett, M. R. The regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. *Cardiovasc. Res.*, **2000**, 45(3), 747-755.
- [95] Gordon, D, Reidy, M. A, Benditt, E. P, Schwartz, S. M. Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, 87(12), 4600-4604.
- [96] Ross, R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.*, **1999**, 340(2), 115-126.
- [97] Kockx, M.M, Knaepen, W.M. The role of apoptosis in vascular disease. *J. Pathol.*, **2000**, 190(3), 267-280.
- [98] Bennett, M. R, Littlewood, T. D, Schwartz, S. M, Weissberg, P. L. Increased sensitivity of human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques to p53-mediated apoptosis. *Circ. Res.*, **1997**, 81(4), 591-599.
- [99] Kockx, M. M, Herman, A. G. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc. Res.*, **2000**, 45(3), 736-746.
- [100] Rekhter, M. D. Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc. Res.*, **1999**, 41(2), 376-384.
- [101] Kockx, M. M, De Meyer, G. R, Muhring, J, Jacob, W, Bult, H, Herman, A. G. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques.
- [102] Flynn, P. D, Byrne, C. D, Baglin, T. P, Weissberg, P. L, Bennett, M. R. Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells. *Blood*, **1997**, 89(12), 4378-4384.
- [103] Bennett, M. R. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc. Res.*, **1999**, 41(2), 361-368.
- [104] Krajewska, M, Wang, H. G, Krajewski, S, Zapata, J. M, Shabaik, A, Gascoyne, R, Reed, J. C. Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res.*, **1997**, 57(8), 1605-1613.
- [105] Hueber, A. O, Evan, G. I. Traps to catch unwary oncogenes. *Trends Genet.*, **1998**, 14(9), 364-367.
- [106] Schonbeck, U, Herzberg, M, Petersen, A, Wohlenberg, C, Gerdes, J, Flad, H. D, Loppnow, H. Human vascular smooth muscle cells express interleukin-1beta-converting enzyme (ICE), but inhibit processing of the interleukin-1beta precursor by ICE. *J. Exp. Med.*, **1997**, 185(7), 1287-1294.
- [107] Katayose, D, Wersto, R, Cowan, K, 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.*, **1995**, 215(2), 446-451.
- [108] Guevara, N. V, Kim, H. S, Antonova, E. I, Chan, L. The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation *in vivo*. *Nat. Med.*, **1999**, 5(3), 335-339.
- [109] Bennett, M. R, Evan, G. I, Schwartz, S. M. Apoptosis of rat vascular smooth muscle cells is regulated by p53-dependent and -independent pathways. *Circ. Res.*, **1995**, 77(2), 266-273.
- [110] Anderson, R. G. The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.*, **1998**, 67, 199-225.
- [111] Simons, K, Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **1997**, 387(6633), 569-572.
- [112] Anderson, R.G.W. Joe Goldstein and Mike Brown: from cholesterol homeostasis to new paradigms in membrane biology. *Trends Cell Biol.*, **2003**, 13(10), 534-539.
- [113] Devaux, P. F. Lipid transmembrane asymmetry and flip-flop in biological membranes and in lipid bilayers. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1993**, 3, 489-494.
- [114] Liscum, L, Underwood, K. W. Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270(26), 15443-15446.
- [115] Mead, J. F.; Alfin-Slater, D. R.; Howton, G.; Popják, G. In *Lipids: Chemistry, Biochemistry and Nutrition*; Mead, J. F.; Alfin-Slater, D. R.; Howton, G.; Popják, G., Eds.; Plenum Press: New York, **1986**; pp. 295-367.
- [116] Alejandre, M. J, Ramirez, H, Linares, A, Garcia-Peregrin, E. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from neonatal chick. *Int. J. Biochem.*, **1983**, 15(8), 1077-1080.
- [117] Gould, R. G, Taylor, C. B, Hagerman, J. S, Warner, I, Campbell, D. J. Cholesterol metabolism. I. Effect of dietary cholesterol on the synthesis of cholesterol in dog tissue *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **1953**, 201(2), 519-528.
- [118] Aguilera, J. A, Linares, A, Arce, V, Garcia-Peregrin, E. Effect of dietary cholesterol on mevalonate metabolism by sterol and non-sterol pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 122(3), 945-948.
- [119] Adams C. M, Reitz, J, De Brabander, J.K, Feramisco, J.D, Li, L, Brown M. S, Goldstein J.L *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (50), 52772-52780.
- [120] Peet, D. J, Janowski, B. A, Mangelsdorf, D. J. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **1998**, 8(5), 571-575.
- [121] Dusserre, E, Bourdillon, M. C, Pulcini, T, Berthezene, F. Decrease in high density lipoprotein binding sites is associated with decrease in intracellular cholesterol efflux in dedifferentiated aortic smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1994**, 1212(2), 235-244.
- [122] Duserre, E, Bourdillon, M.C, Pulcini, T, Berzethene, F. Decrease in high density lipoprotein binding sites is associated with decrease in intracellular cholesterol efflux in dedifferentiated aortic smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1994**, 1212(2), 235-244
- [123] Minor, L. K, Rothblat, G. H, Glick, J. M. Triglyceride and cholesteryl ester hydrolysis in a cell culture model of smooth muscle foam cells. *J. Lipid Res.*, **1989**, 30(2), 189-197.
- [124] Rong, J. X, Shapiro, M, Trogan, E, Fisher, E. A. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100(23), 13531-13536.

- [125] Carazo, A, Alejandre, M. J, Louktibi, A, Linares, A. The reversal of the inhibition on lipids synthesis by L-659,699 in arterial smooth muscle cells cultures. *Mol. Cell. Biochem.*, **2001**, 221(1-2), 25-31.
- [126] Carazo, A, Alejandre, M. J, Suarez, M. D, Linares, A. Alterations in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase mRNA concentration in cultured chick aortic smooth muscle cells. *Lipids*, **2000**, 35(6), 587-593.
- [127] Brown, M. S, Goldstein, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, **1997**, 89(3), 331-340.
- [128] Brown, M. S, Goldstein, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, **1986**, 232(4746), 34-47.
- [129] Edwards, P. A, Ericsson, J. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu. Rev. Biochem.*, **1999**, 68, 157-185.
- [130] Goldstein, J. L, Brown, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, **1990**, 343(6257), 425-430.
- [131] Yokoyama, C, Wang, X, Briggs, M. R, Admon, A, Wu, J, Hua, X, Goldstein, J. L, Brown, M. S. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*, **1993**, 75(1), 187-197.
- [132] Hua, X, Yokoyama, C, Wu, J, Briggs, M. R, Brown, M. S, Goldstein, J. L, Wang, X. SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90(24), 11603-11607.
- [133] Tontonoz, P, Kim, J. B, Graves, R. A, Spiegelman, B. M. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, **1993**, 13(8), 4753-4759.
- [134] Edwards, P. A, Tabor, D, Kast, H. R, Venkateswaran, A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2000**, 1529(1-3), 103-113.
- [135] Flier, J. S, Hollenberg, A. N. ADD-1 provides major new insight into the mechanism of insulin action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96(25), 14191-1492.
- [136] Brown, M. S, Goldstein, J. L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96(20), 11041-11048.
- [137] Hua, X, Nohturfft, A, Goldstein, J. L, Brown, M. S. Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell*, **1996**, 87(3), 415-426.
- [138] Osborne, T. F. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275(42), 32379-32382.
- [139] Hua, X, Wu, J, Goldstein, J. L, Brown, M. S, Hobbs, H. H. Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics*, **1995**, 25(3), 667-673.
- [140] Shimano, H, Horton, J. D, Shimomura, I, Hammer, R. E, Brown, M. S, Goldstein, J. L. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest.*, **1997**, 99(5), 846-854.
- [141] Oliner, J. D, Andresen, J. M, Hansen, S. K, Zhou, S, Tjian, R. SREBP transcriptional activity is mediated through an interaction with the CREB-binding protein. *Genes Dev.*, **1996**, 10(22), 2903-2911.
- [142] Ericsson, J, Edwards, P. A. CBP is required for sterol-regulated and sterol regulatory element-binding protein-regulated transcription. *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273(28), 17865-17870.
- [143] Kwok, R. P, Lundblad, J. R, Chrivia, J. C, Richards, J. P, Bachinger, H. P, Brennan, R. G, Roberts, S. G, Green, M. R, Goodman, R. H. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature*, **1994**, 370(6486), 223-226.
- [144] Edwards, P. A, Ericsson, J. Signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway: mechanisms of action and possible roles in human disease. *Curr. Opin. Lipidol.*, **1998**, 9(5), 433-440.¹³⁵ Edwards, P.A. and Ericsson, J. (1998) *Curr. Opin. Lipidol.*, 9, 433-440.
- [145] Magana, M. M, Osborne, T. F. Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271(51), 32689-32694.
- [146] Rodriguez, C, Raposo, B, Martinez-Gonzalez, J, Llorente-Cortes, V, Vilahur, G, Badimon, L. Modulation of ERG25 expression by LDL in vascular cells. *Cardiovasc. Res.*, **2003**, 58(1), 178-185.
- [147] Rodriguez, C, Martinez-Gonzalez, J, Sanchez-Gomez, S, Badimon, L. LDL downregulates CYP51 in porcine vascular endothelial cells and in the arterial wall through a sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circ. Res.*, **2001**, 88(3), 268-74.
- [148] Assaf, S, Hazard, D, Pitel, F, Morisson, M, Alizadeh, M, Gondret, F, Diot, C, Vignal, A, Douaire, M, Lagarrigue, S. Cloning of cDNA encoding the nuclear form of chicken sterol response element binding protein-2 (SREBP-2), chromosomal localization, and tissue expression of chicken SREBP-1 and -2 genes. *Poult. Sci.*, **2003**, 82(1), 54-61.
- [149] Robinet, P, Védie, B, Chironi, G, Gariépy, J, Simon, A, Moatti, N, Paul, J. L. Characterization of polymorphic structure of SREBP-2 gene: role in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **2003**, 168(2), 381-387.
- [150] Rios, D. L, Vargas, A. F, Torres, M. R, Zago, A. J, Callegari-Jacques, S. M, Hutz, M. H. Interaction between SREBP-1a and APOB polymorphisms influences total and low-density lipoprotein cholesterol levels in patients with coronary artery disease. *Clin Genet*, **2003**, 63(5), 380-385.
- [151] Védie, B, Jeunemaitre, X, Megnien, J. L, Atger, V, Simon, A, Moatti, N. A new DNA polymorphism in the 5' untranslated region of the human SREBP-1a is related to development of atherosclerosis in high cardiovascular risk population. *Atherosclerosis*, **2001**, 154(3), 589-597.
- [152] Shimomura, I, Shimano, H, Korn, B. S, Bashmakov, Y, Horton, J. D. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273(52), 35299-35306.
- [153] Wang, X, Sato, R, Brown, M. S, Hua, X, Goldstein, J. L. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell*, **1994**, 77(1), 53-62.
- [154] Horton, J. D, Shimomura, I, Brown, M. S, Hammer, R. E, Goldstein, J. L, Shimano, H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Clin. Invest.*, **1998**, 101(11), 2331-2339.
- [155] Lin, T, Zeng, L, Liu, Y, DeFea, K, Schwartz, M. A, Chien, S, Shyy, J. Y. Rho-ROCK-LIMK-cofilin pathway regulates shear stress activation of sterol regulatory element binding proteins. *Circ. Res.*, **2003**, 92(12), 1296-1304.
- [156] Adams, C. M, Goldstein, J. L, Brown, M. S. Cholesterol-induced conformational change in SCAP enhanced by Insig proteins and mimicked by cationic amphiphiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100(19), 10647-10652.
- [157] Gimpl, G, Burger, K, Fahrenholz, F. A closer look at the cholesterol sensor. *Trends Biochem. Sci.*, **2002**, 27(12), 596-599.
- [158] Nohturfft, A, Brown, M. S, Goldstein, J. L. Sterols regulate processing of carbohydrate chains of wild-type SREBP cleavage-activating protein (SCAP), but not sterol-resistant mutants Y298C or D443N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95(22), 12848-12853.
- [159] Osborne, T. F, Rosenfeld, J. M. Related membrane domains in proteins of sterol sensing and cell signaling provide a glimpse of treasures still buried within the dynamic realm of intracellular metabolic regulation. *Curr. Opin. Lipidol.*, **1998**, 9(2), 137-140.
- [160] Gil, G, Faust, J. R, Chin, D. J, Goldstein, J. L, Brown, M. S. Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell*, **1985**, 41(1), 249-258.
- [161] Kumagai, H, Chun, K. T, Simoni, R. D. Molecular dissection of the role of the membrane domain in the regulated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270(32), 19107-19113.
- [162] Liu, J, Zhang, F, Li, C, Lin, M, Briggs, M. R. Synergistic activation of human LDL receptor expression by SCAP ligand and cytokine oncostatin M. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2003**, 23(1), 90-96.
- [163] Deakin, S, Leviev, I, Guernier, S, James, R. W. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum par-

- axonase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2003**, 23(11), 2083-2089.
- [164] Liao, J. K. Role of statin pleiotropism in acute coronary syndromes and stroke. *Int J Clin Pract Suppl*, **2003**, 134, 51-57.
- [165] Mulhaupt, F, Matter, C. M, Kwak, B. R, Pelli, G, Veillard, N. R, Burger, F, Graber, P, Luscher, T. F, Mach, F. Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) reduce CD40 expression in human vascular cells. *Cardiovasc. Res.*, **2003**, 59(3), 755-766.
- [166] Parthasarathy, S, Steinberg, D, Witztum, J. L. The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Annu. Rev. Med.*, **1992**, 43, 219-225.
- [167] Sukhanov, S, Hua Song, Y, Delafontaine, P. Global analysis of differentially expressed genes in oxidized LDL-treated human aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2003**, 306(2), 443-449.
- [168] Brown, M. S, Goldstein, J. L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.*, **1983**, 52, 223-261.
- [169] Rohrer, L, Freeman, M, Kodama, T, Penman, M, Krieger, M. Coiled-coil fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger receptor type II. *Nature*, **1990**, 343(6258), 570-572.
- [170] Kodama, T, Freeman, M, Rohrer, L, Zabrecky, J, Matsudaira, P, Krieger, M. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature*, **1990**, 343(6258), 531-535.
- [171] Brown, M. S, Goldstein, J. L. Atherosclerosis. Scavenging for receptors. *Nature*, **1990**, 343(6258), 508-509.
- [172] Pitas, R. E. Expression of the acetyl low density lipoprotein receptor by rabbit fibroblasts and smooth muscle cells. Up-regulation by phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265(21), 12722-12727.
- [173] Matsumoto, K, Hirano, K, Nozaki, S, Takamoto, A, Nishida, M, Nakagawa-Toyama, Y, Janabi, M. Y, Ohya, T, Yamashita, S, Matsuzawa, Y. Expression of macrophage (Mphi) scavenger receptor, CD36, in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma, which regulates gain of Mphi-like phenotype *in vitro*, and its implication in atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2000**, 20(4), 1027-1032.
- [174] Draude, G, Hrboticky, N, Lorenz, R. L. The expression of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) on human vascular smooth muscle cells and monocytes and its down-regulation by lovastatin. *Biochem. Pharmacol.*, **1999**, 57(4), 383-386.
- [175] Rommeswinkel, M, Severs, N. J, Koster, M, Robenek, H. Repression of the macrophage scavenger receptor in macrophage-smooth muscle cell heterokaryons. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **1995**, 15(5), 601-611.
- [176] Shimaoka, T, Kume, N, Minami, M, Hayashida, K, Kataoka, H, Kita, T, Yonehara, S. Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275(52), 40663-40666.
- [177] Li, H, Freeman, M. W, Libby, P. Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression *in vivo* by atherogenic diets and *in vitro* by cytokines. *J. Clin. Invest.*, **1995**, 95(1), 122-133.
- [178] Inaba, T, Yamada, N, Gotoda, T, Shimano, H, Shimada, M, Momomura, K, Kadowaki, T, Motoyoshi, K, Tsukada, T, Morisaki, N, Saito, Y, Yoshida, S, Takuku, F, Yasaki, Y. Expression of M-CSF receptor encoded by c-fms on smooth muscle cells derived from arteriosclerotic lesion. *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267(8), 5693-5699.
- [179] Kume, N, Moriwaki, H, Kataoka, H, Minami, M, Murase, T, Sawamura, T, Masaki, T, Kita, T. Inducible expression of LOX-1, a novel receptor for oxidized LDL, in macrophages and vascular smooth muscle cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2000**, 902, 323-327.
- [180] Minami, M, Kume, N, Shimaoka, T, Kataoka, H, Hayashida, K, Akiyama, Y, Nagata, I, Ando, K, Nobuyoshi, M, Hanyuu, M, Komeda, M, Yonehara, S, Kita, T. Expression of SR-PSOX, a novel cell-surface scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized LDL in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2001**, 21(11), 1796-1800.
- [181] Kataoka, H, Kume, N, Miyamoto, S, Minami, M, Morimoto, M, Hayashida, K, Hashimoto, N, Kita, T. Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectinlike Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2001**, 21(6), 955-960.
- [182] Kume, N, Kita, T. Roles of lectin-like oxidized LDL receptor-1 and its soluble forms in atherogenesis. *Curr. Opin. Lipidol.*, **2001**, 12(4), 419-423.
- [183] Zingg, J. M, Ricciarelli, R, Andorno, E, Azzi, A. Novel 5' exon of scavenger receptor CD36 is expressed in cultured human vascular smooth muscle cells and atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2002**, 22(3), 412-417.
- [184] Imachi, H, Murao, K, Cao, W. M, Ohyama, T, Sato, M, Sasaguri, Y, Ishida, T, Takahara, J. Expression of HDL receptor, CLA-1 in human smooth-muscle cells and effect of interferon-gamma on its regulation. *Horm. Metab. Res.*, **2001**, 33(7), 389-393.
- [185] Inoue, I, Katayama, S. The possible therapeutic actions of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) agonists, PPAR gamma agonists, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors and calcium (Ca)-antagonists on vascular endothelial cells. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, **2004**, 4(1), 35-52.
- [186] Ambrosi, P, Villani, P, Habib, G, Bouvenot, G. The statins: new properties. *Therapie*, **2003**, 58(1), 15-21.
- [187] Gibbons, G. F. From gallstones to genes: two hundred years of sterol research. A tribute to George J. Schroepfer Jr. *Lipids*, **2002**, 37(12), 1153-1162.
- [188] Goodridge, A. G. Dietary regulation of gene expression: enzymes involved in carbohydrate and lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, **1987**, 7, 157-185.
- [189] Foretz, M, Pacot, C, Dugail, I, Lemarchand, P, Guichard, C, Le Liepvre, X, Berthelie-Lubrano, C, Spiegelman, B, Kim, J. B, Ferre, P, Foufelle, F. ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol. Cell. Biol.*, **1999**, 19(5), 3760-3768.
- [190] Kim, J. B, Sarraf, P, Wright, M, Yao, K. M, Mueller, E, Solanes, G, Lowell, B. B, Spiegelman, B. M. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J. Clin. Invest.*, **1998**, 101(1), 1-9.
- [191] Yabe, D, Komuro, R, Liang, G, Goldstein, J. L, Brown, M. S. Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100(6), 3155-3160.
- [192] Shin, D. J, Osborne, T. F. Thyroid hormone regulation and cholesterol metabolism are connected through Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2 (SREBP-2). *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278(36), 34114-34118.
- [193] Xu, J, Nakamura, M. T, Cho, H. P, Clarke, S. D. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274(33), 23577-83.
- [194] Kim, H. J, Takahashi, M, Ezaki, O. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mmas. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274(36), 25892-25898.
- [195] Mater, M. K, Thelen, A. P, Pan, D. A, Jump, D. B. Sterol response element-binding protein 1c (SREBP1c) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic S14 gene transcription. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274(46), 32725-32732.
- [196] Yahagi, N, Shimano, H, Hasty, A. H, Anemiyama-Kudo, M, Okazaki, H, Tamura, Y., Iizuka, Y., Shionoiri, F., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Nagai, R., Ishibashi, S, Yamada, N. A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274(50), 35840-35844.
- [197] Field, F. J, Born, E, Mathur, S. N. Fatty acid flux suppresses fatty acid synthesis in hamster intestine independently of SREBP-1 expression. *J. Lipid Res.*, **2003**, 44(6), 1199-1208.
- [198] Puri, V, Jefferson, J. R, Singh, R. D, Wheatley, C. L, Marks, D. L, Pagano, R. E. Sphingolipid storage induces accumulation of intracellular cholesterol by stimulating SREBP-1 cleavage. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278(23), 20961-20970.

- [199] Skrinska, V. A, Konieczkowski, M, Gerrity, R. G, Galang, C. F, Rebec, M. V. Suppression of foam cell lesions in hypercholesterolemic rabbits by inhibition of thromboxane A2 synthesis. *Arteriosclerosis*, **1988**, 8(4), 359-367.
- [200] Cooke, J. P, Singer, A. H, Tsao, P, Zera, P, Rowan, R. A, Billingham, M. E. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J. Clin. Invest.*, **1992**, 9(3), 1168-1172.
- [201] Hogan, M, Cerami, A, Bucala, R. Advanced glycosylation endproducts block the antiproliferative effect of nitric oxide. Role in the vascular and renal complications of diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, **1992**, 90(3), 1110-1115.
- [202] Schiffrin, E. L, Amiri, F, Benkirane, K, Iglarz, M, Diep, Q. N. Peroxisome proliferator-activated receptors: vascular and cardiac effects in hypertension. *Hypertension*, **2003**, 42(4), 664-668.
- [203] Bruemmer, D, Yin, F, Liu, J, Berger, J. P, Sakai, T, Blaschke, F, Fleck, E, Van Herle, A. J, Forman, B. M, Law, R. E. Regulation of the growth arrest and DNA damage-inducible gene 45 (GADD45) by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.*, **2003**, 93(4), e38-47.
- [204] Beltowski, J, Wojcicka, G, Jamroz, A. [Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in pathophysiology of the circulatory system and prospective use of agonists of these receptors in therapy]. *Postepy Hig Med Dosw*, **2003**, 57(2), 199-217.
- [205] Chen, Y. E, Fu, M, Zhang, J, Zhu, X, Lin, Y, Akinbami, M. A, Song, Q. Peroxisome proliferator-activated receptors and the cardiovascular system. *Vitam Horm*, **2003**, 66, 157-188.
- [206] Camejo, G. PPAR agonists in the treatment of insulin resistance and associated arterial disease. *Int J Clin Pract Suppl*, **2003**, 134, 36-44.
- [207] Fu, M, Zhang, J, Lin, Y, Zhu, X, Zhao, L, Ahmad, M, Ehrenguber, M. U, Chen, Y. E. Early stimulation and late inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) gene expression by transforming growth factor beta in human aortic smooth muscle cells: role of early growth-response factor-1 (Egr-1), activator protein 1 (AP1) and Smads. *Biochem. J.*, **2003**, 370(Pt 3), 1019-1025.
- [208] Ichiki, T, Tokunou, T, Fukuyama, K, Iino, N, Masuda, S, Takeshita, A. 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones transactivate epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptors in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**, 323(2), 402-408.
- [209] Schiffrin, E. L. Peroxisome proliferator-activated receptors and cardiovascular remodeling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2005**, 288(3), H1037-1043.

Nutritional Control, Gene Regulation, and Transformation of Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis

Linares, A.^{*#}, Perales, S.[#], Palomino-Morales R.J., Castillo, M. and Alexandre, M.J.

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University of Granada, 18071 Granada, Spain

Abstract: Contractile-state smooth muscle cells (SMC), the only cell type in the arterial media, undergoes migration to the intima, proliferation, and abundant extracellular matrix production during the early stages of atherosclerosis. This involves the ingestion of low-density lipoprotein (LDL) and modified or oxidised LDL by macrophages together with SMC by several pathways including a scavenger pathway leading to accumulation of cholesterol esters and formation of foam cells. High-plasma cholesterol levels constitute a major causative risk for atherosclerosis. The membrane-bound transcription factor called sterol regulatory element binding protein (SREBP) activates gene-encoding enzymes of cholesterol and fatty acid biosynthesis. The SREBP expression, in response to diet, shows that are involved in both lipogenesis and cholesterol homeostasis, moreover SREBPs are regulated directly by cholesterol. Animal models were used in trials of atherosclerosis, and cholesterol feeding has been described elsewhere as producing atherosclerotic lesions. We have examined the morphological, molecular and proliferative change in arterial SMC mimicking such a cholesterol diet, this transformed SMC is a good model to study the alterations of the differentiated state of SMC, and the transformation into foam cell, caused by cholesterol-rich diet. Despite the complexity of the interactions in atherosclerosis, there are many opportunities to affect the homeostatic balance of the artery wall at SMC levels. We have considered here some of the possible targets for intervention with promising strategies for the nutritional control of the genes, and, in a general way, the possibilities for modulating the expression of genes influencing atherosclerosis

Key Words: Smooth muscle cells, cholesterol, extracellular matrix, proliferation, apoptosis, SREBP, atherosclerosis, nutritional control, gene regulation.

INTRODUCTION

Vascular diseases, not only atherosclerosis but also restenosis following angioplasty or transplantation, are due to abnormal vascular smooth-muscle-cell (VSMC) growth and gene expression. Atherosclerosis is responsible for myocardial infarction and stroke, representing 50% of all mortality in the USA, Europe and Japan. Atherosclerosis is an accumulative process characterized by the progression of a lesion in the artery wall resulting from an excessive inflammatory-fibroproliferative response to various forms of injury to the endothelium and smooth muscle of the artery wall [1]. A large number of growth factors, cytokines, and vasoregulatory molecules participate in this process. A recent review focuses on the current state of knowledge of molecular mechanisms/processes that control differentiation of VSMC during normal development and maturation of the vasculatures as well as how these mechanisms/processes are altered in vascular injury or disease [2]. The control of the expression of genes encoding these molecules and to target specific cell types provides opportunities to develop new diagnostic and therapeutic agents to induce the regression of the lesions and, possibly, to prevent their formation.

The earliest recognizable lesion of atherosclerosis is the so-called "fatty streak", an aggregation of lipid-rich macro-

phages and T lymphocytes within the innermost layer of artery wall, the intima. Intermediate lesions [3,4] are composed of layers of macrophages, and SMC in turn develop into the more advanced, complex, occlusive lesions called fibrous plaques. The fibrous plaques increase in size and, projecting into the arterial lumen, may impede the flow of blood. Studies of animals with artificially induced hypercholesterolaemia [5,6,7,8] have confirmed that three processes are involved in the formation of atherosclerotic lesions: 1. the proliferation of SMC, macrophages and lymphocytes; 2. the formation by SMC of a connective-tissue matrix comprising elastic fibre proteins, collagen and proteoglycans; and 3. the accumulation of lipids and mostly free and esterified cholesterol in the surrounding matrix and the associated cells. The cellular events that occur during progression of lesions in hypercholesterolaemic animals are almost exactly mirrored by those observed in human atherosclerotic coronary arteries in heart removed in transplant operations [9]. Progression of atherosclerotic lesions is thus marked by accumulation of alternating layers of lipid-laden SMC and macrophages surrounded by extracellular matrix.

Two different phenotypes have been described for SMC based on the distribution of myosin filaments and the formation of large amounts of rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus for secreted protein. When cells are in a contractile phenotype, they respond to agents that induce either vasoconstriction or vasodilation, such as catecholamines [10], neuropeptides [11] or nitric oxide (NO) [12]. By contrast, in the synthetic state, these are capable of expressing genes for a number of growth-regulatory molecules and

*Address correspondence to this author at the Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Sciences, University of Granada, Fuentenueva s/n, Granada, Spain; Tel: 34-958-243088; Fax: 34-958-249945; E-mail: analinar@ugr.es.

principal authors.

cytokines [2]. Thus, SMC play the main role in the fibro-proliferative component of this disease process [13]. Atherosclerotic plaque is located within the intima, and consists of a necrotic core overlaid by a fibrous cap composed mainly of proliferated SMCs, T-cell lymphocytes, a few neutrophils, and dense connective tissue consisting of collagen, elastin and proteoglycans. The necrotic core contains cellular debris, extracellular lipids, cholesterol crystals, and calcium deposits. Around the edges are numerous lipid-laden foam cells of both macrophage and smooth-muscle origin. The death of these cells contributes to the necrotic core. The focus of this review is to provide an overview of the current state of knowledge of molecular mechanisms, gene regulation, and nutritional control of the proliferation of vascular SMC and of their transformation into foam cells in atherosclerosis process. We will not review the control of differentiation of vascular SMC during vascular injury or disease, since this topic was reviewed very recently by Owens *et al.* [2]. With the increased understanding of the molecular and cellular interactions, extracellular matrix protein role, as well as gene expression and regulation, new potential targets for pharmacologic intervention are promising.

THE TRANSFORMATION OF VASCULAR SMOOTH-MUSCLE CELLS IN ATHEROSCLEROSIS

Vascular Smooth-Muscle Cells

Vascular smooth-muscle cells (VSMC) play a key role in atherogenic process, it is widely known that SMC migrate, proliferate, produce extracellular matrix components and are transformed by accumulating lipids [14]. This modulation process is conditioned by a change in their phenotypic state: the adult contractile phenotype expressed in both atherogenic and remodelling process and also in embryonic aorta. The concept of SMC phenotypic modulation gained currency many years ago [15]. Arterial SMC in culture reveal a similar modulation from contractile-like to synthetic state [15,8] characterized by their cytoskeletal and cytoenzymatic features [16] during passages; i.e. the harvested SMC progressively lose their contractile phenotype at confluency and exhibit synthetic characteristics identical to those observed in the synthetic SMC of the diffuse intimal thickening [15,16]. In long term culture, they develop a transformed phenotype [15,17,8] with increased proliferation [8,18] providing a good model to study SMC transformation and gene regulation during the modulation process *in vitro*.

More recently, the term “swirling-type” has been used to denote SMC phenotypes having elongated, spindle-shaped cell bodies which form typical SMC “hills-and-valleys” morphology at confluence [19]. The predominant cell type found in the normal media of arteries, this type corresponds to a contractile phenotype. Another SMC is called “epithelioid-type” which has cuboidal cell bodies, grows to a monolayer after reaching confluence and would correspond to synthetic-phenotype [19]. This phenotype represents only a small fraction of SMCs from normal arterial media, but is believed to be the major SMC type to migrate from the media and proliferate into neointima during the progression of

atherosclerosis and restenosis after angioplasty. Recently, the “swirling” and an “epithelioid” SMC phenotypes have been isolated and cloned from normal rat carotid arteries [20]. These authors have shown that, when stimulated with various agonists, the “epithelioid” SMC phenotype secreted more proteinases than did the “swirling” SMC, while both phenotypes secreted similar amounts of proteinase inhibitors when cultured under similar conditions [20]. The conclusion was that higher proteolytic potential of “epithelioid” SMC supports the idea that it is the active SMC phenotype that proliferates and migrates under pathological conditions.

Cytoskeleton and the VSMC Phenotypic Modulation

As mentioned above, VSMCs undergo a phenotypic transformation and exhibit a functional plasticity, modulating from the mature phenotype (in which the primary function is contraction) to a less differentiated state with increased capacities for motility, protein synthesis, and proliferation. Change in phenotypic expression of rabbit aortic SMC in culture could be correlated with alterations in expression and distribution of structural proteins [21]. Contractile state SMC (day 1 and 3 of primary culture) showed distinct sorting of proteins into subcellular domains, consistent with the theory that the SMC structural machinery is compartmentalised within the cell. Proteins specialised for contraction (α -SM actin, SM-MHC, and calponin) were amply expressed in these cells and concentrated in the upper central region of the cell [21]. Vimentin was confined to the body of the cell, providing support for the contractile apparatus but not colocalising with it. In line with its role in cell attachment and motility, -MN actin was localised to the cell periphery and basal cortex [21]. The dense body protein α -actinin was concentrated at the cell periphery, possibly stabilising both the contractile and the motile apparatus. Vinculin-containing focal adhesions were well developed, indicating the cells' strong adhesion to the substrate. In synthetic-state SMC (passage 2-3 of culture), there was decreased expression of contractile and adhesion (vinculin) proteins with a concomitant increase in cytoskeletal proteins -no-muscle [NM] actin and vimentin. These quantitative changes in structural proteins were associated with dramatic changes in their distribution [21] the distinct compartmentalisation of structural proteins observed in contractile state SMC was no longer obvious with proteins were more evenly distributed throughout the cytoplasm to accommodate altered cell function. This, SMC phenotypic modulation involves not only quantitative changes in contractile and cytoskeletal proteins, but also reorganisation of these proteins. Since the cytoskeleton acts as a spatial regulator of intracellular signalling, reorganisation of the cytoskeleton may lead to the realignment of signalling molecules, which, in turn, may mediate the changes in function associated with SMC phenotypic modulation [21]. The morphological changes associated with the establishment of the differentiated phenotype were also found to include changes in the expression of the cytoskeletal-extracellular matrix complex. The integrins are linked to both the cytoskeleton and extracellular matrix, [22], integrins are transmembrane heterodimers proteins that bind to a

number of signal-transduction pathways [23]. There is evidence for a role of integrins in cell survival promoted by ECM, and blockade of integrins can trigger apoptosis of endothelial cells *in vivo* [24]. Cell morphogenesis is determined to a large extent by the type of cell-to-cell and cell-to-substrate interaction. Change in these various kinds of cell adhesion, which are established through specific transmembrane receptors, can alter the organization of cytoskeletal elements which are anchored to the receptors. These alterations in cytoskeletal structure may affect physiological and pathological processes in the cell. Environmental modulations of receptor-cytoskeletal interaction have been shown by numerous investigators to influence patterns of gene expression related to cell growth and differentiation. The possibility that the cytoskeleton is a major mechanical-chemical coordinator of signal transduction from the cell surface to the nucleus has been extensively discussed [25]. Changes in the state of cytoskeletal organization are transduced to influence the expression of the respective cytoskeletal protein gene to reflect the "new cytoskeletal state" established after such cell-environment interaction.

The Extracellular Matrix and VSMC Proliferation

The vascular smooth-muscle cell (SMC) is responsible for maintaining both arterial tone *via* contraction-relaxation and vessel integrity by proliferation and synthesis of extracellular matrix (ECM) [26]. The extracellular matrix (ECM) is a complex mixture of insoluble structural proteins and diffusible metabolites. The cell-attachment protein contains one domain involved in binding the cell surface, and another domain for extracellular molecules [27,28]. Fibronectin, type I collagen and type III collagen genes code for the three major proteins of the ECM [29,30]. The regulation of the genes coding for ECM is an important part of many cellular functions such as adhesion, proliferation, migration and differentiation. Quantitative and qualitative modifications in ECM gene expression vary as a function of cell type, age and related pathological processes [31,32]. Various amount and types of collagens, adhesion molecules, proteoglycans growth factors and cytokines or chemokines are present in the extracellular matrices [33]. Matrix breakdown is of fundamental importance to many normal and pathological conditions such as tissue remodelling, wound healing, tumour invasion and plaque destabilization. Plaque destabilization is considered to be the greatest causative factor for acute coronary syndrome (ACS) [34,35]. Matrix breakdown requires a battery of enzymes working together, since many of the components are efficiently degraded only by specific proteases [36]. Moreover, matrix metalloproteinase-2 (MMP2) is associated with basement membrane and ECM degradation, important processes for cell migration. Thrombospondin-1 (TSP-1), an ECM glycoprotein associated with VSMC migration, induced MMP2 activation through transcriptional and posttranscriptional mechanisms, implying that MMP2 activation is relevant to the mechanism of TSP-1-induced VSMC migration [37].

During postnatal development, SMC located in the arterial tunica media are maintained in the resting, or G₀/G₁,

stage of the cell cycle and express high levels of contractile protein isoforms [38]. However, in response to vascular injury and the concomitant release of growth factors, vascular SMC re-enter the cell cycle, proliferate, and modulate their phenotype to serve a primarily synthetic function, increasing expression of ECM proteins [39-43]. This phenotype of VSMC synthesise and secrete a variety of macromolecules that form the ECM of the vascular tissue, e. g., proteoglycans [44-46], glycoproteins [47], collagen [47-49], and elastin [47]. ECM proteins are a prominent target for non-enzymatic glycation because of their slow turnover rates. Non-enzymatic glycation of human fibronectin reportedly impairs adhesive and proliferative properties of human VSMC [50]. ECM synthesis could be affected by diet supplementation, and thus elastin production is modulated not only by calcium-dependent steroid hormones but also by vitamin D3. Vitamin D3 is involved in the regulation of calcium metabolism and influences the expression of various ECM proteins—for example, vitamin D3 had no effect or decreased tropoelastin expression (depending of dosage and exposure time), suggesting that vitamin D3 may be an important modulator of elastin expression [51]. Ascorbate supplementation of cultured foetal bovine aortic SMC leads to increased deposition of ECM proteins and stimulation of cell-protein synthesis. This phenomenon has been investigated at the level of gene expression [52]. ECM protein synthesis is also affected by the ECM; in fact, ECM plays a major role in modulating VSMC, thus the proteoglycans (PG) synthesis increased both secreted and cellular by VSMC cultured in ECM derived from vascular endothelial cells (VEC), as well as ECM derived from VSMC or THP-1 macrophages. Selective enzymatic removal of chondroitin sulphates, collagen, and elastin from SMC matrix stimulated PG synthesis, as did the removal of chondroitin sulphates from the macrophage matrix [53]. Moreover, the newly synthesised PG from cultures plated on SMC- or macrophages-derived matrices had greater charge density, large molecular size, and a longer glycosaminoglycan chain than did those from VEC matrix cultures [53]. Proliferating SMC secrete proteoglycans with elongated glycosaminoglycan side chains, which have an increased binding affinity to LDL. Notably, statin-exposure increased the molecular weight and hydrodynamic size of secreted proteoglycans. Thus, statins may induce atheroprotective changes in vascular proteoglycans, and lower LDL retention in the vessel wall [54]. These findings suggest a mechanism whereby statins may benefit atherosclerosis in a manner unrelated to the lowering of serum LDL.

As discussed above, SMC modulating from a contractile to a synthetic phenotype in atherosclerosis synthesise ECM molecules excessively, in particular collagens [15,55-59]. Moreover, cells of the atherosclerotic vessel synthesise type I collagen in preference to type III collagen, unlike cells of the healthy arterial wall [60,61]. With regard to the quantity of totally synthesised collagens as well as to their composition, the cells of the atherosclerotic vessel would appear to be functioning more as fibroblasts than as SMC [61]. The increase in steady-state RNA levels for type IV collagen is not shared by similarly treated fibroblasts and may provide a

useful marker for SMC in culture [62]. Collagen synthesis by cultured rabbit aortic SMC at the protein and mRNA levels undergo a change in phenotypic state; upon modulating to the synthetic phenotype, SMC synthesised 25-30 time more collagen than did contractile cells [63]. At the same time, non-collagen-protein synthesis increased only 5-6 fold. Phenotypic modulation was also associated with an alteration in the relative proportions of type I and III collagens synthesised: contractile SMC synthesise 78.1 % type I collagen and 17.5 % type III collagen while synthetic cells synthesise 90.3 % type I collagen and 5.8 % type III collagen. Enrichment in type I collagen was similarly noted at the mRNA level. On return to the contractile state, at confluency, collagen production and the percentage of type I collagen decreased [63]. This further illustrates the close association between the phenotypic state of SMC and their collagen-biosynthetic phenotype.

Elastin is a critical regulatory molecule that regulates the phenotypic modulation, proliferation and migration of SMCs [64]. Elastin expression and SMC proliferation are inversely coupled: powerful stimulators of cell proliferation may potentially inhibit elastin expression and strong inhibitors of cell proliferation may stimulate elastin expression [64,65]. Moreover this proliferation may change in atherosclerosis. Elastin was found to be expressed maximally at the G₀ and minimally at the G₂/M phase, suggesting that its expression is regulated by the growth state [66]. NO, an endothelium-dependent relaxing factor, continuously produces NO synthetase in the endothelium. Endothelial dysfunction decreases NO release, resulting in a shared process involving the pathogenesis of atherosclerosis and neointima formation after angioplasty. It has been demonstrated that NO inhibits SMC proliferation, while enhancing elastin expression [67]. Endothelin-1, a potent vasoconstrictor, has been isolated from cultured porcine aortic endothelial cells. Endothelin-1 is known as a powerful stimulator of cell proliferation and of the development of arterial diseases such as atherosclerosis. It has been demonstrated that endothelin-1 stimulates cell proliferation and suppresses the elastin expression. The inhibition of elastin synthesis is completely prevented by an endothelin receptor A antagonist. Thus, endothelin-1 can modulate elastin mRNA expression *via* endothelin receptor A in cultured SMC, and regulators of elastin expression may play an important role in SMC proliferation during the development of atherosclerosis [68].

In vitro experiments have demonstrated that the extracellular matrix influences the morphology and metabolic properties of mesenchymal cells through chemical and physical effects. Fibronectin has been reported to accelerate the morphological modulation of SMC from the contractile state to a synthetic state [69] whereas laminin may have the opposite effect while helping to maintain the contractile state of SMC [48]. The relationship between growth factor and integrin signalling pathways in VSMCs has been analysed and the results show that integrin-signalling pathways have a profound effect on VSMC proliferation and phenotype and that focal adhesion kinase (FAK) is an important intermediate in

these signalling pathways [70]. Mechanical confinement by the extracellular matrix surrounding itself shows regulating effects on the activity of fibroblasts [71]. Thus, a cell might create an environment which then acts back on the cell itself and perhaps also on its neighbours. Aortic SMC from several species have been shown to produce and accumulate significant amounts of extracellular collagen and elastin when grown in culture (for review see Franzblan & Faris 1982, [72]). It is well known that cultured SMC proliferate in response to a variety of growth factors, including epidermal growth factor (EGF) [73], platelet-derived growth factor (PDGF) [74] and fibroblast growth factor (FGF) [75]. PDGF alone stimulates SMC migration, whereas proliferation of SMC requires additional growth factors [74]. The interactions of growth factors and ECM may also play an important role in the response of SMC to injury and subsequent vessel reconstruction. *In vitro* studies have shown that SMC proliferation is modulated in the presence of ECM. Thrombospondin, a glycoprotein component of the ECM, acts synergistically with EGF to stimulate SMC proliferation, an effect which is inhibited by heparin [76]. Heparin also inhibits SMC migration [77]. Heparin and related compounds can inhibit cell proliferation [78] by maintaining cells in the G₁ phase [79]. Heparin can also modulate the biosynthetic phenotype of SMC, particularly the biosynthesis of collagens [80].

In an effort to ascertain the mutual interaction between changing functional properties of SMC and changing composition of the ECM during pathogenesis of atherosclerosis the behaviour of vascular SMC has been studied in different collagen matrix. The advantage of the three-dimensional culture system is that it more closely simulates the *in vivo* environment than two-dimensional cultures [81-83]. Cultivation of SMC within a collagen lattice results in the suppression of cell proliferation and reduction of collagen synthesis as well as total protein synthesis, although cells exist in the synthetic state as cytoplasm is filled by organelles such as endoplasmic reticulum, Golgi complex, and abundant mitochondria [84]. This suggests that synthetic state SMC can exhibit differential biosynthetic activity dependent on the actual matrix environment. In fact, the structure and composition of the extracellular matrix has been shown to have a significant influence on the proliferation, differentiation, and phenotypic expression of cells [85]. Under conditions of hypertension, arterial SMC appear to respond to the increases in wall tension by increasing elastin and collagen synthesis [86,87]. The accumulation of these matrix fibres in the artery wall has been shown to bear a linear relationship to tangential tension. Aortic SMC in tissue culture respond to increased tension both by proliferation and by increased matrix synthesis. Elastin growth substrate increases cholesteryl ester synthesis and induces foam-cell formation by smooth muscle cells in culture [88]. Since elastin binds lipids in arteries [88], it is likely that a similar lipid-elastin binding occurs *in vitro* and that the uptake of hyperlipemic LDL is bound to elastin [89]. On the other hand, 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors reportedly suppress SMC growth and arterial neo-intimal thickening;

that is, lovastatin and simvastatin predominantly decrease the expression of the glycoprotein thrombospondin-1, which is functionally associated with SMC migration and proliferation. By contrast, expression of plaque-stabilization, extracellular proteins such as collagen type I and biglycan are much less affected [89]. Another example is that fibronectin and type I collagen were significantly decreased by the transcription factor NK-104 [90]. In addition, vascular statins act directly on the blood-vessel walls to stabilize plaques already formed [91].

The extracellular matrix surrounding VSMCs is also considered a cell-cycle control element in atherosclerosis [92]. Infection of the aorta with adenoviruses encoding a constitutively active mutant of the retinoblastoma protein (pRb) leads to a dramatic prevention of SMC intimal lesion after balloon injury [93]. These results demonstrate that VSMCs proliferation, as in most cell types, is controlled by phosphorylation of pRb and pRb is phosphorylated by the G1 phase cyclin-dependent kinases (cdks) [93]. These enzymes are typically expressed constitutively, but they are inactive in the absence of their cyclin partners. It now seems that mitogenic growth factors and the ECM are required for cell proliferation because they allow for G1 phase induction of cyclin D-cdk 4/6 and cyclin E-cdk2 kinase activities and the matrix is further required for translation of the mRNA [92]. The selective inhibition of ECM, presumably by blocking the integrin-signalling cascade that the ECM controls, would therefore be one means of inhibiting both Rb phosphorylation and VSMC proliferation. Cyclin D1 is considered an attractive target because its expression is ECM-dependent and it (together with cdk 4/6) plays an essential role in pRb phosphorylation [92]. Moreover integrins are involved in maintaining active ERK (subfamily of MAP kinase) in G1 phase, it has been suggested that integrin-dependent activation of MAP kinase (mitogen activated protein kinase) may play an important role in the adhesion-dependent expression of cyclin D1 and phosphorylation of pRb in VSMCs. Also, change in the nature of the VSMC extracellular matrix and/or integrins that are expressed by VSMCs may therefore affect MAP kinase activity, cyclin D1 expression, pRb phosphorylation and, ultimately, cell proliferation [92].

Vascular SMC Proliferation and Apoptosis

The fact that SMC proliferation is a key feature of atherosclerotic plaque formation suggests reduced apoptosis (programmed cell death) in the diseased tissue. In fact, atherosclerosis is a disease of cell proliferation and cell death. When vessels remodel under either physiological or pathological conditions, apoptosis and cell proliferation are intimately coupled. However, vascular atrophy in aneurysm formation is accompanied by excessive apoptosis. Thus, too little or too much apoptosis within the vessel wall may be deleterious [94]. The normal adult artery shows very low levels of SMC turnover and hence low apoptotic and mitotic indices [95]. In SMC from diseased tissue, additional factors are present, both locally, such as transcription factors and their co-regulators involved in the early stages of vascular diseases.

Vascular lesions arise in part from excessive accumulation of vascular smooth-muscle cells (VSMCs) in the intima attributed to increased migration and proliferation of VSMCs [96]. Apoptosis has been postulated to play a central part in plaque development [97]. There is now much evidence that VSMC apoptotic cell death occurs in the vasculature in both physiological as well as pathological contexts and that these deaths are regulated by proteins that serve either to induce or protect against apoptosis. This results in sensitivity to apoptosis that is determined by expression of cell-death receptors and ligands as well as by the presence and response to survival cytokines, mitogens, and local cell and matrix interactions [94]. Thus, growth arrest often triggers resistance to apoptosis in response to specific signals, and in some cases cells may undergo apoptosis at defined points in the cell cycle [98]. There is ample evidence suggesting that genes that act to regulate the cell cycle, when mutated also induce death or profound growth arrest [94]. Thus, exposure of VSMC to inflammatory cytokines and other cytokines such as platelet-derived growth factor and -FGF initiates a mitogenic signal within the VSMC, but if a survival signal is not present, the cells enter non-proliferation and apoptosis.

Apoptosis of macrophages is present mainly in regions showing signs of DNA synthesis or repair; however, SMC apoptosis is present primarily in less cellular regions not associated with DNA synthesis/repair [99]. Furthermore, SMC loss diminishes the biosynthesis of interstitial collagen fibres [100]. SMC can disappear in the plaque *via* apoptosis [101], drastically reducing the type I collagen synthesis and thereby greatly affecting plaque stability. Moreover, apoptotic SMC in the plaque, often not scavenged, could be the main source of the calcifying matrix vesicles [101], and these matrix vesicles could lead to plaque calcification. Apoptotic SMC can also increase the plaque thrombogenicity [102]. Thus, apoptosis of SMC in primary atherosclerosis plaque could be detrimental for plaque stability, thereby augmenting the risk for thrombosis [99].

The current knowledge of the occurrence of and mechanisms underlying VSMC apoptosis in atherosclerosis, arterial remodelling, and plaque rupture has been reviewed [103]. Apoptosis is regulated by the interaction between cell-surface signals, (death receptors and survival cytokines) and the expression of specific intracellular gene products: proto-oncogenes, tumour-suppressing genes and the Bcl-2 family of genes. The TNF-receptor (TNF-R), (tumour necrosis factor receptor) family of death receptors are type I membrane proteins, -TNF-R 1 (p55), Fas (CD95)- and death receptors (DR)-3, 4 (TRAIL R 1) and 5 (TRAIL R 2) that consist of an extracellular domain, a hydrophobic transmembrane domain, and a cytoplasmic domain, containing the death domain, a protein motif responsible for protein-protein interactions with adapter molecules. A ligand binding to a receptor recruits an adapter molecule, FADD (factor associated death domain) (to Fas), TRADD (TNF-R1 associated death domain) (to TNF-R1) or RIP (receptor interaction protein) (to both), to the receptor, which then activates a cascade of cysteine proteases (caspases), leading to cell death. Apoptosis is

also regulated by the expression of specific intracellular proteins such as the Bcl-2 family of proteins. Bcl-2 is a membrane protein which protects against the stimuli that induce apoptosis. Bcl-2 family members can homodimerise or heterodimerise with other family members, such as the proapoptotic proteins Bax, Bad or Bik, and the balance of expression between family-family members can cause predisposition to or provide protection against apoptosis. VSMCs express many of the known caspase family members required to execute apoptosis [104,105]. However, the importance of any particular pathway regulating apoptosis depends upon the cell type and the stimulus for apoptosis. Thus, different pathways may be responsible for inducing apoptosis in VSMCs at different stages of the disease [103].

There is good evidence that the phenotype of plaque VSMCs are senescent. Populations of plaque VSMC show increased hypophosphorylated pRb (the active form), which may account for their slow proliferation and senescence [94]. However, whenever these cells are stimulated to proliferate, for example by virus gene products or elongation factor-1 (E2F-1), cells undergo massive apoptosis, partly mediated by p53 [106]. However, p53 alone does not induce apoptosis in either normal human or rat VSMCs *in vitro* or *in vivo* unless the cells are primed to die [98] or massive expression is used *via* adenovirus vectors [107]. The role of p53 in atherosclerotic lesion development might be associated with its function in controlling cell replication, and p53-independent mechanisms can mediate the apoptotic response in atherosclerosis [108]. This indicates that the effect of p53 in VSMC biology in atherosclerosis may be growth arrest rather than the induction of apoptosis [109]. However, stabilisation of p53 may sensitise the cells to other apoptotic triggers such as Fas ligand. *In vivo*, plaque VSMCs show increased expression of p53 and p21, the cell-cycle inhibitor expressed upon stabilisation of p53. Moreover, cells which express p53 and p21 do not express proliferative markers such as ki67, suggesting that these cells are a non-proliferative, basal expression, and the activity of p53 in plaque and normal VSMCs is similar [98]. It is possible that a combination of profound growth arrest and lack of survival signals, complexed with proliferative stimuli generated by inflammatory cytokines or mitogens, may lead to the sensitisation of VSMC to apoptotic triggers [94].

REGULATION OF TARGET GENES INVOLVED IN THE TRANSFORMATION OF VSMC INTO FOAM CELLS

Regulation of Cholesterol Synthesis and Cellular Uptake

Because an important characteristic of the VSMC transformation into foam cell is the accumulation of cholesterol inside, it would be worthwhile to examine gene regulation of both cholesterol synthesis and cellular uptake. The metabolism of cholesterol is highly regulated, and a cholesterol-rich diet leads to high levels of cholesterol in liver cells, repressing the synthesis of receptors for low-density lipoprotein (LDL), thereby raising the concentration of cholesterol in the bloodstream. Joe Goldstein and Mike Brown have worked

for over 30 years on the molecular basis of cholesterol homeostasis. Through the systematic use of genetic, biochemistry, molecular biology and cell biology, they have identified a complex set of interacting molecules that work in coordination to regulate cholesterol import and synthesis [110]. Moreover, cholesterol, together with sphingomyelin, forms plasma membrane rafts or caveola, which are sites where signalling molecules are concentrated [111,112]. The important role that cholesterol play in modulating fluidity and phase transitions in the plasma membrane of animal cells is well known [113]. A review by Liscum and Underwood [114] reports works on cellular cholesterol distribution, membrane cholesterol domains, and the intracellular trafficking of cholesterol. Thus, cholesterol homeostasis is controlled by a feedback regulatory system that senses the level of cholesterol in cell membranes and modulates the transcription of gene-encoding enzymes of cholesterol biosynthesis and uptake from plasma lipoproteins. The enzymatic reactions necessary for the biosynthesis of cholesterol from acetate were studied long ago [115,116] Feed-back repression of 3-hydroxy 3-methyl glutaryl Co A (HMG-CoA) reductase, the rate-limiting step in cholesterol and polyisoprenoid biosynthesis, has been reported with the earliest examples in mammals. Hepatic synthesis of cholesterol decreased when dogs were fed excess dietary cholesterol [117], while in chicken it has been demonstrated that the shunt pathway of mevalonate not leading to sterol is regulated by cholesterol feeding in a reverse fashion to the sterol pathway [118]. Cholesterol and its hydroxylated derivative, 25-hydroxycholesterol (25HC) inhibit cholesterol synthesis, the inhibitory actions of cholesterol require the 3-hydroxyl group and the 25HC is more potent than cholesterol [119]. Oxysterols can function as a feed-forward ligand that binds to and activates the nuclear hormone receptors LXR_a and LXR_b [120].

In a rat aortal SMC culture model –including contractile, synthetic, and transformed cells– it been shown that increased cholesterol biosynthesis associated with phenotypic changes [121] plus dedifferentiation in arterial SMC *in vitro* are associated with decreased intracellular cholesterol efflux and also a decrease in high-affinity binding sites for native high-density lipoprotein (HDL) [122]. A high-cholesterol diet not only decreases cholesterol synthesis but also leads to transformation of aortic SMC. A culture model of SMC, isolated from arteries of cholesterol-fed chicks (Ch-SMC) and from control-fed chicks (C-SMC), under the same culture conditions is suitable for the study of SMC transformation into foam cells *in vitro* induced by cholesterol diet *in vivo* and before to the plaque formation. Intracellular cholesterol concentrations is the same in C-SMC and Ch-SMC during the first 14 days of culture; however, Ch-SMC developed the characteristics of macrophage-like foam cells after 30 days in culture with identical maintenance as in the C-SMC culture [8]. A recent work describes a process of trans-differentiation of mouse aortic SMC to a macrophage-like foam-cell state after cholesterol loading *in vitro* [124]. The result of this work agree with the *in vivo/in vitro* transformation of SMC in chick after cholesterol-rich diets [8]. Other cell-culture models use different additional elements in the

culture to obtain foam cells *in vitro*, such as an elastin substrate [88] or lipid droplets isolated from cultured macrophages [123]; also water-soluble cholesterol:methyl- β -cyclodextrin complexes are used, as are cyclic polysaccharides that can enhance the solubility of hydrophobic compounds such as cholesterol [124]. In the chicken SMC *in vivo/in vitro* model, the two lines of SMC cultures C-SMC and Ch-SMC exhibit marked differences in their proliferation, as well as their DNA, RNA, and protein synthesis [8]. Lipid synthesis (especially cholesterol and the effects of inhibition on the first step in the cholesterol biosynthesis also show marked differences [125]. Moreover, young Ch-SMC and C-SMC cultures present alterations in HMG-CoA reductase activity and gene expression at the transcriptional level as soon as 4 h after feeding the cells, while the reductase mRNA concentration in Ch-SMC was almost 50% lower after feeding the cells for 8 h [126]. However, this increase of reductase mRNA concentration in senescent cultures was lower and showed small changes after feeding [126]. In the mouse SMC cholesterol-loaded model [124] evaluations have been made of the *in vitro* early phenotypic change at the molecular level as the cholesterol content of SMC increased, and at the protein and mRNA levels, the rapid phenotypic change was associated with a decline and rise, respectively, in the expression of SMC and macrophage-related genes. Furthermore, the change in protein and gene expression were associated with the acquisition of macrophage-like functional properties. Thus, the results for the *in vivo/in vitro* model of transformation of chicken aortic SMC [8] agree with the suggestion of the transdifferentiation SMC *in vitro* model [124], in the sense that foam cells of neointimal lesions identified as macrophages by immunostaining with macrophage markers could have a SMC origin.

Sterol Regulatory Element-Binding Proteins

The endocytic pathway involved in the cellular uptake of cholesterol LDL [127,128] has been identified and characterized, as has the subsequent repression of HMG-CoA reductase and cholesterol synthesis [127-129]. A major breakthrough for understanding the mechanism involved in feedback repression came when the gene encoding the LDL receptor was isolated, the promoter of this gene being shown to contain a 10-bp cis element that was named sterol regulatory element 1 (SRE-1) [127,129,130]. The activity of an LDL receptor promoter-reporter gene increased when the transfected cells were incubated in cholesterol-free medium but decreased when LDL or oxysterols were added to this lipid-poor medium [130]. Mutation of the SRE-1 motif resulted in a defective reporter gene that was not activated when cells were incubated in sterol-depleted medium [127,130]. Such studies eventually led to the purification and cloning of a family of transcription factors termed sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs) that bind to the SRE-1 (or to one of the many variants) and activate transcription [127,129]. SREs function as conditional positive elements that are necessary for activated transcription in sterol-deprived cells. The SREs are not required for the basal transcription that occurs in cholesterol-loaded cells.

The SREBPs were identified by two groups working on cholesterol metabolism [131,132] and fat-cell differentiation [133]. Several reviews have been published on this topic [127,129, 134,135]. Studies have demonstrated that there are three major SREBP isoforms encoded by two different genes. The SREBPs must be released proteolytically from membranes to act [127]. A review that summarizes the progress in understanding the SREBPs and the sterol-regulated proteases that release them has been reported [136]. Three SREBPs has been demonstrated, two of the three major isoforms are produced from the SREBP-1 gene, which contains two promoters, transcription from each promoter produces an mRNA with a unique first exon that encodes one of the alternative amino termini referred to as 1a and 1c, respectively [138]. These alternate exons are attached during mRNA splicing to a common second exon in the same reading frame, and therefore the remaining protein-coding information of both isoforms is identical. There is alternative mRNA splicing at the 3'-end as well [139], but this does not appear to be conserved in all mammalian species and its functional significance remains unclear. By contrast, mRNAs produced through alternative promoter usage at the 5'-end yield proteins with significant differences in their capacity to activate gene expression [140]. The longer amino-terminal region in SREBP-1a contains a high percentage of acidic amino acids that make it a potent transcriptional activation domain. The SREBP-1c isoform is a much weaker activator of gene expression because it lacks 29 acidic amino acids present in 1a.

Different tissues express different ratios of SREBP-1a and 1-c. It is possible that the more active 1a isoform is preferentially expressed when there is a high demand for cholesterol and fatty acids such as when new membrane is required during periods of rapid cell division, suggesting that this transcription factor and their co-regulators are involved in the early stages of vascular diseases where there are a high SMC proliferation and before cholesterol-loaded cells appear. SREBP-1a stimulates gene expression *in vitro* and in cultured cells by interacting with the transcriptional co-activators CBP and P300 [141,142]. These are long, ubiquitous transcriptional co-activator proteins that are recruited to specific promoters through binding to activation domains of several DNA-binding transcription factors in addition to SREBPs [143]. In the cholesterol-biosynthesis pathway, well-defined target genes include HMG-CoA synthase, HMG-CoA reductase, farnesyl diphosphate synthase, squalene synthase [144]. The targets in the fatty acid and triglyceride biosynthetic pathways include acetyl-CoA carboxylase, fatty acid synthase, stearoil-CoA desaturase, and glycerol-3-phosphate acyltransferase [127,144,145]. SREBP-2 were evaluated in porcine and human SMC and vascular wall from normolipid and hyperlipemic pigs. SREBP-2 gene expression was significantly decreased in the vascular wall of diet-induced hypercholesterolemic swine [146], this work suggesting the involvement of SREBP-2 in LDL-modulated expression of cholesterol biosynthesis enzymes in the vascular wall. Atherogenic levels of native LDL (nLDL) down-regulate vascular endothelial CYP51 mRNA levels through a

reduction in SRE-SREBP-2 interaction [147]. Additionally, SREBP-2 and CYP51 mRNA levels were decreased in the arterial wall of hypercholesterolemic pigs [147].

SREBP-1 and -2 have been studied mainly in rodents in which lipogenesis was regulated in both liver and adipose tissue. In birds, lipogenesis occurs essentially in the liver as in humans. Before the study the role of SREBP in lipid metabolism regulation in chicken, it is of interest to note the sequence of the cDNA, encoding the mature nuclear form of chicken SREBP-2 protein, mapped SREBP-1, and SREBP-2 [148]. The predicted chicken SREBP-2 amino acid sequence shows a 77 to 79 % identity with human, mouse, and hamster homologues, with nearly perfect conservation in all the important functional motifs, as in the human genome, SREBP-1 and SREBP-2 chicken genes are located on two separate chromosomes, respectively, microchromosome 14 and macrochromosome 1. Tissue-expression data show that SREBP-1 and SREBP-2 are expressed in a wide variety of chicken tissues [148]. In human it has been postulated that single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the SREBP-2 gene might influence lipid parameters and the risk of coronary atherosclerosis [149]. A significant association was found between the 1784 G C polymorphism and intima-media thickness (IMT) measured in 497 subjects. Thus, a common variation in the SREBP-2 gene is related to early-stage carotid atherosclerosis in subjects with a cardiovascular risk without detectable change in plasma-lipid levels. A study was made of the insertion/deletion (Ins/Del) and XbaI polymorphisms of the apolipoprotein B (APOB) gene and the -36deIG polymorphism in the SREBP-1a gene in 298 patients with coronary artery disease (CAD) and 188 healthy control. A significant interaction between APOB and SREBP-1a polymorphisms was observed in the patient sample in total cholesterol (TC, $p=0.005$) and in LDL-C ($p=0.019$) levels [150]. By a search for mutation or polymorphisms within the sequences of the SREBP-1a gene critical for the synthesis and/or activity of the protein in 204 asymptomatic men, a single G deletion at base pair -36 of the translation initiation site (designated G-) was found using single-strand conformation polymorphism (SSCP) [151]. This new marker has been assessed for its influence on the lipid parameters of 812 men at high cardiovascular risk, and on the presence of echographic atherosclerotic plaque in their peripheral arteries [151].

The SREBPs also enhance transcription of the LDL receptor, which mediates cholesterol uptake from plasma lipoproteins. Over-expression of the NH₂-terminal nuclear domains of SREBPs also elevates mRNAs, encoding many others enzymes required for lipids synthesis, including enzymes that generate acetyl CoA and reduced pyridine nucleotides [152]. When sterols build up within cells, the proteolytic release of SREBPs from membranes is blocked. The NH₂-terminal domains that have already entered the nucleus are rapidly degraded in a process that is blocked by proteasome inhibitors [153], the consequence being that the transcription of all of the targets genes declines. This decline is complete for the cholesterol biosynthetic enzymes, the tran-

scription of which depends entirely on SREBPs. The decline is less complete for the fatty acid biosynthetic enzymes for which the basal transcription can be maintained by other factors [154]. To enhance transcription of the gene-encoding enzymes of cholesterol and fatty acid biosynthesis, the active NH₂-terminal domains of SREBPs cleavage by site-1 protease (S1P) and site-2 protease (S2P). Sterols block the proteolytic release process, inhibiting cleavage by S1P directly and S2P indirectly. Site-1 cleavage is regulated by a SREBP cleavage-activating protein (SCAP), a regulatory protein that activates S1P and also serves as a sterol sensor, losing its activity when sterols over-accumulate in cells. These regulated proteolytic cleavage reactions are ultimately responsible for controlling the level of cholesterol in membranes, cells, and blood [136].

SREBP Cleavage-Activating Protein

SCAP is an integral membrane protein and the target for sterol suppression of S1P cleavage. Sterols normally suppress S1P activity by interacting with SCAP [137]. Transport of the SCAP/SREBP complex from the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi is the central event mediating the cholesterol-feedback process in mammalian cells. Integrin activation and fluid shear stress can modulate the activity of SREBPs in vascular endothelial cells. Mechanistically, the transport of SCAP from the endoplasmic reticulum to the Golgi body requires the actin-based cytoskeleton [155]. An insulin-induced gene (INSIG) retention protein were identified as ER resident proteins that bind the SCAP/SREBP complex and promote its ER retention when cells are treated with sterols [156]. A conformational change in SCAP is a crucial step when cholesterol levels are high; the conformation of SCAP enables the SCAP-SREBP complex to associate with the INSIG-retention protein in the ER when cells are treated with sterols [157]. By contrast, when cholesterol levels are low, SCAP switches to a conformation that enables dissociation of the retention protein and the association of SCAP-SREBP with COPII vesicles [157]. The enhancement of the SREBP-mediated cholesterol metabolism may contribute to vascular endothelial cell functions under flow and probably the SMC transformation in the early stages of atheromatose plaque formation.

Sterol-resistance mutations of SCAP fall within a 160-aa segment, which comprises five of the eight membrane-spanning sequences of SCAP, termed the sterol-sensing domain. A similar stretch of five membrane-spanning sequences has been identified in three other proteins, each of which is influenced by cholesterol [158]. A sterol-sensing domain is found in the membrane-attachment region of the ER enzyme, HMG-CoA reductase [159]. This domain is responsible for the enhanced degradation of HMG-CoA reductase that occurs when oxysterols are added to the cell [160,161]. After the second cleavage of SREBPs, the mature proteins enter the nucleus, bind to SREs in the promoters of target genes, and activate transcription. However, such activation requires additional transcription factors. Activated genes identified to date include many that are involved in the control of cholesterol synthesis, LDL uptake, fatty acid syn-

thesis and desaturation, triglyceride synthesis, and glucose metabolism. Indeed, the list of SREBP target genes is rapidly growing. The nucleotide sequence that comprises a functional SRE can vary enormously, making it difficult to assign a consensus sequence that can be used to identify SREs [134].

Therapeutic Strategies Via SREBP

A recent study identified a new class of compounds designated as SCAP ligands, which presumably bind to SCAP, leading to increased LDL-receptor (LDLR) expression. The effects of SCAP ligand GW707 in comparison with lovastatin and cytokine oncostatin M (OM) on the regulation of LDLR, provide the first evidence that higher levels of LDLR expression and function can be achieved through simultaneous stimulation of the SREBP-dependent pathways, suggesting a strategy to develop an adjunct therapeutic intervention utilizing both pathways [162]. The role of SREBP-2 on the influence of simvastatin on the antioxidant enzyme paraoxonase expression and serum of the paraoxonase levels has been reported [163]. Simvastatin upregulated the activity of the promoter of the paraoxonase gene, upregulation that could be blocked by mevalonate and other intermediates of the cholesterol biosynthetic pathway. Simvastatin increased SREBP-2 capable of binding to the paraoxonase. This is consistent with effects of simvastatin treatment, which have the potential of beneficially influencing anti-atherogenic mechanisms at the HDL level. The molecular mechanism of action of lowering cholesterol by statins is *via* SREBP activation. Although it is widely accepted that most clinical benefit gained with statins is a direct result of their lipid-lowering properties, there is still some debate as to whether statins contribute to the clinical outcome in vascular disease, or whether all the beneficial effects of statins are due simply to lipid-lowering. In fact, cholesterol-independent effects on various aspects of cardiovascular disease, including decreasing vascular inflammation and enhancing plaque stability has been reported [164]. Statins decrease the scavenger receptor CD40 expression and CD40-related activation of SMC, these effects being partially reversed by HMG-CoA reductase product L-mevalonate (MVA) and mediated by NO- or peroxisome proliferators-activated receptor (PPAR)- dependent pathways [165]. The inhibition of MVA synthesis by statins and consequently the prenylated-protein products signalling –signalling molecules in the cellular cycle— slow down SMC proliferation. Thus, because the transcription factors SREBP are involved not only in the regulation of both cholesterol synthesis and cellular uptake but also in the molecular mechanism of action of statins, further studies are needed to understand the full impact of statins therapy on each of these processes and whether these effects contribute to clinical benefits/side effects of statins and therefore help in the search for new potential drug targets for treatment of coronary syndromes and strokes.

SMC Scavenger Receptors

Another potential pharmacologic target is the metabolism of free-radical-mediated modification of low-density lipopro-

tein (LDL) to led highly oxidized lipoproteins. Oxidized low-density lipoproteins (ox LDL) play a role in atherogenesis [166] and induce a wide range of biological effects on SMC. Ox-LDL induces dramatic alterations in gene expression in aortic SMC. With the use of two commercial c-DNA microarray systems with a total of 35932 human genes, it has been demonstrated that ox-LDL elevates gene expression involved in cell-cell interactions, membrane transport, oncogenesis, apoptosis, and transcription; this decreases expression of genes responsible for protein and nucleic acid biosynthesis, lipid metabolism, and humoral responses [167]. In vascular smooth muscle, the same authors have identified transcripts for metastasis-related proteins (MB2) and SREC-II (a novel scavenger receptor), which have not previously been identified in vascular smooth muscle and which show a 12- and 3-fold increase in MB2 and SREC-II expression in response to ox-LDL, respectively [167].

Oxidative modification of LDL alters its structure allowing LDL to be taken by scavenger receptors. Scavenger receptor, a non-regulated receptor, recognizes the highly modified forms of LDL and is the responsible for the rapid lipoprotein uptake by intimal macrophages [168, 169, 170, 171]. SMC can also express the scavenger receptors, providing an additional link between oxidized lipoproteins and the formation of SMC-derived foam cells during atherogenesis [172]. The expression of the scavenger receptors SR-AI/II (acetyl low density lipoprotein receptor) [172], CD36 (macrophage scavenger receptor) [173], and LOX-1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor) in SMC has described [174]. Furthermore, the expression of scavenger receptor including SR-PSOX (scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized lipoprotein) in SMC-derived foam cells during atherogenesis and the influence of cytokines on the expression of SR-POX in SMC has been reported [175]. In human SMC, SR-PSOX is more strongly expressed than LOX-1 and SR-AI/II [176]. Moreover, SR-PSOX is governed by pathways other than those reported for SR-AI/II, which is stimulated by TNF- α , (tumour necrosis factor) IL-1 (interleukin 1) and IFN- γ (interferon γ) [177,178] and for LOX-1, which is stimulated by TNF- α [179]. In SMC debate persists as to whether SR-PSOX is more strongly expressed than LOX-1 [176] or whether SR-PSOX is undetectable and LOX-1 expression is prominent [180]. Although the techniques used were reverse transcriptase-PCR and immunohistochemical studies, respectively, on the other hand, the different stages of the atherosclerotic lesions from which the SMC were identified or the number of passages or the confluency of the SMC cultures could change the results.

The LOX-1 receptor and oxidized LDL induce apoptosis in SMC [181,182]. The role of the LOX-1 receptor and its soluble forms in atherogenesis have been reviewed [182]. LOX-1 is a type II membrane protein belonging to the lectin family of molecules, which can act as a cell-surface endocytosis receptor for atherogenic oxidized LDL. LOX-1 is initially synthesised as a precursor protein with an N-linked high mannose-type carbohydrate, which is further glycosy-

lated and processed into a mature form. LOX-1 expression is not constitutive, but can be induced by pro-inflammatory stimuli, such as tumour necrosis-factor alpha, transforming growth-factor beta and bacterial endotoxin, as well as angiotensin II, oxidized LDL itself and fluid shear stress. LOX-1 expression is detectable in cultured macrophages and activated vascular SMCs. *In vivo*, endothelial cells that cover early atherosclerotic lesions while intimal macrophages and SMCs in advanced atherosclerotic plaques can express LOX-1 [182]. LOX-1 and SR-PSOX may play important roles in atherogenesis and atherogenic plaque rupture. Moreover, LOX-1 can be cleaved, in part, and released as soluble molecules, suggesting the diagnostic significance of plasma soluble LOX-1 levels [182]. Exon 1b of CD36 promoter in human SMC is specifically transcribed in activated aortic SMC and expressed mainly in atherosclerotic plaques [183]. These authors suggest that switching to exon-1b transcription may be an important step for the activation of SMC and their conversion to foam cells, as well as the possibility of a novel anti-atherosclerotic therapy and the use of exon 1b as a marker of atherosclerosis. The human scavenger receptor BI (hSR-BI/CLA-1) has been identified as a receptor for human high-density lipoprotein (HDL) and may be expressed in human SMC [184]. Moreover, it may be modulated by the cytokine interferon-gamma (IFN-gamma), IFN-gamma inhibited the hSR-BI/CLA-1 protein expression, but not mRNA expression. This observation confirmed that selective cholesterol ester uptake from HDL was inhibited by IFN-gamma. The protective effect of HDL is thought to involve the reverse transport of cholesterol from cells in the arterial wall to the liver for disposal, as hSR-BI/CLA-1 bind HDL and mediate the selective uptake of HDL lipids, this scavenger receptor could be important in atherogenesis.

NUTRITIONAL CONTROL AND GENE REGULATION

Many clinical trials have demonstrated the benefit of lipid-lowering for the prevention of coronary heart disease. The intervention studies have shown that some hypolipidaemic and hypotensive drugs such as fibrates, HMG-CoA reductase inhibitors, angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors and Ca-antagonists prevent atherosclerosis. The effects of these drugs on the arterial wall have very recently been reviewed [185]. Statin therapy low LDL-cholesterol and its consequences, including plaque stabilization, decrease the inflammatory process, slow the progression of plaque, and exert anti-thrombotic effects. However, the evaluation of statin effects has given conflicting results [186]. By inhibiting L-mevalonic acid synthesis, statins also prevent the prenylation of small-GTP-binding proteins such as Rho and Ras. In animal and *in vitro* models, the inhibition of Rho with statins depresses PPAR alpha activation and HDL production, diminishes Ca²⁺ stores in VSMC and stimulates VSMC apoptosis. However, most of these effects resulted from high statin concentrations, further evidence is needed for a full assessment of the clinical importance of isoprenylation blockage with therapeutic concentrations of statins [186].

The recognition that the regulation of cholesterol metabolism is linked with that of other metabolic pathways opens new perspectives for intervention at the nutritional-control level. A review by Gibbons [187], which includes the roles of the SREBP, LXR alpha, and PPAR in the coordination of cholesterol and fatty acid synthesis, describes how some of the results can best be interpreted by analysing the metabolic regulation of the pathway carbon fluxes. In fact, the regulation of SREBP gene expression in response to diet is a new area of investigation for metabolic control and lipid-lowering. Thus, in response to dietary intake, the SREBP gene regulation depends on changes in the levels of oxysterols, insulin/glucose, and polyunsaturated fatty acids (PUFAs). These transcription factors have been defined as key regulators of nutritional homeostasis and have important clinical implications relevant to hyperlipidaemia, diabetes and atherosclerosis. Two reviews examine the links between insulin resistance, PUFAs and SREBPs, with cholesterol, fatty acids, and glucose homeostasis [134,138].

It is known that a high-carbohydrate low-fat diet induces the expression of several lipogenic and glycolytic enzymes [188] and that these changes in gene expression are a consequence of the activation of SREBP-1c mRNA dependent on insulin [189]. However, the induction of mRNA for fatty acid synthase (FAS) requires an addition of insulin and a high level of glucose. SREBP-1c mRNA expression was activated during a fasting/refeeding regimen in normal animals [174,190]. A liver-specific transcript of INSIG-2 (insulin-induced gene 2) designated INSIG-2a, has been discovered [191], this transcript differing from the ubiquitous INSIG-2b in the use of different promoters. Although the INSIG-2a and -2b mRNAs encode identical proteins, they differ in regulation patterns. INSIG-2a is the predominant transcript in livers of fed animals, and it is selectively down-regulated by insulin; that is, INSIG-2a mRNA increases when mice are starved, and declines when they are re-fed [191].

As described above, SREBPs are involved in both lipogenesis and cholesterol homeostasis. The addition of excess cholesterol resulted in the inhibition of processing for membrane-bound precursors of both SREBP-1 and SREBP-2 [180,181]. Recently it has been demonstrated that the SREBP-2 gene is regulated by thyroid hormones and that increased nuclear SREBP-2 in hypothyroid animals results in the thyroid hormone-independent activation of LDL receptor-gene expression and in the reversal of the associated hypercholesterolaemia [192], this occurs without effects on other thyroid hormone-regulated genes. These authors propose that the decreased LDL receptor and increased serum cholesterol associated with hypothyroidism are secondary to the thyroid hormone effects on SREBP-2 and suggest that hypercholesterolaemia associated with hypothyroidism can be reversed by agents that directly increase SREBP-2 and that mutations or drugs that lower SREBP-2 would cause hypercholesterolaemia [192]. In animal-feeding studies the addition of polyunsaturated fatty acids (PUFAs) or fish oil to diets results in a significant suppression of the mRNA en-

coding the SREBP-1 genes [193-195]. Moreover, dietary PUFAs repress the cleavage of SREBP-1, but have no effect on SREBP-2 cleavage [196]. These results, indicate that when diet is supplemented with PUFAs or fish oil, a decline results in the mRNAs encoding the SREBP-1c gene and consequently the gene expression of lipogenic and glycolytic enzymes declines, the opposite results from those found with a high carbohydrate/low fat diet. These results agree with earlier studies in cultured cells, reviewed by Edwards *et al.* [134].

Plasma-cholesterol and -triacylglycerol levels increased in the duodenum of hamsters fed palm oil and decreased in animals ingested fish oil [197]. In the intestine, dietary PUFA suppressed SREBP-1c mRNA without altering the expression of its targets genes, fatty acid synthase, acetyl-CoA carboxylase, or ATP citrate lyase, however, fatty acid influx depresses intestinal fatty synthesis by a posttranscriptional mechanism independent of the SREBP pathway [197]. Elevated cholesterol found in human fibroblast, incubated with various natural sphingolipids (SLs), was derived primarily for LDL and resulted from up-regulation of LDL receptors induced by the cleavage of SREBP-1 [198]. These authors suggest a model in which excess SLs present in endocytic compartments serve as a "molecular trap" for cholesterol, leading to a reduction in cholesterol in the endoplasmic reticulum, induction of SREBP-1 cleavage, and up-regulation of LDL receptors. As noted above, the addition of excess cholesterol or PUFAs in experiments performed both in animals and in cultured cells resulted in the inhibition of processing for membrane-bound precursor forms of SREBP-1 and -2 or only SREBP-1. However, how SREBPs expression and activity are modulated by insulin signalling and dietary changes, and moreover, how SREBPs could be considered key regulators of nutritional control that could lead the transformation of SMC into foam cells are important topic that requires further studies and could be considered news targets for diagnostic and therapeutic of cardiovascular diseases.

Certain eicosanoids, such as PGI₁ and PGE₂, appear to maintain the endothelium in a quiescent state, characterized by a non-adhesive, non-thrombotic surface. They also appear to participate in maintaining SMC in a contractile state and to influence cholesterol metabolism in macrophages as well as SMC. However, leukotrienes, such as LTB₄ and LTC₄, appear to have proatherogenic effects. The influx of macrophages which express glucocorticoids regulated prostaglandin synthase and nitric oxide synthase, is likely to alter homeostatic process mediated by eicosanoids and NO. Studies with an inhibitor of thromboxane A₂ (TXA₂) synthesis resulting in a shift in metabolism from TXA₂ to PGE₂, suppressed lesion development in hypercholesterolaemic rabbits [199]. Endothelium-dependent relaxation, mediated by NO, is impaired in atherosclerotic arteries, and NO has an anti-proliferative effect on SMC in culture. Strong evidence for the importance of NO in atherogenesis was provided by a study showing that dietary supplementation of L-arginine, the substrate for synthesis of nitric oxide, reduce both the size and thickness of aortic lesions in cholesterol-fed rabbits

[200]. Advanced glycosylation end-products, associated with diabetes, block the cytostatic effect of NO on SMC, providing a link between diabetes and heart disease [201].

On the other hand, PUFAs and prostaglandin (PG) regulate the activities of PPAR. PPAR are nuclear receptors acting as transcription factors of numerous target genes after heterodimerization with the retinoid X receptor. Three types of PPAR have been identified: PPAR-alpha, PPAR-beta/delta and PPAR-gamma. PPAR-alpha is mainly involved in fatty acid oxidation, and PPAR-gamma is involved principally in fat-cell differentiation and insulin sensitivity, both expressed in VSMC. Activators of PPAR-alpha, such as fatty acids and fibrates as well as PPAR-gamma such as thiazolidinediones (TZDs) have been shown to exert antiproliferative effects, antagonize angiotensin II actions, and exert antioxidant activity by inhibiting the generation of reactive oxygen species [202]. TZDs (widely used as insulin-sensitising agents for the treatment of type 2 diabetes) induce caspase-mediated apoptosis in VSMC [203].

PPARs are involved in the regulation of the lipids metabolism in the vasculature, and inhibits VSMC migration and proliferation while affecting foam-cell formation by changing the expression of scavenger receptors [204]. A recent review [205] presented structure and tissue distribution of PPAR nuclear receptors and discussed the action and regulation mechanisms as well as its impact on the cardiovascular system, especially in insulin-resistance syndrome (syndrome X) including obesity, diabetes, hypertension, and dislipidaemia. Expression of PPARs may be involved not only in the progression of atherosclerosis but also in regression. PPAR-gamma and dual PPAR-alpha/gamma agonist improve insulin resistance and its dyslipidaemia, both in rodent and in man [205]. In VSMC can partially reverse possible atherogenic changes in the production of matrix proteoglycans induced by exposure to non-esterified fatty acids (NEFA) [206]. Transforming-growth-factor beta (TGF beta) can regulate PPAR gamma expression. TGF beta 1 and 2 exert a biphasic effect (early stimulation and late repression) on PPAR-gamma gene expression in VSMC. TGF beta rapidly and transiently induces early expression of growth-response factor-1 (Egr-1) through the mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase 1 (MEK 1)/ ERK-mediate pathway [207]. With regard to the TGF beta repression of PPAR-gamma expression, activator protein 1 (AP 1) dramatically inhibits the PPAR-gamma promoter activity [207].

Although PPAR-gamma ligands attenuate the increase in intima-media thickness in diabetic patients, although long-term effects remain to be seen. Recently, it has been reported that PPAR-gamma activators such as 15-deoxy-Delta (12,14) prostaglandin J₂ (15-d-PGJ₂) and TZDs activate extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) pathway through phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) and induce proliferation of VSMCs. It was shown that 15-d-PGJ₂ and TZDs activate the PI3-K / ERK pathway through Src family kinase and matrix metalloproteinase-dependent transactivation of EGF-R and PDGF-R. Both receptors appear to be associated

constitutively [208]. Activators of PPARs may become useful therapeutic agents in the prevention of cardiovascular disease in the prevention of carbohydrate and lipid metabolism. Some side effects such as weight gain as well as documented aggravation of advanced heart failure through fluid retention may, however, limit their therapeutic application in cardiovascular prevention [209].

With the increased understanding of the molecular and cellular interactions underlying atherosclerosis at the levels of the artery wall, new potential targets for pharmacological and nutritional intervention have been revealed. In particular, a large body of evidence implicates: extracellular matrix and cytoskeleton proteins, proliferation and apoptosis of SMC, as well as regulation of gene expression related to cholesterol uptake and metabolism leading to the transformation of SMC into foam cells. All this illustrates the complexity of pharmacologic intervention in atherosclerosis. There are promising strategies for inhibiting SMC dedifferentiation, proliferation, apoptosis, ECM synthesis and SREBP regulation modifying gene expression in the artery wall, not only to prevent the atheromatous plaque development but also to maintain the stability of the plaque in later atherosclerosis. Despite the complexity of the interactions in atherosclerosis, there are many opportunities to affect the homeostatic balance of the artery wall at SMC levels. We have considered here some of the possible targets for intervention with promising strategies for the nutritional control of the genes, and, in a general way, the possibilities for modulating the expression of genes influencing atherosclerosis.

ABBREVIATIONS

ACE	=	Angiotensin convertings enzyme	FADD	=	factor associated death domain
ACS	=	Acute coronary syndrome	FAS	=	Fatty acid synthase
AEC	=	Angiotensin convertings enzyme	FGF	=	Fibroblast growth factor
AP-1	=	Activator protein 1	25HC	=	25 hydroxycholesterol
APOB	=	Apolipoprotein B	HDL	=	High density lipoprotein
CAD	=	Coronary artery disease	HMG-CoA	=	3-Hydroxy 3-methyl glutaryl Co A
Cdks	=	Cyclin-dependent kinases	hSR-BI	=	Human scavenger receptor BI
Ch-SMC	=	SMC isolated from arterial of cholesterol fed chicks	IFN	=	Interferon
CXCL16	=	membrane-anchored chemokine directed to CXCR6-positive lymphocytes	IL-1	=	interleukina 1 α
C-SMC	=	SMC isolated from arterial of control fed chicks	IMT	=	Intima-media thickness
DR	=	Death receptors	INSIG	=	Insulin-induced gene
ECM	=	Extracellular matrix	LDL	=	Low density lipoprotein
E2F-1	=	Elongation factor-1	LDLR	=	LDL receptor
EGF	=	Epidermal growth factor	LOX-1	=	Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor
ER	=	Endoplasmic reticulum	LTB4	=	Leukotriene B4
ERK	=	Extracellular signal-regulated kinase 1	LTC4	=	Leukotriene C4
			LXR _a	=	Liver receptor X (nuclear hormone receptor)
			MAP	=	mitogen activated protein
			MB2	=	Metastasis-related protein
			MEK-1	=	Mitogen-activated protein kinase
			MMP2	=	Matrix metalloproteinase-2
			-MN	=	no muscle cytoskeletal protein
			MVA	=	Mevalonate
			NEFA	=	Non-esterified fatty acids
			NK-104	=	transcription factor
			nLDL	=	Native LDL
			ox-LDL	=	Oxidized low density lipoproteins
			OM	=	Oncostatin M cytokine
			PDGF	=	Platelet derived growth factor
			PG	=	Prostaglandin
			PGI1	=	Prostaglandin I1
			PGE2	=	Prostaglandin E2
			PI3-K	=	Phosphatidylinositol 3-kinase
			PPAR	=	Proliferators-activated receptor
			PRb	=	Retinoblastoma protein
			PUFAs	=	Polyunsaturated fatty acids
			TRADD	=	Receptor interaction protein
			SCAP	=	SREBP cleavage-activating protein

SIP	= Site-1 protease
SLs	= Sphingolipids
SMC	= Smooth muscle cells
SNPs	= Single nucleotide polymorphism
SR-AI/II	= Acetyl low density lipoprotein receptor
SRE-1	= Sterol regulatory element 1
SREBP	= Sterol regulatory element binding protein
SREC-II	= Scavenger receptor -II
SR-PSOX	= Scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized lipoprotein
SSCP	= single strand conformation polymorphism
TGF	= Transforming growth factor beta
THP-1	= macrophages
TNF-	= Tumour necrosis factor alpha
TRADD	= TNF-R1 associated death domain.
TSP-1	= Trombosponding-1
TXA2	= Thromboxane A2
TZDs	= Thiazolidinediones
VEC	= Vascular endothelial cells
VSMC	= Vascular smooth muscle cell

ACKNOWLEDGEMENT

Research in our laboratory is supported in part by grant from Instituto de Salud Carlos III del Ministerio de Sanidad y Consumo, Subdirección General de Investigación Sanitaria (PI030829) and also from the Research grant from Junta de Andalucía (Group code CTS168), Spain.

REFERENCES

- Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature*, **1993**, 362(6423), 801-809.
- Owens, G. K., Kumar, M. S., Wamhoff, B. R. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol. Rev.*, **2004**, 84(3), 767-801.
- Masuda, J., Ross, R. Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Fatty streak formation. *Arteriosclerosis*, **1990**, 10(2), 164-177.
- Masuda, J., Ross, R. Atherogenesis during low level hypercholesterolemia in the nonhuman primate. II. Fatty streak conversion to fibrous plaque. *Arteriosclerosis*, **1990**, 10(2), 178-187.
- Faggiotto, A., Ross, R., Harker, L. Studies of hypercholesterolemia in the nonhuman primate. I. Changes that lead to fatty streak formation. *Arteriosclerosis*, **1984**, 4(4), 323-340.
- Mora, R., Lupu, F., Simionescu, N. Prelesional events in atherogenesis. Colocalization of apolipoprotein B, unesterified cholesterol and extracellular phospholipid liposomes in the aorta of hyperlipidemic rabbit. *Atherosclerosis*, **1987**, 67(2-3), 143-154.
- Tsukada, T., Rosenfeld, M., Ross, R., Gown, A. M. Immunocytochemical analysis of cellular components in atherosclerotic lesions. Use of monoclonal antibodies with the Watanabe and fat-fed rabbit. *Arteriosclerosis*, **1986**, 6(6), 601-613.
- Carazo, A., Alejandre, J., Diaz, R., Rios, A., Castillo, M., Linares, A. Changes in cultured arterial smooth muscle cells isolated from chicks upon cholesterol feeding. *Lipids*, **1998**, 33(2), 181-190.
- Davies, M. J., Woolf, N., Rowles, P. M., Pepper, J. Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Br. Heart J.*, **1988**, 60(6), 459-464.
- Majesky, M. W., Daemen, M. J., Schwartz, S. M. Alpha 1-adrenergic stimulation of platelet-derived growth factor A-chain gene expression in rat aorta. *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265(2), 1082-1088.
- Nilsson, J., von Euler, A. M., Dalsgaard, C. J. Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. *Nature*, **1985**, 315(6014), 61-63.
- Moncada, S.; Higgs, E. A. *Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system*, Elsevier Science Pub. Co.: New York, **1990**.
- Sjolund, M., Hedin, U., Sejersen, T., Heldin, C. H., Thyberg, J. Arterial smooth muscle cells express platelet-derived growth factor (PDGF) A chain mRNA, secrete a PDGF-like mitogen, and bind exogenous PDGF in a phenotype- and growth state-dependent manner. *J. Cell. Biol.*, **1988**, 106(2), 403-413.
- Campbell, J. H., Campbell, G. R. The role of smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, **1994**, 5(5), 323-330.
- Chamley-Campbell, J., Campbell, G. R., Ross, R. The smooth muscle cell in culture. *Physiol. Rev.*, **1979**, 59(1), 1-61.
- Bochaton-Piallat, M. L., Ropraz, P., Gabbiani, F., Gabbiani, G. Phenotypic heterogeneity of rat arterial smooth muscle cell clones. Implications for the development of experimental intimal thickening. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **1996**, 16(6), 815-820.
- Perez-Reyes, N., Halbert, C. L., Smith, P. P., Benditt, E. P., McDougall, J. K. Immortalization of primary human smooth muscle cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1992**, 89(4), 1224-1228.
- Dusserre, E., Bourdillon, M. C., Ciavatti, M., Covacho, C., Renaud, S. Lipid biosynthesis in cultured arterial smooth muscle cells is related to their phenotype. *Lipids*, **1993**, 28(7), 589-592.
- Frid, M. G., Moiseeva, E. P., Stenmark, K. R. Multiple phenotypically distinct smooth muscle cell populations exist in the adult and developing bovine pulmonary arterial media *in vivo*. *Circ. Res.*, **1994**, 75(4), 669-681.
- Lau, H. K. Regulation of proteolytic enzymes and inhibitors in two smooth muscle cell phenotypes. *Cardiovasc. Res.*, **1999**, 43(4), 1049-1059.
- Worth, N. F., Rolfe, B. E., Song, J., Campbell, G. R. Vascular smooth muscle cell phenotypic modulation in culture is associated with reorganisation of contractile and cytoskeletal proteins. *Cell Motil. Cytoskeleton*, **2001**, 49(3), 130-145.
- Huang, H., Kamm, R. D., So, P. T., Lee, R. T. Receptor-based differences in human aortic smooth muscle cell membrane stiffness. *Hypertension*, **2001**, 38(5), 1158-61.
- Hynes, R. O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, **1992**, 69(1), 11-25.
- Ruoslahti, E., Reed, J. C. Anchorage dependence, integrins, and apoptosis. *Cell*, **1994**, 77(4), 477-478.
- Ben-Ze'ev, A. Application of two-dimensional gel electrophoresis in the study of cytoskeletal protein regulation during growth activation and differentiation. *Electrophoresis*, **1990**, 11(3), 191-200.
- Campbell, G. R., Campbell, J. H., Manderson, J. A., Horrigan, S., Rennick, R. E. Arterial smooth muscle. A multifunctional mesenchymal cell. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **1988**, 112(10), 977-986.
- Mayne, R. In *Connective Tissue Disease: Molecular Pathology of the Extracellular Matrix*, Uitto, J.; Perejda, A.J., Eds.; Marcel Dekker, Inc.: New York, **1987**; pp.163-183.
- Hedin, U. Extracellular matrix components and integrins in the control of arterial smooth muscle cell structure and function. *J. Atheroscler. Thromb.*, **1994**, 1(Suppl. 1), S39-46.
- Hay, E. *Cell Biology of the Extracellular Matrix, 2nd Edition*. Plenum Press.: New York, **1983**.
- Hawkes, S., Wang, J. *The Extracellular Matrix*. Academic Press: New York, **1982**.
- Robert, L.; Labat-Robert, J.; Homebeck, W. In *Atherosclerosis Review*, Gotto, A. M.; Paoletti R., Eds.; Raven Press: New York, **1986**; pp. 143-170.
- Labat-Robert, J. In *Front Matrix Biology*, Labat-Robert, J. T. R.; Robert, L., Eds.; Karger: Basel, 1986; Vol. 11, pp. 17-29.
- Kleinman, H. K., Philp, D., Hoffman, M. P. Role of the extracellular matrix in morphogenesis. *Curr. Op. Biotech.* **2003**, 14, 526-532.

- [34] Liao, J. K. Endothelium and acute coronary syndromes. *Clin. Chem.*, **1998**, *44*(8 Pt 2), 1799-1808.
- [35] MacIsaac, A. I., Thomas, J. D., Topol, E. J. Toward the quiescent coronary plaque. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **1993**, *22*(4), 1228-1241.
- [36] Harris, E. D., Krane, S. M. Collagenases (second of three parts). *N. Engl. J. Med.*, **1974**, *291*(12), 605-609.
- [37] Lee, T., Esemuede, N., Sumpio, B. E., Gahtan, V. Thrombospondin-1 induces matrix metalloproteinase-2 activation in vascular smooth muscle cells. *J. Vasc. Surg.*, **2003**, *38*(1), 147-154.
- [38] Ross, R. Rous-Whipple Award Lecture. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. *Am. J. Pathol.*, **1993**, *143*(4), 987-1002.
- [39] Mulvany, M. J., Baumbach, G. L., Aalkjaer, C., Heagerty, A. M., Korsgaard, N., Schiffrin, E. L., Heistad, D. D. Vascular remodeling. *Hypertension*, **1996**, *28*(3), 505-506.
- [40] Owens, G. K. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol. Rev.*, **1995**, *75*(3), 487-517.
- [41] Tan, E. M., Glassberg, E., Olsen, D. R., Noveral, J. P., Unger, G. A., Peltonen, J., Chu, M. L., Levine, E., Sollberg, S. Extracellular matrix gene expression by human endothelial and smooth muscle cells. *Matrix*, **1991**, *11*(6), 380-387.
- [42] Turley, E. A. Extracellular matrix remodeling: multiple paradigms in vascular disease. *Circ. Res.*, **2001**, *88*(1), 2-4.
- [43] Chaponnier, C., Kocher, O., Gabbiani, G. Modulation of gelsolin content in rat aortic smooth muscle cells during development, experimental intimal thickening and culture. An immunohistochemical and biochemical study. *Eur. J. Biochem.*, **1990**, *190*(3), 559-565.
- [44] Asundi, V., Cowan, K., Matzura, D., Wagner, W., Dreher, K. L. Characterization of extracellular matrix proteoglycan transcripts expressed by vascular smooth muscle cells. *Eur. J. Cell Biol.*, **1990**, *52*(1), 98-104.
- [45] Dreher, K. L., Asundi, V., Matzura, D., Cowan, K. Vascular smooth muscle biglycan represents a highly conserved proteoglycan within the arterial wall. *Eur. J. Cell Biol.*, **1990**, *53*(2), 296-304.
- [46] Wight, T. N., Ross, R. Proteoglycans in primate arteries. I. Ultrastructural localization and distribution in the intima. *J. Cell Biol.*, **1975**, *67*(3), 660-674.
- [47] Ross, R., Klebanoff, S. J. The smooth muscle cell. I. *In vivo* synthesis of connective tissue proteins. *J. Cell Biol.*, **1971**, *50*(1), 159-171.
- [48] Burke, J. M., Balian, G., Ross, R., Bornstein, P. Synthesis of types I and III procollagen and collagen by monkey aortic smooth muscle cells *in vitro*. *Biochemistry*, **1977**, *16*(14), 3243-3249.
- [49] Layman, D. L., Epstein, E. H., Dodson, R. F., Titus, J. L. Biosynthesis of type I and III collagens by cultured smooth muscle cells from human aorta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1977**, *74*(2), 671-675.
- [50] Cavalot, F., Anfossi, G., Russo, I., Mularoni, E., Massucco, P., Mattiello, L., Burzacca, S., Hahn, A. W., Trovati, M. Nonenzymatic glycation of fibronectin impairs adhesive and proliferative properties of human vascular smooth muscle cells. *Metabolism*, **1996**, *45*(3), 285-292.
- [51] Hinek, A., Botney, M. D., Mecham, R. P., Parks, W. C. Inhibition of tropoelastin expression by 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Connect. Tissue Res.*, **1991**, *26*(3), 155-166.
- [52] Zern, M. A., Schwartz, E., Giambone, M. A., Blumenfeld, O. O. Ascorbate-generated endogenous extracellular matrix affects cell protein synthesis in calf aortic smooth muscle cells. *Exp. Cell Res.*, **1985**, *160*(2), 307-318.
- [53] Figueroa, J. E., Oubre, J., Vijayagopal, P. Modulation of vascular smooth muscle cells proteoglycan synthesis by the extracellular matrix. *J. Cell Physiol.*, **2004**, *198*(2), 302-309.
- [54] Meyers, C. D., Tannock, L. R., Wight, T. N., Chait, A. Statin-exposed vascular smooth muscle cells secrete proteoglycans with decreased binding affinity for LDL. *J. Lipid Res.*, **2003**, *44*(11), 2152-2160.
- [55] Corda, S., Samuel, J.L., Rappaport, L. Extracellular matrix and growth factor during heart growth. *Heart F. Rev.*, **2000**, *5*, 119-130.
- [56] Campbell, G. R., Campbell, J. H. Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis: implications for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp. Mol. Pathol.*, **1985**, *42*(2), 139-162.
- [57] Chamley-Campbell, J. H., Campbell, G. R., Ross, R. Phenotype-dependent response of cultured aortic smooth muscle to serum mitogens. *J. Cell Biol.*, **1981**, *89*(2), 379-383.
- [58] Seyama, Y., Wachi, H. Atherosclerosis and Matrix Dystrophy. *J. Atheroscler. Thromb.* **2004**, *11*, 236-245.
- [59] Thyberg, J., Nilsson, J., Palmberg, L., Sjolund, M. Adult human arterial smooth muscle cells in primary culture. Modulation from contractile to synthetic phenotype. *Cell Tissue Res.*, **1985**, *239*(1), 69-74.
- [60] McCullagh, K. A., Balian, G. Collagen characterisation and cell transformation in human atherosclerosis. *Nature*, **1975**, *258*(5530), 73-75.
- [61] Murata, K., Motayama, T., Kotake, C. Collagen types in various layers of the human aorta and their changes with the atherosclerotic process. *Atherosclerosis*, **1986**, *60*(3), 251-262. ⁶⁰ Murata, K.; Motayama, T. and Kotake, C. (1986) *Atherosclerosis*, *60*, 251-262.
- [62] Liao, G., Chan, L. M. Regulation of extracellular matrix RNA levels in cultured smooth muscle cells. Relationship to cellular quiescence. *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*(17), 10315-10320
- [63] Ang, A. H., Tachas, G., Campbell, J. H., Bateman, J. F., Campbell, G. R. Collagen synthesis by cultured rabbit aortic smooth-muscle cells. Alteration with phenotype. *Biochem. J.*, **1990**, *265*(2), 461-469.
- [64] Seyama, Y., Wachi, H. Atherosclerosis and matrix dystrophy. *J. Atheroscler. Thromb.*, **2004**, *11*(5), 236-245.
- [65] Tajima, S. In *Molecules to diseases*, Ninomiya, Y.; Olsen B.R.; Ooyama, T. Eds.; Japan Scientific Societies Press: Tokyo, **1998**; pp. 109-121.
- [66] Wachi, H., Seyama, Y., Yamashita, S., Tajima, S. Cell cycle-dependent regulation of elastin gene in cultured chick vascular smooth-muscle cells. *Biochem. J.*, **1995**, *309*(Pt 2), 575-579.
- [67] Sugitani, H., Wachi, H., Tajima, S., Seyama, Y. Nitric oxide stimulates elastin expression in chick aortic smooth muscle cells. *Biol. Pharm. Bull.*, **2001**, *24*(5), 461-464.
- [68] Wachi, H., Sugitani, H., Tajima, S., Seyama, Y. Endothelin-1 Down-Regulates Expression of Tropoelastin and Lysyl Oxidase mRNA in Cultured Chick Aortic Smooth Muscle Cells. *J. Health Sci.*, **2001**, *47*, 525-532.
- [69] Hedin, U., Thyberg, J. Plasma fibronectin promotes modulation of arterial smooth-muscle cells from contractile to synthetic phenotype. *Differentiation*, **1987**, *33*(3), 239-246.
- [70] Morla, A. O., Mogford, J. E. Control of smooth muscle cell proliferation and phenotype by integrin signaling through focal adhesion kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2000**, *272*(1), 298-302.
- [71] Thie, M., Schlumberger, W., Rauterberg, J., Robenek, H. Mechanical confinement inhibits collagen synthesis in gel-cultured fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.*, **1989**, *48*(2), 294-302.
- [72] Franzblau, C., Faris, B. Biosynthesis of insoluble elastin in cell and organ cultures. *Methods Enzymol.*, **1982**, *82*(Pt A), 615-637.
- [73] Majack, R. A., Cook, S. C., Bornstein, P. Control of smooth muscle cell growth by components of the extracellular matrix: autocrine role for thrombospondin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1986**, *83*(23), 9050-9054.
- [74] Bernstein, L. R., Antoniadis, H., Zetter, B. R. Migration of cultured vascular cells in response to plasma and platelet-derived factors. *J. Cell Sci.*, **1982**, *56*, 71-82.
- [75] Gospodarowicz, D., III, C. R. Do plasma and serum have different abilities to promote cell growth? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1980**, *77*(5), 2726-2730.
- [76] Majack, R. A., Bornstein, P. Heparin regulates the collagen phenotype of vascular smooth muscle cells: induced synthesis of an Mr 60,000 collagen. *J. Cell Biol.*, **1985**, *100*(2), 613-619.
- [77] Majack, R. A., Clowes, A. W. Inhibition of vascular smooth muscle cell migration by heparin-like glycosaminoglycans. *J. Cell Physiol.*, **1984**, *118*(3), 253-256.
- [78] Clowes, A. W., Karnowsky, M. J. Suppression by heparin of smooth muscle cell roliferation in injured arteries. *Nature*, **1977**, *265*(5595), 625-626.
- [79] Reilly, C. F., Kindy, M. S., Brown, K. E., Rosenberg, R. D., Sonenshein, G. E. Heparin prevents vascular smooth muscle cell progression through the G1 phase of the cell cycle. *J. Biol. Chem.*, **1989**, *264*(12), 6990-5.
- [80] Majack, R. A., Bornstein, P. Heparin regulates the collagen phenotype of vascular smooth muscle cells: induced synthesis of an Mr 60,000 collagen. *J. Cell Biol.*, **1985**, *100*(2), 613-619.
- [81] Bell, E., Ivarsson, B., Merrill, C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different

- proliferative potential *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1979**, 76(3), 1274-1278.
- [82] Nakagawa, S, Pawelek, P, Grinnell, F. Long-term culture of fibroblasts in contracted collagen gels: effects on cell growth and biosynthetic activity. *J. Invest. Dermatol.*, **1989**, 93(6), 792-8.
- [83] Schlumberger, W, Thie, M, Rauterberg, J, Kresse, H, Robenek, H. Deposition and ultrastructural organization of collagen and proteoglycans in the extracellular matrix of gel-cultured fibroblasts. *Eur. J. Cell Biol.*, **1989**, 50(1), 100-110.
- [84] Thie, M, Schlumberger, W, Semich, R, Rauterberg, J, Robenek, H. Aortic smooth muscle cells in collagen lattice culture: effects on ultrastructure, proliferation and collagen synthesis. *Eur. J. Cell Biol.*, **1991**, 55(2), 295-304.
- [85] Bissell, M. J, Barcellos-Hoff, M. H. The influence of extracellular matrix on gene expression: is structure the message? *J Cell Sci Suppl*, **1987**, 8, 327-343.
- [86] Wolinsky, H., Long-term effects of hypertension on the rat aortic wall and their relation to concurrent aging changes. Morphological and chemical studies. *Circ. Res.* **1972**, 30(3), 301-309.
- [87] Olivetti, G, Melissari, M, Marchetti, G, Anversa, P. Quantitative structural changes of the rat thoracic aorta in early spontaneous hypertension. Tissue composition, and hypertrophy and hyperplasia of smooth muscle cells. *Circ. Res.*, **1982**, 51(1), 19-26.
- [88] Grande, J, Davis, H. R, Bates, S, Mathews, M. B, Glagov, S. Effect of an elastin growth substrate on cholesteryl ester synthesis and foam cell formation by cultured aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis*, **1987**, 68(1-2), 87-93.
- [89] Grande, J. P, Glagov, S, Bates, S. R, Horwitz, A. L, Mathews, M. B. Effect of normolipemic and hyperlipemic serum on biosynthetic response to cyclic stretching of aortic smooth muscle cells. *Arteriosclerosis*, **1989**, 9(4), 446-452.
- [90] Kitahara, M, Kanaki, T, Toyoda, K, Miyakoshi, C, Tanaka, S, Tamaki, T, Saito, Y. NK-104, a newly developed HMG-CoA reductase inhibitor, suppresses neointimal thickening by inhibiting smooth muscle cell growth and fibronectin production in balloon-injured rabbit carotid artery. *Jpn. J. Pharmacol.*, **1998**, 77(2), 117-128.
- [91] Morishita, R, Tomita, N, Ogihara, T. HMG-Co A reductase inhibitors in the treatment of cardiovascular diseases: stabilization of coronary artery plaque. *Curr Drug Targets*, **2002**, 3(5), 379-385.
- [92] Assoian, R. K, Marcantonio, E. E. The extracellular matrix as a cell cycle control element in atherosclerosis and restenosis. *J. Clin. Invest.*, **1996**, 98(11), 2436-2439.
- [93] Chang, M. W, Barr, E, Seltzer, J, Jiang, Y. Q, Nabel, G. J, Nabel, E. G, Parmacek, M. S, Leiden, J. M. Cytostatic gene therapy for vascular proliferative disorders with a constitutively active form of the retinoblastoma gene product. *Science*, **1995**, 267(5197), 518-522.
- [94] McCarthy, N. J, Bennett, M. R. The regulation of vascular smooth muscle cell apoptosis. *Cardiovasc. Res.*, **2000**, 45(3), 747-755.
- [95] Gordon, D, Reidy, M. A, Benditt, E. P, Schwartz, S. M. Cell proliferation in human coronary arteries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1990**, 87(12), 4600-4604.
- [96] Ross, R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.*, **1999**, 340(2), 115-126.
- [97] Kockx, M.M, Knaepen, W.M. The role of apoptosis in vascular disease. *J. Pathol.*, **2000**, 190(3), 267-280.
- [98] Bennett, M. R, Littlewood, T. D, Schwartz, S. M, Weissberg, P. L. Increased sensitivity of human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques to p53-mediated apoptosis. *Circ. Res.*, **1997**, 81(4), 591-599.
- [99] Kockx, M. M, Herman, A. G. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc. Res.*, **2000**, 45(3), 736-746.
- [100] Rekhter, M. D. Collagen synthesis in atherosclerosis: too much and not enough. *Cardiovasc. Res.*, **1999**, 41(2), 376-384.
- [101] Kockx, M. M, De Meyer, G. R, Muhring, J, Jacob, W, Bult, H, Herman, A. G. Apoptosis and related proteins in different stages of human atherosclerotic plaques.
- [102] Flynn, P. D, Byrne, C. D, Baglin, T. P, Weissberg, P. L, Bennett, M. R. Thrombin generation by apoptotic vascular smooth muscle cells. *Blood*, **1997**, 89(12), 4378-4384.
- [103] Bennett, M. R. Apoptosis of vascular smooth muscle cells in vascular remodelling and atherosclerotic plaque rupture. *Cardiovasc. Res.*, **1999**, 41(2), 361-368.
- [104] Krajewska, M, Wang, H. G, Krajewski, S, Zapata, J. M, Shabaik, A, Gascoyne, R, Reed, J. C. Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of expression of CPP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res.*, **1997**, 57(8), 1605-1613.
- [105] Hueber, A. O, Evan, G. I. Traps to catch unwary oncogenes. *Trends Genet.*, **1998**, 14(9), 364-367.
- [106] Schonbeck, U, Herzberg, M, Petersen, A, Wohlenberg, C, Gerdes, J, Flad, H. D, Loppnow, H. Human vascular smooth muscle cells express interleukin-1beta-converting enzyme (ICE), but inhibit processing of the interleukin-1beta precursor by ICE. *J. Exp. Med.*, **1997**, 185(7), 1287-1294.
- [107] Katayose, D, Wersto, R, Cowan, K, 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.*, **1995**, 215(2), 446-451.
- [108] Guevara, N. V, Kim, H. S, Antonova, E. I, Chan, L. The absence of p53 accelerates atherosclerosis by increasing cell proliferation *in vivo*. *Nat. Med.*, **1999**, 5(3), 335-339.
- [109] Bennett, M. R, Evan, G. I, Schwartz, S. M. Apoptosis of rat vascular smooth muscle cells is regulated by p53-dependent and -independent pathways. *Circ. Res.*, **1995**, 77(2), 266-273.
- [110] Anderson, R. G. The caveolae membrane system. *Annu. Rev. Biochem.*, **1998**, 67, 199-225.
- [111] Simons, K, Ikonen, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **1997**, 387(6633), 569-572.
- [112] Anderson, R.G.W. Joe Goldstein and Mike Brown: from cholesterol homeostasis to new paradigms in membrane biology. *Trends Cell Biol.*, **2003**, 13(10), 534-539.
- [113] Devaux, P. F. Lipid transmembrane asymmetry and flip-flop in biological membranes and in lipid bilayers. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1993**, 3, 489-494.
- [114] Liscum, L, Underwood, K. W. Intracellular cholesterol transport and compartmentation. *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270(26), 15443-15446.
- [115] Mead, J. F.; Alfin-Slater, D. R.; Howton, G.; Popják, G. In *Lipids: Chemistry, Biochemistry and Nutrition*; Mead, J. F.; Alfin-Slater, D. R.; Howton, G.; Popják, G., Eds.; Plenum Press: New York, **1986**; pp. 295-367.
- [116] Alejandre, M. J, Ramirez, H, Linares, A, Garcia-Peregrin, E. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase from neonatal chick. *Int. J. Biochem.*, **1983**, 15(8), 1077-1080.
- [117] Gould, R. G, Taylor, C. B, Hagerman, J. S, Warner, I, Campbell, D. J. Cholesterol metabolism. I. Effect of dietary cholesterol on the synthesis of cholesterol in dog tissue *in vitro*. *J. Biol. Chem.*, **1953**, 201(2), 519-528.
- [118] Aguilera, J. A, Linares, A, Arce, V, Garcia-Peregrin, E. Effect of dietary cholesterol on mevalonate metabolism by sterol and non-sterol pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**, 122(3), 945-948.
- [119] Adams C. M, Reitz, J, De Brabander, J.K, Feramisco, J.D, Li, L, Brown M. S, Goldstein J.L *J. Biol. Chem.* **2004**, 279 (50), 52772-52780.
- [120] Peet, D. J, Janowski, B. A, Mangelsdorf, D. J. The LXRs: a new class of oxysterol receptors. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **1998**, 8(5), 571-575.
- [121] Dusserre, E, Bourdillon, M. C, Pulcini, T, Berthezene, F. Decrease in high density lipoprotein binding sites is associated with decrease in intracellular cholesterol efflux in dedifferentiated aortic smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1994**, 1212(2), 235-244.
- [122] Duserre, E, Bourdillon, M.C, Pulcini, T, Berzethene, F. Decrease in high density lipoprotein binding sites is associated with decrease in intracellular cholesterol efflux in dedifferentiated aortic smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1994**, 1212(2), 235-244
- [123] Minor, L. K, Rothblat, G. H, Glick, J. M. Triglyceride and cholesteryl ester hydrolysis in a cell culture model of smooth muscle foam cells. *J. Lipid Res.*, **1989**, 30(2), 189-197.
- [124] Rong, J. X, Shapiro, M, Trogan, E, Fisher, E. A. Transdifferentiation of mouse aortic smooth muscle cells to a macrophage-like state after cholesterol loading. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100(23), 13531-13536.

- [125] Carazo, A, Alejandre, M. J, Louktibi, A, Linares, A. The reversal of the inhibition on lipids synthesis by L-659,699 in arterial smooth muscle cells cultures. *Mol. Cell. Biochem.*, **2001**, 221(1-2), 25-31.
- [126] Carazo, A, Alejandre, M. J, Suarez, M. D, Linares, A. Alterations in 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase mRNA concentration in cultured chick aortic smooth muscle cells. *Lipids*, **2000**, 35(6), 587-593.
- [127] Brown, M. S, Goldstein, J. L. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell*, **1997**, 89(3), 331-340.
- [128] Brown, M. S, Goldstein, J. L. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, **1986**, 232(4746), 34-47.
- [129] Edwards, P. A, Ericsson, J. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu. Rev. Biochem.*, **1999**, 68, 157-185.
- [130] Goldstein, J. L, Brown, M. S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, **1990**, 343(6257), 425-430.
- [131] Yokoyama, C, Wang, X, Briggs, M. R, Admon, A, Wu, J, Hua, X, Goldstein, J. L, Brown, M. S. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell*, **1993**, 75(1), 187-197.
- [132] Hua, X, Yokoyama, C, Wu, J, Briggs, M. R, Brown, M. S, Goldstein, J. L, Wang, X. SREBP-2, a second basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that stimulates transcription by binding to a sterol regulatory element. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1993**, 90(24), 11603-11607.
- [133] Tontonoz, P, Kim, J. B, Graves, R. A, Spiegelman, B. M. ADD1: a novel helix-loop-helix transcription factor associated with adipocyte determination and differentiation. *Mol. Cell. Biol.*, **1993**, 13(8), 4753-4759.
- [134] Edwards, P. A, Tabor, D, Kast, H. R, Venkateswaran, A. Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. *Biochim. Biophys. Acta.*, **2000**, 1529(1-3), 103-113.
- [135] Flier, J. S, Hollenberg, A. N. ADD-1 provides major new insight into the mechanism of insulin action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96(25), 14191-1492.
- [136] Brown, M. S, Goldstein, J. L. A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1999**, 96(20), 11041-11048.
- [137] Hua, X, Nohturfft, A, Goldstein, J. L, Brown, M. S. Sterol resistance in CHO cells traced to point mutation in SREBP cleavage-activating protein. *Cell*, **1996**, 87(3), 415-426.
- [138] Osborne, T. F. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): key regulators of nutritional homeostasis and insulin action. *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275(42), 32379-32382.
- [139] Hua, X, Wu, J, Goldstein, J. L, Brown, M. S, Hobbs, H. H. Structure of the human gene encoding sterol regulatory element binding protein-1 (SREBF1) and localization of SREBF1 and SREBF2 to chromosomes 17p11.2 and 22q13. *Genomics*, **1995**, 25(3), 667-673.
- [140] Shimano, H, Horton, J. D, Shimomura, I, Hammer, R. E, Brown, M. S, Goldstein, J. L. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. *J. Clin. Invest.*, **1997**, 99(5), 846-854.
- [141] Oliner, J. D, Andresen, J. M, Hansen, S. K, Zhou, S, Tjian, R. SREBP transcriptional activity is mediated through an interaction with the CREB-binding protein. *Genes Dev.*, **1996**, 10(22), 2903-2911.
- [142] Ericsson, J, Edwards, P. A. CBP is required for sterol-regulated and sterol regulatory element-binding protein-regulated transcription. *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273(28), 17865-17870.
- [143] Kwok, R. P, Lundblad, J. R, Chrivia, J. C, Richards, J. P, Bachinger, H. P, Brennan, R. G, Roberts, S. G, Green, M. R, Goodman, R. H. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature*, **1994**, 370(6486), 223-226.
- [144] Edwards, P. A, Ericsson, J. Signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway: mechanisms of action and possible roles in human disease. *Curr. Opin. Lipidol.*, **1998**, 9(5), 433-440.¹³⁵ Edwards, P.A. and Ericsson, J. (1998) *Curr. Opin. Lipidol.*, 9, 433-440.
- [145] Magana, M. M, Osborne, T. F. Two tandem binding sites for sterol regulatory element binding proteins are required for sterol regulation of fatty-acid synthase promoter. *J. Biol. Chem.*, **1996**, 271(51), 32689-32694.
- [146] Rodriguez, C, Raposo, B, Martinez-Gonzalez, J, Llorente-Cortes, V, Vilahur, G, Badimon, L. Modulation of ERG25 expression by LDL in vascular cells. *Cardiovasc. Res.*, **2003**, 58(1), 178-185.
- [147] Rodriguez, C, Martinez-Gonzalez, J, Sanchez-Gomez, S, Badimon, L. LDL downregulates CYP51 in porcine vascular endothelial cells and in the arterial wall through a sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circ. Res.*, **2001**, 88(3), 268-74.
- [148] Assaf, S, Hazard, D, Pitel, F, Morisson, M, Alizadeh, M, Gondret, F, Diot, C, Vignal, A, Douaire, M, Lagarrigue, S. Cloning of cDNA encoding the nuclear form of chicken sterol response element binding protein-2 (SREBP-2), chromosomal localization, and tissue expression of chicken SREBP-1 and -2 genes. *Poult. Sci.*, **2003**, 82(1), 54-61.
- [149] Robinet, P, Vedie, B, Chironi, G, Garipey, J, Simon, A, Moatti, N, Paul, J. L. Characterization of polymorphic structure of SREBP-2 gene: role in atherosclerosis. *Atherosclerosis*, **2003**, 168(2), 381-387.
- [150] Rios, D. L, Vargas, A. F, Torres, M. R, Zago, A. J, Callegari-Jacques, S. M, Hutz, M. H. Interaction between SREBP-1a and APOB polymorphisms influences total and low-density lipoprotein cholesterol levels in patients with coronary artery disease. *Clin Genet*, **2003**, 63(5), 380-385.
- [151] Vedie, B, Jeunemaitre, X, Megnien, J. L, Atger, V, Simon, A, Moatti, N. A new DNA polymorphism in the 5' untranslated region of the human SREBP-1a is related to development of atherosclerosis in high cardiovascular risk population. *Atherosclerosis*, **2001**, 154(3), 589-597.
- [152] Shimomura, I, Shimano, H, Korn, B. S, Bashmakov, Y, Horton, J. D. Nuclear sterol regulatory element-binding proteins activate genes responsible for the entire program of unsaturated fatty acid biosynthesis in transgenic mouse liver. *J. Biol. Chem.*, **1998**, 273(52), 35299-35306.
- [153] Wang, X, Sato, R, Brown, M. S, Hua, X, Goldstein, J. L. SREBP-1, a membrane-bound transcription factor released by sterol-regulated proteolysis. *Cell*, **1994**, 77(1), 53-62.
- [154] Horton, J. D, Shimomura, I, Brown, M. S, Hammer, R. E, Goldstein, J. L, Shimano, H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Clin. Invest.*, **1998**, 101(11), 2331-2339.
- [155] Lin, T, Zeng, L, Liu, Y, DeFea, K, Schwartz, M. A, Chien, S, Shyy, J. Y. Rho-ROCK-LIMK-cofilin pathway regulates shear stress activation of sterol regulatory element binding proteins. *Circ. Res.*, **2003**, 92(12), 1296-1304.
- [156] Adams, C. M, Goldstein, J. L, Brown, M. S. Cholesterol-induced conformational change in SCAP enhanced by Insig proteins and mimicked by cationic amphiphiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100(19), 10647-10652.
- [157] Gimpl, G, Burger, K, Fahrenholz, F. A closer look at the cholesterol sensor. *Trends Biochem. Sci.*, **2002**, 27(12), 596-599.
- [158] Nohturfft, A, Brown, M. S, Goldstein, J. L. Sterols regulate processing of carbohydrate chains of wild-type SREBP cleavage-activating protein (SCAP), but not sterol-resistant mutants Y298C or D443N. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **1998**, 95(22), 12848-12853.
- [159] Osborne, T. F, Rosenfeld, J. M. Related membrane domains in proteins of sterol sensing and cell signaling provide a glimpse of treasures still buried within the dynamic realm of intracellular metabolic regulation. *Curr. Opin. Lipidol.*, **1998**, 9(2), 137-140.
- [160] Gil, G, Faust, J. R, Chin, D. J, Goldstein, J. L, Brown, M. S. Membrane-bound domain of HMG CoA reductase is required for sterol-enhanced degradation of the enzyme. *Cell*, **1985**, 41(1), 249-258.
- [161] Kumagai, H, Chun, K. T, Simoni, R. D. Molecular dissection of the role of the membrane domain in the regulated degradation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Biol. Chem.*, **1995**, 270(32), 19107-19113.
- [162] Liu, J, Zhang, F, Li, C, Lin, M, Briggs, M. R. Synergistic activation of human LDL receptor expression by SCAP ligand and cytokine oncostatin M. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2003**, 23(1), 90-96.
- [163] Deakin, S, Leviev, I, Guernier, S, James, R. W. Simvastatin modulates expression of the PON1 gene and increases serum par-

- axonnase: a role for sterol regulatory element-binding protein-2. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2003**, 23(11), 2083-2089.
- [164] Liao, J. K. Role of statin pleiotropism in acute coronary syndromes and stroke. *Int J Clin Pract Suppl*, **2003**, 134, 51-57.
- [165] Mulhaupt, F, Matter, C. M, Kwak, B. R, Pelli, G, Veillard, N. R, Burger, F, Graber, P, Luscher, T. F, Mach, F. Statins (HMG-CoA reductase inhibitors) reduce CD40 expression in human vascular cells. *Cardiovasc. Res.*, **2003**, 59(3), 755-766.
- [166] Parthasarathy, S, Steinberg, D, Witztum, J. L. The role of oxidized low-density lipoproteins in the pathogenesis of atherosclerosis. *Annu. Rev. Med.*, **1992**, 43, 219-225.
- [167] Sukhanov, S, Hua Song, Y, Delafontaine, P. Global analysis of differentially expressed genes in oxidized LDL-treated human aortic smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2003**, 306(2), 443-449.
- [168] Brown, M. S, Goldstein, J. L. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Annu. Rev. Biochem.*, **1983**, 52, 223-261.
- [169] Rohrer, L, Freeman, M, Kodama, T, Penman, M, Krieger, M. Coiled-coil fibrous domains mediate ligand binding by macrophage scavenger receptor type II. *Nature*, **1990**, 343(6258), 570-572.
- [170] Kodama, T, Freeman, M, Rohrer, L, Zabrecky, J, Matsudaira, P, Krieger, M. Type I macrophage scavenger receptor contains alpha-helical and collagen-like coiled coils. *Nature*, **1990**, 343(6258), 531-535.
- [171] Brown, M. S, Goldstein, J. L. Atherosclerosis. Scavenging for receptors. *Nature*, **1990**, 343(6258), 508-509.
- [172] Pitas, R. E. Expression of the acetyl low density lipoprotein receptor by rabbit fibroblasts and smooth muscle cells. Up-regulation by phorbol esters. *J. Biol. Chem.*, **1990**, 265(21), 12722-12727.
- [173] Matsumoto, K, Hirano, K, Nozaki, S, Takamoto, A, Nishida, M, Nakagawa-Toyama, Y, Janabi, M. Y, Ohya, T, Yamashita, S, Matsuzawa, Y. Expression of macrophage (Mphi) scavenger receptor, CD36, in cultured human aortic smooth muscle cells in association with expression of peroxisome proliferator activated receptor-gamma, which regulates gain of Mphi-like phenotype *in vitro*, and its implication in atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2000**, 20(4), 1027-1032.
- [174] Draude, G, Hrboticky, N, Lorenz, R. L. The expression of the lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor (LOX-1) on human vascular smooth muscle cells and monocytes and its down-regulation by lovastatin. *Biochem. Pharmacol.*, **1999**, 57(4), 383-386.
- [175] Rommeswinkel, M, Severs, N. J, Koster, M, Robenek, H. Repression of the macrophage scavenger receptor in macrophage-smooth muscle cell heterokaryons. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **1995**, 15(5), 601-611.
- [176] Shimaoka, T, Kume, N, Minami, M, Hayashida, K, Kataoka, H, Kita, T, Yonehara, S. Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275(52), 40663-40666.
- [177] Li, H, Freeman, M. W, Libby, P. Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression *in vivo* by atherogenic diets and *in vitro* by cytokines. *J. Clin. Invest.*, **1995**, 95(1), 122-133.
- [178] Inaba, T, Yamada, N, Gotoda, T, Shimano, H, Shimada, M, Momomura, K, Kadowaki, T, Motoyoshi, K, Tsukada, T, Morisaki, N, Saito, Y, Yoshida, S, Takuku, F, Yasaki, Y. Expression of M-CSF receptor encoded by c-fms on smooth muscle cells derived from arteriosclerotic lesion. *J. Biol. Chem.*, **1992**, 267(8), 5693-5699.
- [179] Kume, N, Moriwaki, H, Kataoka, H, Minami, M, Murase, T, Sawamura, T, Masaki, T, Kita, T. Inducible expression of LOX-1, a novel receptor for oxidized LDL, in macrophages and vascular smooth muscle cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **2000**, 902, 323-327.
- [180] Minami, M, Kume, N, Shimaoka, T, Kataoka, H, Hayashida, K, Akiyama, Y, Nagata, I, Ando, K, Nobuyoshi, M, Hanyuu, M, Komeda, M, Yonehara, S, Kita, T. Expression of SR-PSOX, a novel cell-surface scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized LDL in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2001**, 21(11), 1796-1800.
- [181] Kataoka, H, Kume, N, Miyamoto, S, Minami, M, Morimoto, M, Hayashida, K, Hashimoto, N, Kita, T. Oxidized LDL modulates Bax/Bcl-2 through the lectinlike Ox-LDL receptor-1 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2001**, 21(6), 955-960.
- [182] Kume, N, Kita, T. Roles of lectin-like oxidized LDL receptor-1 and its soluble forms in atherogenesis. *Curr. Opin. Lipidol.*, **2001**, 12(4), 419-423.
- [183] Zingg, J. M, Ricciarelli, R, Andorno, E, Azzi, A. Novel 5' exon of scavenger receptor CD36 is expressed in cultured human vascular smooth muscle cells and atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **2002**, 22(3), 412-417.
- [184] Imachi, H, Murao, K, Cao, W. M, Ohyama, T, Sato, M, Sasaguri, Y, Ishida, T, Takahara, J. Expression of HDL receptor, CLA-1 in human smooth-muscle cells and effect of interferon-gamma on its regulation. *Horm. Metab. Res.*, **2001**, 33(7), 389-393.
- [185] Inoue, I, Katayama, S. The possible therapeutic actions of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) agonists, PPAR gamma agonists, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors, angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors and calcium (Ca)-antagonists on vascular endothelial cells. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord*, **2004**, 4(1), 35-52.
- [186] Ambrosi, P, Villani, P, Habib, G, Bouvenot, G. The statins: new properties. *Therapie*, **2003**, 58(1), 15-21.
- [187] Gibbons, G. F. From gallstones to genes: two hundred years of sterol research. A tribute to George J. Schroepfer Jr. *Lipids*, **2002**, 37(12), 1153-1162.
- [188] Goodridge, A. G. Dietary regulation of gene expression: enzymes involved in carbohydrate and lipid metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, **1987**, 7, 157-185.
- [189] Foretz, M, Pacot, C, Dugail, I, Lemarchand, P, Guichard, C, Le Liepvre, X, Berthelie-Lubrano, C, Spiegelman, B, Kim, J. B, Ferre, P, Foufelle, F. ADD1/SREBP-1c is required in the activation of hepatic lipogenic gene expression by glucose. *Mol. Cell. Biol.*, **1999**, 19(5), 3760-3768.
- [190] Kim, J. B, Sarraf, P, Wright, M, Yao, K. M, Mueller, E, Solanes, G, Lowell, B. B, Spiegelman, B. M. Nutritional and insulin regulation of fatty acid synthetase and leptin gene expression through ADD1/SREBP1. *J. Clin. Invest.*, **1998**, 101(1), 1-9.
- [191] Yabe, D, Komuro, R, Liang, G, Goldstein, J. L, Brown, M. S. Liver-specific mRNA for Insig-2 down-regulated by insulin: implications for fatty acid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, 100(6), 3155-3160.
- [192] Shin, D. J, Osborne, T. F. Thyroid hormone regulation and cholesterol metabolism are connected through Sterol Regulatory Element-Binding Protein-2 (SREBP-2). *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278(36), 34114-34118.
- [193] Xu, J, Nakamura, M. T, Cho, H. P, Clarke, S. D. Sterol regulatory element binding protein-1 expression is suppressed by dietary polyunsaturated fatty acids. A mechanism for the coordinate suppression of lipogenic genes by polyunsaturated fats. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274(33), 23577-83.
- [194] Kim, H. J, Takahashi, M, Ezaki, O. Fish oil feeding decreases mature sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1) by down-regulation of SREBP-1c mRNA in mouse liver. A possible mechanism for down-regulation of lipogenic enzyme mmas. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274(36), 25892-25898.
- [195] Mater, M. K, Thelen, A. P, Pan, D. A, Jump, D. B. Sterol response element-binding protein 1c (SREBP1c) is involved in the polyunsaturated fatty acid suppression of hepatic S14 gene transcription. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274(46), 32725-32732.
- [196] Yahagi, N, Shimano, H, Hasty, A. H, Anemiyama-Kudo, M, Okazaki, H, Tamura, Y., Iizuka, Y., Shionoiri, F., Ohashi, K., Osuga, J., Harada, K., Gotoda, T., Nagai, R., Ishibashi, S, Yamada, N. A crucial role of sterol regulatory element-binding protein-1 in the regulation of lipogenic gene expression by polyunsaturated fatty acids. *J. Biol. Chem.*, **1999**, 274(50), 35840-35844.
- [197] Field, F. J, Born, E, Mathur, S. N. Fatty acid flux suppresses fatty acid synthesis in hamster intestine independently of SREBP-1 expression. *J. Lipid Res.*, **2003**, 44(6), 1199-1208.
- [198] Puri, V, Jefferson, J. R, Singh, R. D, Wheatley, C. L, Marks, D. L, Pagano, R. E. Sphingolipid storage induces accumulation of intracellular cholesterol by stimulating SREBP-1 cleavage. *J. Biol. Chem.*, **2003**, 278(23), 20961-20970.

- [199] Skrinska, V. A, Konieczkowski, M, Gerrity, R. G, Galang, C. F, Rebec, M. V. Suppression of foam cell lesions in hypercholesterolemic rabbits by inhibition of thromboxane A2 synthesis. *Arteriosclerosis*, **1988**, 8(4), 359-367.
- [200] Cooke, J. P, Singer, A. H, Tsao, P, Zera, P, Rowan, R. A, Billingham, M. E. Antiatherogenic effects of L-arginine in the hypercholesterolemic rabbit. *J. Clin. Invest.*, **1992**, 9(3), 1168-1172.
- [201] Hogan, M, Cerami, A, Bucala, R. Advanced glycosylation endproducts block the antiproliferative effect of nitric oxide. Role in the vascular and renal complications of diabetes mellitus. *J. Clin. Invest.*, **1992**, 90(3), 1110-1115.
- [202] Schiffrin, E. L, Amiri, F, Benkirane, K, Iglarz, M, Diep, Q. N. Peroxisome proliferator-activated receptors: vascular and cardiac effects in hypertension. *Hypertension*, **2003**, 42(4), 664-668.
- [203] Bruemmer, D, Yin, F, Liu, J, Berger, J. P, Sakai, T, Blaschke, F, Fleck, E, Van Herle, A. J, Forman, B. M, Law, R. E. Regulation of the growth arrest and DNA damage-inducible gene 45 (GADD45) by peroxisome proliferator-activated receptor gamma in vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.*, **2003**, 93(4), e38-47.
- [204] Beltowski, J, Wojcicka, G, Jamroz, A. [Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in pathophysiology of the circulatory system and prospective use of agonists of these receptors in therapy]. *Postepy Hig Med Dosw*, **2003**, 57(2), 199-217.
- [205] Chen, Y. E, Fu, M, Zhang, J, Zhu, X, Lin, Y, Akinbami, M. A, Song, Q. Peroxisome proliferator-activated receptors and the cardiovascular system. *Vitam Horm*, **2003**, 66, 157-188.
- [206] Camejo, G. PPAR agonists in the treatment of insulin resistance and associated arterial disease. *Int J Clin Pract Suppl*, **2003**, 134, 36-44.
- [207] Fu, M, Zhang, J, Lin, Y, Zhu, X, Zhao, L, Ahmad, M, Ehrenguber, M. U, Chen, Y. E. Early stimulation and late inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma) gene expression by transforming growth factor beta in human aortic smooth muscle cells: role of early growth-response factor-1 (Egr-1), activator protein 1 (AP1) and Smads. *Biochem. J.*, **2003**, 370(Pt 3), 1019-1025.
- [208] Ichiki, T, Tokunou, T, Fukuyama, K, Iino, N, Masuda, S, Takeshita, A. 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 and thiazolidinediones transactivate epidermal growth factor and platelet-derived growth factor receptors in vascular smooth muscle cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2004**, 323(2), 402-408.
- [209] Schiffrin, E. L. Peroxisome proliferator-activated receptors and cardiovascular remodeling. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2005**, 288(3), H1037-1043.