

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**“PARTICIPACIÓN DE LA AUTOFAGIA EN LA INDUCCIÓN
DEL FENOTIPO SINTÉTICO POR TNF- α
EN CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES”**

Tesis presentada para optar al grado académico de
Doctora en Bioquímica por:

MARINA GARCÍA MIGUEL

Director de Tesis:

Dr. Mario Chiong Lay

Santiago, Chile

2016

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata:

MARINA GARCÍA MIGUEL

Ha sido aprobada por la comisión informante de Tesis como requisito para optar al grado de Doctora en Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendido el día ____ de _____ de 2016.

Director de Tesis:

Dr. Mario Chiong Lay

Comisión Informante de Tesis:

Dra. Margarita Vega (Presidenta)

Dr. Mauricio Boric

Dr. Alfredo Criollo

Dr. Ramón Rodrigo

A Jara,
sin duda lo más grande que me dio Chile.
Este Doctorado es mi mayor logro académico,
pero tú siempre serás el mayor logro de mi vida.

A todas las mujeres con empeño,
en especial a aquellas que su género les complicó su travesía.
"La gota abre la piedra, no por su fuerza sino por su constancia".

AGRADECIMIENTOS

Mil veces he comenzado estos agradamientos y mil veces los he borrado porque no consigo plasmar lo que realmente siento. Este Doctorado ha sido el mayor logro conseguido en mi vida laboral. No sólo porque es el mayor grado académico al que se puede aspirar, sino porque ha sido una competición de obstáculos que me siento muy satisfecha de haber podido superar.

Son varias las personas que han sido clave en el proceso completo del Doctorado, pero una fue esencial para poder terminarlo: mi tutor, Mario Chiong. Cuando muchos en el Programa me aconsejaban que abandonara el Doctorado y me volviera a mi país, fue él quien me acogió con estas palabras “*lo importante es que terminarás pronto esta Tesis*”. Gracias profe por confiar en mí, esa dosis de confianza era lo que más necesitaba. Gracias también por guiarme en toda la investigación dándome la libertad y consejos que necesité en cada momento. Agradecer también a mi Comisión evaluadora, Margarita Vega, Mauricio Boric, Alfredo Criollo y Ramón Rodrigo, gracias por apoyarme en este trabajo que empezó con tanta dificultad, sus comentarios fueron de gran aporte y sus palabras de ánimo y comprensión fueron una gran ayuda durante este año y medio de duro trabajo.

Las otras personas clave en este logro académico es mi familia, aunque realmente han sido clave en todos los logros obtenidos en mi vida. Gracias a mis padres por darme la fuerza para embarcarme en todas mis travesías, todas las aventuras vividas han tenido un feliz desenlace gracias a vuestro apoyo. A mis hermanos agradecerles su confianza en mí, en ningún momento dudaron que este momento llegaría. Los logros individuales son victorias familiares.

¿Qué decir del laboratorio donde fui a caer? Ese laboratorio que al empezar el Doctorado rehuí porque eran demasiadas las personas que trabajaban en él y veía imposible que hubiera una buena dirección y un buen ambiente. Si algo tengo que agradecer al comité del Programa es que me aconsejaron a realizar mi Tesis en él. Creo que fue un acierto y una suerte para mí poder trabajar con todos los integrantes de este grupo. Mi especial agradecimiento a los chiongcitos: Ambu, Benja y Pablo (que a partir de ahora seremos exchiongcitos por mayoría). Gracias por contestarme con paciencia esa lista eterna de preguntas a mi llegada, gracias por discutir con interés los experimentos de mi Tesis y los resultados obtenidos. Gracias por ayudarme

para avanzar más rápido, por hacerme las cosas fáciles, por evitarme tareas que me hubieran obligado a reducir el tiempo de trabajo y hubieran retrasado mi graduación. Gracias por pensar en lo que necesitaba sin que yo haya tenido que decir nada, y gracias por ser los amigos que me habéis demostrado ser. A ti, Pablo, gracias además por nuestras conversaciones sobre todo y nada y por sentir tu hombro cuando mi ansiedad o pena me perturbaba, has sido clave en estos últimos meses, tanto en lo personal como en lo laboral. Quiero agradecer también a mis otros compañeros de grupo: Jaime, David, Feña y Coni, por el apoyo que he sentido, especialmente al final. Por supuesto agradecer el duro trabajo diario de Fidel, Gindra y de Nico, por vosotros el laboratorio funciona día tras día y por vuestras sonrisas y abrazos los días comienzan con alegría.

Especial mención también a mis dos grandes amigas Mónica y Vale, lo que empezó siendo una relación de compañeras de trabajo ha terminado siendo una amistad que de verdad deseo que perdure siempre en el tiempo. Confío en que nuestras vidas se vuelvan a cruzar en algún momento, y algo me dice que será al otro lado del océano. Lo mismo que con los demás miembros de Labsito: Apus, Chelo, Cami y Hugo por vuestras conversaciones, risas y salidas. Os quedáis todos con un pedacito de mi corazón.

Pero como no todo en esta vida es trabajo, también quiero agradecer a mi gente ajena a la Ciencia, que sin entender una palabra de mi investigación me apoyó para que terminara este proceso. De este grupo extra-científico las más importantes fueron las porotitas: Sonia, Ana, María, Pilar, Bea, Karen y, sobre todo Paula. Creo que sois de lo más importante, en cuanto a lo personal, que me llevo de esta estancia en Chile. Ha sido precioso conoceros y compartir esta etapa con vosotras. Siempre me apoyasteis y me escuchasteis cuando lo necesité y siempre me sentí súper respaldada por cada una de vosotras. Pero Paula, tú eres única y especial, como tantas veces hemos hablado ha sido precioso reencontrarnos en este país y compartir etapas tan intensas de nuestras vidas. Varias veces me has dicho que desearías estar en mi defensa pública de Tesis, para mí lo estarás, sentadita en tercera fila, con esa mirada de confianza y ese abrazo sentido para felicitarme cuando termine. Este Doctorado, en gran parte, he conseguido terminarlo gracias a ti.

Especiales agradecimientos a Pablo. El primero en darse cuenta de que además de Tesis y Jara, mi salud mental necesitaba más cosas. Gracias por ayudarme de esa forma tan significativa, con actos periódicos salidos desde tu corazón. Obviamente no me pudiste ayudar directamente en mi trabajo de

Tesis, pero te aseguro que si conseguí llegar hasta aquí con la cabeza en su sitio fue en gran parte gracias a ti. Paula y Rodrigo, aparecisteis en mis últimos años en Chile pero os convertisteis en personajes necesarios de cotidianidad. Espero poder disfrutar de vuestra presencia y apoyo en la próxima etapa de mi vida. Sea cual sea, donde sea que estemos.

Por último agradecer a todas aquellas personas que me acompañaron casi desde los inicios del Doctorado, a mis compañeros de generación, especialmente a Roberto y Miguel que siempre se sacaron un tiempito para explicarme y aconsejarme cuando se lo pedí. Roberto, gracias por el apoyo que siempre sentí por tu parte, en los grandes hitos académicos que he vivido aquí siempre estuviste atento, aconsejándome y ofreciéndome tu colaboración. Nunca olvidaré tu apoyo cuando tuve que cambiar de laboratorio por una causa injusta. Gracias también a Karen y Marjorie, por conoceros mereció la pena pasar por el laboratorio de MH. Seguid siendo así.

Y por último, gracias a ti, Jara, que fuiste la mayor complicación de mi Doctorado y a la vez mi motor con más potencia para terminarlo. Toda tu vida contarás con 'mi apoyo y amor. Gracias por ser la mejor hija que una madre pueda tener, por ser como eres y por convertirme en la mujer que soy.

1. ÍNDICE

1.	ÍNDICE	i
2.	ÍNDICE DE FIGURAS	iv
3.	DIVULGACIÓN CIENTÍFICA Y FINANCIAMIENTO	vi
4.1.	PUBLICACIONES	vi
4.2.	CONGRESOS.....	vi
4.3.	FINANCIAMIENTO	viii
4.	ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS	ix
5.	RESUMEN	1
6.	SUMMARY	4
7.	INTRODUCCIÓN.....	7
7.1.	FISIOLOGÍA DEL SISTEMA ARTERIAL.....	7
7.2.	REMODELADO DE LA PARED VASCULAR.....	9
7.3.	ESTRUCTURA DE LA CÉLULA DE MÚSCULO LISO VASCULAR ..	10
7.4.	VSMC E INFLAMACIÓN	12
7.5.	MODULACIÓN FENOTÍPICA DE LAS VSMC	13
7.6.	FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α).....	15
7.7.	INFLAMACIÓN Y ATROSCLEROSIS	18
7.8.	EFEECTO DEL TNF- α SOBRE LAS VSMC.....	23
7.9.	DEGRADACIÓN PROTEICA INTRACELULAR. AUTOFAGIA	24
7.10.	AUTOFAGIA Y CAMBIO FENOTÍPICO DE LAS VSMC	30
8.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	32
8.1.	HIPÓTESIS.....	32
8.2.	OBJETIVO GENERAL	32
8.3.	OBJETIVOS ESPECIFICOS	32
9.	METODOLOGÍA.....	33
9.1.	CULTIVO CELULAR	33

9.2.	PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS TOTALES	33
9.3.	ANÁLISIS POR WESTERN BLOT	34
9.4.	INHIBICIÓN DE LA AUTOFAGIA.....	35
9.5.	VISUALIZACIÓN VESÍCULAS AUTOFAGOSÓMICAS.	36
9.6.	DESDIFERENCIACIÓN DE LAS VSMC	37
9.7.	TINCIÓN CON FALOIDINA-RODAMINA	37
9.8.	PROLIFERACIÓN POR ENSAYO MTT	37
9.10.	ENSAYO DE HERIDA.....	38
9.11.	ENSAYO DE TRANSWELL	39
9.12.	ZIMOGRAFÍA.....	39
9.13.	ELISA.....	40
9.14.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
10.	RESULTADOS	42
10.1.	EFEECTO DE TNF- α SOBRE LA AUTOFAGIA EN CÉLULAS A7r5 ...	42
10.1.1.	Efecto de la privación de suero sobre la autofagia en la línea celular A7r5	42
10.1.2.	Efecto del TNF- α sobre la autofagia en la línea celular A7r5.....	43
10.1.3.	Papel de la vía NF- κ B sobre la activación de la autofagia por TNF- α	47
10.2.	EFEECTO DEL TNF- α SOBRE EL FENOTIPO SINTÉTICO EN LA LÍNEA A7r5	49
10.2.1.	Efecto del TNF- α sobre la desdiferenciación celular en la línea A7r5.....	49
10.2.2.	Efecto del TNF- α sobre el fenotipo migratorio en la línea celular A7r5.....	52
10.2.3.	Efecto del TNF- α sobre el fenotipo proliferativo en la línea celular A7r5.....	61
10.3.	EFEECTO DEL TNF- α SOBRE LA SECRECIÓN DE CITOQUINAS ...	62
10.4.	PAPEL DE LA AUTOFAGIA EN EL CAMBIO DE FENOTIPO	69
10.4.1.	Papel de la autofagia en la desdiferenciación celular en la línea A7r5.....	71

10.4.2.	Papel de la autofagia en el fenotipo migratorio en la línea celular A7r5	75
10.4.3.	Papel de la autofagia en el fenotipo proliferativo en la línea celular A7r5	77
10.4.4.	Papel de la autofagia en la secreción de citoquinas en VSMC ..	79
11.	DISCUSIÓN	81
12.	RESUMEN GRÁFICO	92
13.	CONCLUSIONES.....	93
14.	REFERENCIAS.....	94

2. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Transducción de señales de la vía NF- κ B.	18
Figura 2. Mecanismo secuencial de la autofagia. Proteínas involucradas utilizadas como marcadores.....	29
Figura 3. Efecto de distintas concentraciones de suero sobre la autofagia.	43
Figura 4. Efecto de TNF- α sobre los marcadores de autofagia en las células A7r5.	44
Figura 5. Efecto de TNF- α sobre el flujo autofágico en las células A7r5.....	47
Figura 6. Relevancia de la vía NF- κ B en la activación de la autofagia mediada por TNF- α	49
Figura 7. Efecto TNF- α sobre el fenotipo contráctil.....	51
Figura 8. Efecto de TNF- α en la migración celular determinado por el ensayo de cierre de herida.	54
Figura 9. Cámara Boyden y esquema de ensayo Transwell.....	55
Figura 10. Estandarización del ensayo Transwell.....	57
Figura 11. Efecto de TNF- α en la migración de las células A7r5 evaluado por Transwell.....	59
Figura 12. Efecto de TNF- α sobre la secreción de la metaloproteasa MMP-9..	60
Figura 13. Efecto de TNF- α sobre proliferación de las células A7r5.....	62
Figura 14. Efecto del TNF- α sobre la secreción de IL-6 en las células A7r5. ...	64
Figura 15. Efecto del TNF- α sobre la secreción de IL-1 β en las células A7r5...	65

Figura 16. Efecto del TNF- α sobre la secreción de IL-10 en las células A7r5...	66
Figura 17. Efecto del PDGF sobre la secreción de citoquina IL-6.....	67
Figura 18. Efecto del TNF- α sobre la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1.....	68
Figura 19. Silenciamiento de Beclin1 con RNA interferente.	70
Figura 20. Papel de la autofagia en el cambio del nivel de proteínas contráctiles por TNF- α	72
Figura 21. Efecto del TNF- α sobre la organización de las fibras de actina y el papel de la autofagia.	73
Figura 22. Papel de la autofagia en la síntesis de matriz extracelular.	74
Figura 23. Papel de la autofagia en la migración celular inducida por TNF- α ... 75	
Figura 24. Papel de la autofagia en la proliferación celular.	78
Figura 25. Efecto del RNA interferente de Beclin1 sobre la secreción de IL-6 inducida por TNF- α	79
Figura 26. Efecto de la inhibición de la autofagia con cloroquina sobre la secreción de IL-6 inducida por TNF- α	80
Figura 27. Resumen gráfico.....	92

3. DIVULGACIÓN CIENTÍFICA Y FINANCIAMIENTO

4.1. PUBLICACIONES

1. **García-Miguel M**, Norambuena-Soto I, Riquelme J, Cartes-Saavedra B, Morales PE, Sanhueza-Olivares F, Mondaca-Ruff D, Chiong M. TNF- α mediated autophagy regulates vascular smooth muscle cells switching phenotype. *Manuscrito en preparación*.
2. Torres G*, Morales PE*, **García-Miguel M***, Norambuena-Soto I, Cartes-Saavedra B, Vidal-Peña G, Mondaca-Ruff D, Sanhueza-Olivares F, San Martín A, Chiong M. Glucagon-like peptide-1 inhibits vascular smooth muscle cell dedifferentiation through viitocondrial dynamics regulation. *Biochem Pharmacol*. 2016;**104**:52-61.(*comparten primera autoría).
3. Chiong M, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, Mondaca-Ruff D, Morales PE, **García-Miguel M**, Mellado R. Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. *Front. Cell Dev. Biol*. 2014;**2**:72.

4.2. CONGRESOS

Congresos internacionales

1. **García-Miguel M**, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, Mondaca-Ruff D, Chiong M. TNF- α mediated autophagy regulates vascular smooth muscle cells switching phenotype. XXV Congreso Interamericano de Cardiología. 2015. Santiago. Chile. *Presentación oral, nominada al mejor trabajo*.
2. Chiong M, Morales P, Torres G, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, Mondaca-Ruff D, Sanhueza F, **García-Miguel M**. Effect of glucagon peptide 1 on vascular smooth muscle mitochondrial metabolism and phenotype. X International Symposium on Vasoactive Peptides. 2015. Minas Gerais. Brasil. *Presentación oral*.

Congresos nacionales

1. Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, **García-Miguel M**, Morales P, Torres G, Sanhueza-Olivares F, Mondaca-Ruff D, Chiong M. GLP-1 prevents mitochondrial and phenotypic changes induced by PDGF-BB in VSMC through PKA-Drp1 pathway. XXXVIII Reunión Anual Sociedad Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas. Chile. 2015.
2. Mondaca-Ruff D, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, **García-Miguel M**, Sanhueza-Olivares F, Lavandero S, Chiong M. Angiotensin II induces autophagy in vascular smooth muscle cells. XXXVIII Reunión Anual Sociedad Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas. Chile. 2015.
3. Sanhueza-Olivares F, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, Mondaca-Ruff D, Pino-Espinoza G, **García-Miguel M**, Morales P, Chiong M. PDGF-BB induces mitochondrial fragmentation and degradation during VSMC dedifferentiation. XXXVIII Reunión Anual Sociedad Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas. Chile. 2015.
4. Norambuena-Soto I, Cartes-Saavedra B, Morales PE, Modaca-Ruff D, Nuñez-Soto C, **García-Miguel M**, Mellado R, Chiong M. GLP-1 inhibits VSMC dedifferentiation through and autophagy-dependent mechanism. XXXVIII Reunión Anual Sociedad Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas. Chile. 2015.
5. Norambuena-Soto I, Cartes Saavedra B, Modaca-Ruff D, Núñez-Soto C, **García-Miguel M**, Mellado R, Chiong M. GLP-1 prevents PDGF-BB induced dedifferentiation in VSMCs. XXXVII Reunión Anual Sociedad Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas. Chile. 2014.
6. Mondaca-Ruff D, Cartes-Saavedra B, Norambuena-Soto I, Vidal-Peña G, Morales PE, **García-Miguel M**, Pino-Espinoza G, Pedrozo Z, Lavandero S, Chiong M. PDGF-BB induces mitochondrial degradation and autophagy in VSMCs. XXXVII Reunión Anual Sociedad Bioquímica y Biología Molecular de Chile. Puerto Varas. Chile. 2014

4.3. FINANCIAMIENTO

Esta Tesis contó con las siguientes fuentes de financiamiento:

- Beca MECESUP: UCH0606.
- Proyecto FONDECYT 1140329.
- Proyecto FONDAP 14130011.
- Proyecto Anillo de Investigación de Ciencia y Tecnología ACT1111

4. ABREVIATURAS, SIGLAS Y ACRÓNIMOS

ACAT1	: <u>A</u> cetil- <u>c</u> oenzima A <u>a</u> cetil <u>t</u> ransferasa <u>1</u>
AMBRA 1	: Molécula activa en autofagia regulada por Beclin1 (<u>a</u> ctivating in <u>B</u> eclin1- <u>r</u> egulate <u>a</u> utophagy)
AMPK	: Kinasa activada por AMP (<u>A</u> MP- <u>a</u> ctivated protein <u>k</u> inase)
ANOVA	: Análisis de varianza (<u>a</u> nalysis of <u>v</u> ariance)
Ang	: <u>A</u> ngiotensina
ATG	: Genes relacionados con autofagia (<u>a</u> utophagy- <u>r</u> elated <u>g</u> enes)
Bec	: Beclin1
BSA	: Albúmina de suero bovino (<u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)
Cntrl	: Control
CQ	: <u>C</u> loroquina
DMEM	: <u>M</u> edio <u>D</u> ulbecco <u>m</u> odificado de <u>E</u> agle
ECM	: Matriz extracelular (<u>e</u> xtra <u>c</u> ellular <u>m</u> atrix)
ECV	: <u>E</u> nfermedades <u>c</u> ardio <u>v</u> asculares
EDTA	: Ácido etilendiaminotetraacético (<u>e</u> thylene <u>d</u> iamine <u>t</u> etraacetic <u>a</u> cid)
EEM	: Error estándar medio
FBS	: Suero fetal bovino (<u>f</u> etal <u>b</u> ovine <u>s</u> erum)
GAPDH	: Gliceraldeído 3-fosfato deshidrogenasa (<u>g</u> lyceraldehyde 3- <u>p</u> hosphate <u>d</u> e <u>h</u> ydrogenase)
GFP	: Proteína fluorescente verde (<u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein)
ICAM	: Molécula de adhesión intercelular (<u>i</u> nter <u>c</u> ellular <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule)
IFN	: <u>I</u> nterferón
Ig	: <u>I</u> munoglobulina
IGF	: Factor de crecimiento semejante a insulina (<u>i</u> nsulin- <u>l</u> ike <u>g</u> rowth <u>f</u> actor)

IL	: Interleuquina
JAK	: Kinasa de Janus (<i>Janus kinase</i>)
JNK	: Kinasa N-terminal de c-Jun (<i>c-Jun N terminal kinase</i>)
kDa	: kilo Dalton
LC3	: Cadena ligera 3 de la proteína asociada al microtúbulo (<i>microtubule-associated protein-light chain 3</i>)
LDL	: Lipoproteína de baja densidad (<i>low density lipoprotein</i>)
MMP	: Metaloproteínasa (<i>matrix metalloproteinase</i>)
MOI	: Multiplicidad de infección (<i>multiplicity of infection</i>)
miRNA	: <u>microRNA</u>
mRNA	: <u>RNA mensajero</u>
MTT	: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NF-κB	: <u>F</u> actor <u>N</u> uclear potenciador de las cadenas ligeras <u>κ</u> de las células <u>B</u> activadas
pb	: <u>P</u> ares de <u>b</u> ases
PBS	: Amortiguador fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PDGF	: Factor de crecimiento derivado de plaquetas (<i>platelet-derived growth factor</i>)
PI3K	: Fosfatidil inositol 3-kinasa (<i>phosphatidyil inositol 3-kinase</i>)
PVDF	: Difluoruro de polivinilideno (<i>polyvinylidene difluoride</i>)
rpm	: <u>R</u> evoluciones <u>p</u> or <u>m</u> inuto
RIPA	: Radioimmunoprecipitation assay (buffer)
rt-PCR	: Reacción en cadena de polimerasa a tiempo real (<i>real time-polymerase chain reaction</i>)
Scr	: Mezcla (<u>s</u> crumble)
SDS-PAGE	: Electroforesis en gel de acrilamida con dodecil sulfato de sodio (<i>sodium dodecil sulfate- polyacrilamide gel electrophoresis</i>)
siRNA	: RNA pequeño de interferencia (<i>small interfering RNA</i>)
SMA	: Actina de músculo liso (<i>smooth muscle actin</i>)

- oxLDL** : Lipoproteína de baja densidad oxidada (*oxidated low density lipoprotein*)
- TEMED** : Tetrametiletilen diamina
- TGF- β** : Factor de crecimiento transformante beta (*transforming growth factor β*)
- TLR** : Receptores tipo toll (*toll like receptor*)
- TNF- α** : Factor de necrosis tumoral alfa (*tumoral necrosis factor α*)
- VCAM** : Molécula de adhesión celular vascular (*vascular cell adhesion molecule*)
- VSMC** : Células de músculo liso vascular (*vascular smooth muscle cell*)

5. RESUMEN

Antecedentes y objetivo: La aterosclerosis se caracteriza por una desdiferenciación las células de músculo liso vascular (VSMC) a un fenotipo migratorio, proliferativo, con baja expresión de proteínas de contracción y una elevada síntesis de matriz extracelular. Esta enfermedad cardiovascular tiene un componente inflamatorio crónico con presencia del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) en el tejido aterosclerótico. Además, se ha observado que las VSMC de placas de ateroma tienen inducida la autofagia, un mecanismo asociado con la degradación de proteínas y organelos intracelulares. El objetivo de este estudio fue evaluar si el TNF- α induce desdiferenciación en las VSMCs, transformándolas a un fenotipo proinflamatorio con mayor capacidad de migración y proliferación, y si este cambio de fenotipo es mediado por autofagia.

Metodología: El modelo de estudio es la línea celular de VSMCs de aorta de rata A7r5. El estímulo de TNF- α fue de 100 ng/mL. La autofagia se determinó midiendo los niveles proteicos de LC3-II, p62 y formación de vacuolas autofágicas marcándolas con LC3-GFP. La participación de la autofagia se evaluó inhibiéndola farmacológicamente con cloroquina, y genéticamente con siRNA de Beclin1. La desdiferenciación celular se evaluó midiendo la expresión y organización de las proteínas de contracción α -SMA y SM22, los niveles de las proteínas de matriz extracelular colágeno tipo I y osteopontina, proliferación

celular por incorporación de [³H]-timidina y ensayo de MTT, y migración por ensayo de herida y de transwell usando una cámara Boyden. Los parámetros inflamatorios se evaluaron mediante la medición de las proteínas IL-1 β , IL-6 e IL-10 por ELISA.

Resultados: El TNF- α indujo autofagia reflejado por un aumento de LC3-II (1,91 \pm 0,21 veces vs control, p<0,01) y una disminución de p62 (0,77 \pm 0,05 veces vs control, p<0,001). Esta autofagia fue dependiente de IKK ya que el aumento de LC3-II inducida por TNF- α se inhibió con BAY-117082. Además, TNF- α indujo migración celular (1,45 \pm 0,09 veces vs control, p<0,01), proliferación (2,33 \pm 0,24 veces vs control, p<0,05), secreción de IL-6 (258 \pm 53 veces vs control, p<0,01), aumento de las proteínas de matriz extracelular colágeno tipo I (3,09 \pm 0,85 veces vs control, p<0,01) y osteopontina (2,32 \pm 0,46 veces vs control, p<0,01) y disminución de las proteínas contráctiles α -SMA (0,74 \pm 0,12 veces vs control, p<0,05) y SM22 (0,54 \pm 0,01 veces vs control, p<0,05). Además, el factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB), un inductor clásico de desdiferenciación de VSMC, al igual que el TNF- α , también indujo un aumento de la secreción de IL-6 en las VSMC. Cuando se inhibió la autofagia farmacológica o genéticamente, estos cambios fenotípicos inducidos por TNF- α no ocurrieron.

Conclusión: En este trabajo se demostró que el TNF- α induce desdiferenciación celular, proliferación y migración en VSMCs de forma dependiente de autofagia. Además, el TNF- α también aumentó la secreción de IL-6, efecto que fue

también dependiente de autofagia. Debido a que el fenotipo proinflamatorio también se indujo con PDGF-BB, sugerimos que el fenotipo proinflamatorio podría ser una característica común de las VSMC desdiferenciadas.

Palabras claves: VSMC, TNF- α , autofagia, desdiferenciación, migración, proliferación y citoquinas.

6. SUMMARY

Background and aim: Atherosclerosis is characterized by vascular smooth muscle cells (VSMC) dedifferentiation to a proliferative and migratory phenotype with low contractile protein expression and high extracellular matrix synthesis. This cardiovascular disease has a chronic inflammatory component with the presence of tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the atherosclerotic tissue. Furthermore, it has been observed that VSMC of atheromatous plaques have increased autophagy, a mechanism associated with protein and intracellular organelles degradation. The aim of this study was to evaluate if TNF- α induces VSMC dedifferentiation, triggering a proinflammatory phenotype with higher migration and proliferation capacity, and if this phenotype switching is mediated by autophagy.

Methodology: Studies were performed in a rat aortic VSMC cell line A7r5. Cells were stimulated with TNF- α 100 ng/mL. Autophagy was determined by measuring LC3-II and p62 protein levels and autophagic vesicles formation using LC3-GFP. Autophagy was pharmacologically inhibited with chloroquine, and genetically with a siRNA Beclin1. Cell dedifferentiation was evaluated by measuring the expression and organization of contractile proteins α -SMA and SM22, extracellular matrix protein osteopontin and type I collagen levels. Cell proliferation was measured by [3 H]-thymidine and MTT assay, and migration was evaluated by wound assay and transwell using a Boyden chamber.

Inflammatory parameters were measured by the expression of IL-1 β , IL16 and IL-10 proteins by ELISA.

Results: TNF- α induced autophagy as determined by LC3-II level increase (1.91 \pm 0.21 fold vs control, p<0.01) and p62 level decrease (0.77 \pm 0.05 fold vs control, p<0.001). This autophagy was dependent on IKK because TNF- α -dependent LC3-II increase was inhibited by BAY-117082. In addition, TNF- α induced migration (1.45 \pm 0.09 fold vs control, p<0.01), proliferation (2.33 \pm 0.24 fold vs control, p<0.05), IL-6 secretion (258 \pm 53 fold vs control, p<0.01), extracellular matrix proteins collagen type I (3.09 \pm 0.85 fold vs control, p<0.01) and osteopontin (2.32 \pm 0.46 fold vs control, p<0.05), and decreased contractile proteins α -SMA (0.74 \pm 0.12 fold vs control, p<0.05) and SM22 (0.54 \pm 0.01 fold vs control, p<0.05). In addition, platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB), a classic VSMC dedifferentiation inducer, as well as TNF- α , also induced an increase in IL-6 secretion in those cells. When autophagy was pharmacologically or genetically inhibited, these TNF- α -induced phenotypic changes did not occur.

Conclusion: In this study it was shown that TNF- α induces cell dedifferentiation, proliferation and migration in VSMCs in an autophagy dependent manner. In addition, TNF- α also increases IL-6 secretion, this effect is also dependent of autophagy. Because the proinflammatory phenotype is also induced with

PDGF-BB, we suggest that the proinflammatory phenotype could be a common feature of dedifferentiated VSMCs.

Keywords: VSMC, TNF- α , autophagy, dedifferentiation, migration, proliferation and cytokines.

7. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en el mundo, tanto en los países desarrollados como en los de en vía de desarrollo [1]. Según el informe de la Organización Mundial de la Salud del 2013, el número total de muertes anuales debido a ECV fue más de 17 millones, aproximadamente el 30% de las muertes totales [1].

De entre todas las complicaciones cardiovasculares, las que presentan remodelado de la pared de los vasos son de gran importancia ya que pueden inducir disfuncionalidad vascular, promoviendo el desarrollo de otras patologías cardiovasculares. Al día de hoy todavía no se conocen a cabalidad los mecanismos de este remodelado. Esta Tesis está orientada para aumentar el conocimiento en esta área de la Ciencia.

7.1. FISIOLÓGÍA DEL SISTEMA ARTERIAL

El aparato vascular y, dentro de él, el sistema arterial, está preparado para mantener una presión arterial y unos niveles óptimos de perfusión a los diferentes tejidos, asegurando así su oxigenación, nutrición, detoxificación y funcionalidad. Desde el punto de vista histológico las arterias presentan una estructura básica común que se modifica, según los diferentes tramos, para adaptarse a los requerimientos [2]. En la organización básica de la pared vascular se pueden distinguir tres capas:

1. La capa interna está formada principalmente por una capa de células endoteliales que se apoyan sobre la lámina basal constituida por tejido conectivo. Estas células endoteliales delimitan el lumen del vaso y se encuentran estrechamente unidas unas a otras restringiendo la difusión de moléculas de gran tamaño a través del endotelio. Esta capa es semipermeable y retiene el plasma y los componentes celulares de la sangre en la circulación, mientras que permite el paso de nutrientes entre la sangre y los tejidos. El endotelio, además, secreta agentes vasoactivos como el óxido nítrico o la prostaciclina que actúan sobre las células de músculo liso vascular (VSMC) adyacentes regulando el flujo sanguíneo local, la angiogénesis, la hemostasis y actúa como superficie antitrombogénica [3].
2. La túnica media suministra la fuerza mecánica para la contracción y está formada por las VSMC dispuestas helicoidalmente y embebidas en una matriz de colágeno, elastina y proteoglicanos. Esta capa permite a las arterias expandirse durante la sístole y encogerse durante la diástole, propiedad fundamental en el caso de las arterias elásticas como la aorta, en donde las VSMC están organizadas en múltiples capas concéntricas separadas por distintas láminas de elastina. El grosor relativo de la túnica media aumenta gradualmente desde la arteria aorta hasta las arteriolas, que poseen una estructura predominantemente muscular [3].

3. La capa externa o adventicia está constituida por fibroblastos y fibras de colágeno orientadas longitudinalmente. Además, presentan pequeños vasos sanguíneos que constituyen el *vasa vasorum*, los cuales irrigan a los vasos sanguíneos de gran calibre; y una red de terminaciones nerviosas amielínicas que liberan los neurotransmisores a nivel del músculo liso vascular [3].

Nuestro trabajo se va a centrar en las arterias de alto calibre ya que al igual que las arterias de calibre intermedio, desarrollan aterosclerosis. Hay dos tipos de arterias:

1. Arterias elásticas, como la aorta y la iliaca, que tienen una pared vascular muy distensible debido a que su túnica media es rica en elastina [4].
2. Arterias musculares, como arterias mesentéricas, cerebrales y coronarias. Son arterias de pequeño calibre donde la túnica media es más gruesa y contiene más VSMC. Los mayores cambios en la presión se producen en arterias pequeñas ya que su resistencia al flujo es mucho mayor [4].

7.2. REMODELADO DE LA PARED VASCULAR

El remodelado de la pared de los vasos sanguíneos es un fenómeno dinámico que tiene lugar durante el desarrollo fisiológico de los seres vivos,

aunque también surge como consecuencia de diversas situaciones patológicas como la aterosclerosis y la hipertensión arterial.

La pared vascular está continuamente expuesta a fuerzas hemodinámicas como la presión luminal y las fuerzas de cizalla (*shear stress*), condicionando el tipo de flujo de sangre que pasa a través del vaso. Las alteraciones en estas fuerzas y/o modificaciones estructurales en la pared vascular pueden producir cambios en los componentes celulares y estructurales de la pared, fenómeno conocido como remodelado vascular [5]. En función de los cambios producidos en el diámetro y en el grosor de la pared vascular, el remodelado puede ser positivo, cuando aumenta el grosor de la pared manteniendo el diámetro del lumen; o negativo, cuando el diámetro de la luz del vaso disminuye o incluso se ocluye produciendo el cese del flujo sanguíneo de la zona afectada [6].

7.3. ESTRUCTURA DE LA CÉLULA DE MÚSCULO LISO VASCULAR

Las VSMC son células con forma de huso, con una longitud que varía entre 20 y 100 μm y una ancho en la zona central de aproximadamente 5 μm . Estas células se disponen a lo largo del eje del vaso envolviéndolo según un patrón helicoidal, con lo que su tensión contráctil (tono vascular) regula el diámetro del vaso [7]. El citoplasma de estas células contiene filamentos delgados de actina y miosina, siendo los de actina mucho más largos que los

del músculo estriado, y en lugar de estar organizados en sarcómeros, como los miocitos cardiacos, se sitúan de una forma aparentemente más desorganizada. La disposición puede ser paralela, oblicua o transversal con respecto al eje longitudinal de la célula y se ancla en su extremo a cuerpos densos dentro del citoplasma y a bandas densas en la cara interna de la membrana plasmática [7].

Los extremos libres de los filamentos de actina interaccionan con los filamentos de miosina, de tal modo que los filamentos de actina situados a cada lado de un filamento de miosina se desplazan en direcciones opuestas durante el ciclo de los puentes cruzados. Esto produce el acercamiento de los cuerpos densos, provocando el acortamiento y el engrosamiento del citoesqueleto y por lo tanto de la célula. Además, las bandas densas están unidas a la matriz extracelular mediante integrinas, permitiendo la distribución de la fuerza contráctil a través de toda la pared vascular [8].

La matriz extracelular (ECM), es un entramado de moléculas de proteínas y carbohidratos sintetizados y secretados por las células y que se disponen en el espacio intercelular. En el caso de los vasos sanguíneos la ECM está formada principalmente por colágeno tipo IV, aunque también se encuentra colágeno tipo I y tipo III (especialmente en situaciones patológicas), elastina, proteoglicanos y diferentes factores solubles que van controlando procesos tan importantes como la migración y la proliferación celular [9]. Además, también es

importante para mantener la arquitectura celular y permitir la adhesión de las células, la comunicación intercelular y la diferenciación [10].

7.4. VSMC E INFLAMACIÓN

Debido a que gran parte de las enfermedades causan con inflamación, se hace interesante estudiar el comportamiento de las VSMCs en este ambiente inflamatorio, no sólo cómo responde frente estímulos proinflamatorios sino también si son capaces de secretar ellas mismas estos estímulos. Existen pocos trabajos que han estudiado la relación existente entre la inflamación y las VSMCs. Una de las áreas más estudiadas es la expresión de los receptores tipos Toll (TLRs), que reconocen patrones moleculares de bacterias y virus y permiten inducir la inmunidad innata. Se sabe que las VSMCs expresan TLR2 y TLR4 [11], y estos receptores aumentan en procesos ateroscleróticos [12]. TLR2 reconoce lipoproteínas bacterianas y en VSMCs al activarse este receptor aumenta la secreción de IL-6 [13]. Por otro lado, TLR4 está asociado con la secreción de IL-1 α e IL-6 [14], además de aumentar la expresión de metaloproteasas favoreciendo el remodelado vascular [15].

Además, las VSMCs también responden a otros estímulos proinflamatorios como la IL-1 β e IL-4, los cuales producen un aumento de la expresión de VCAM1, ICAM1 y metaloproteasas [16,17]. Incluso procesos fisiológicos normales, como el envejecimiento también puede inducir un fenotipo

inflamatorio en estas células, ya que se ha visto que en aortas viejas hay una mayor expresión de TLR4 e IL-6 en las VSMCs [18].

Respecto a la expresión y secreción de citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias, propias de una respuesta inmunológica adaptativa, es poco lo que se conoce. Se sabe, como ya mencioné anteriormente, que estas células secretan IL-1 α e IL6 ante un estímulo proinflamatorio, lo mismo que IL-8 [19]. Sin embargo, se desconoce más sobre las citoquinas secretadas por estas células en otras condiciones distintas a las mencionadas anteriormente.

7.5. MODULACIÓN FENOTÍPICA DE LAS VSMC

Las VSMC son capaces de modular su fenotipo en respuesta a cambios en su entorno [20]. En las etapas tempranas de la vasculogénesis las VSMC presentan una gran capacidad migratoria y proliferativa y un alto índice de síntesis de matriz extracelular, todas ellas características del fenotipo sintético. Además, en estos estados tempranos las VSMC forman abundantes *gap junctions* con células endoteliales ya que la interacción entre estos dos tipos celulares es crítica para la maduración y el remodelado de los vasos sanguíneos [21]. Por el contrario, las células del músculo liso de vasos sanguíneos maduros muestran poca capacidad de migración y de proliferación, así como una tasa muy baja de síntesis de componentes de matriz extracelular. Es por ello que la célula desempeña principalmente su función contráctil

(fenotipo contráctil) [21]. Tras una lesión vascular las VSMC contráctiles y diferenciadas sufren modificaciones transitorias en su fenotipo pasando de nuevo a un estado sintético y desdiferenciado, teniendo un papel fundamental en la reparación de estas lesiones [21].

El alto grado de plasticidad de estas células tiene sus desventajas ya que se pueden producir cambios fenotípicos anormales que contribuyen al desarrollo y progresión de enfermedades vasculares. De hecho, hay evidencias de que la remodelación fenotípica puede provocar la proliferación inadecuada como en el caso de la hipertensión, o en el desarrollo de placas ateroscleróticas [22]. Por esto, la participación de los factores que tengan un papel importante en esta modulación fenotípica tiene un interés importante en el ámbito científico-médico.

En cuanto a los factores que modulan el fenotipo de las VSMC se encuentran principalmente:

1. Factores de crecimiento: El factor de crecimiento derivado de plaquetas-BB (PDGF-BB), producido principalmente por plaquetas y macrófagos está implicados en la desdiferenciación celular y en la estabilización de la placa de ateroma [23].
2. Angiotensina II: La Ang II induce proliferación y migración celular, además de hipertrofia en VSMCs, todas ellas características del fenotipo sintético [24-26].

3. Las MMPs son secretadas por VSMCs en mayor cantidad en el fenotipo sintético, lo que contribuye al remodelado de la ECM y promueve el cambio fenotípico [21].
4. Factores mecánicos o fuerzas hemodinámicas: El cese del flujo sanguíneo y la disminución de la presión se asocian con la atrofia y el remodelado de las arterias [22].
5. Citoquinas: Hay antecedentes de que el TNF- α induce migración y proliferación celular en las VSMC, efecto muy general en otros tipos celulares [27]. Sin embargo, nada se sabe de si esta citoquina proinflamatoria induce cambios en los otros componentes importantes del cambio de fenotipo en estas células como la expresión de proteínas contráctiles y la matriz extracelular. Además, también sería interesante saber si el TNF- α induce secreción de proteínas proinflamatorias, las cuales también pueden tener un efecto directo sobre el cambio de fenotipo de las VSMCs.

7.6. FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA (TNF- α).

El TNF- α es una citoquina proinflamatoria pluripotencial que tiene un papel importante en diversos procesos celulares incluyendo proliferación, diferenciación, inflamación y apoptosis, por lo que es una importante diana terapéutica en múltiples patologías [28]. Es una proteína secretada

principalmente por los monocitos y macrófagos activados, así como por los linfocitos T, aunque también puede ser producido por otros tipos de células tanto inmunológicas como endoteliales e incluso tumorales [28]. Es una citoquina que se produce en respuesta a estímulos exógenos y endógenos, siendo el más potente la endotoxina bacteriana o lipopolisacárido (LPS) [28].

El TNF- α se sintetiza como un precursor de membrana de 26 kDa y 233 aminoácidos que es cortado por la proteasa TACE liberando la forma madura de 17 kDa y 157 aminoácidos [29]. Diversas evidencias experimentales sugieren que ambas formas participan en la respuesta inmunológica [30]. La forma unida a membrana lo hace de forma local y depende de la interacción entre células ya que puede actuar como ligando y receptor en los procesos inflamatorios, mientras que la forma soluble ejerce sus funciones en células distantes de las células que lo secretan [31].

Las funciones del TNF- α están mediadas por el homotrímero del TNF- α soluble de 51 kDa que se puede unir a dos receptores triméricos de membrana, TNFR1 y TNFR2, conocidos también como p55 o p60 y p75 o p80 [31-33]. Ambos receptores tienen diferencias en su expresión génica, el TNFR1 se produce en células nucleadas, mientras que el TNFR2 altamente regulado, se expresa fundamentalmente en células del sistema inmunológico, endoteliales y nerviosas [31-33]. Debido a su expresión constitutiva se sabe que el TNFR1 es el principal receptor regulador de las funciones de TNF- α y este receptor, a

pesar de ser muy similar al TNFR2, contiene un dominio que regula la muerte celular programada a través de varias proteínas accesorias asociadas [28,31-33].

Una vez iniciada la señalización celular mediada por TNFR1, y sus proteínas accesorias, el complejo TRADD-RIP1-TRAF2 es liberado de TNFR1 e inmediatamente después comienza la fosforilación de los inhibidores del factor nuclear NF- κ B (IKK β) [31-33]. Por otro lado TRAF2 puede asociarse a la quinasa inductora de NF- κ B (NIK) que es necesaria junto a Akt para fosforilar IKK α [34]. Ambas IKKs activadas fosforilan a I κ B, un inhibidor citoplasmático del factor de transcripción nuclear κ B (NF- κ B), gatillando su ubiquitinación y subsecuente degradación, que lleva a la liberación y translocación nuclear de NF- κ B [35]. Finalmente, este factor de transcripción actúa en el núcleo celular, donde se une a secuencias específicas del ADN y expresa genes involucrados en la síntesis de proteínas relacionadas principalmente con la inmunidad (Figura 1). Por otro lado, el TNFR2 está involucrado en la proliferación de las células del sistema inmunológico, la citotoxicidad y la activación de NF- κ B [28,31-33].

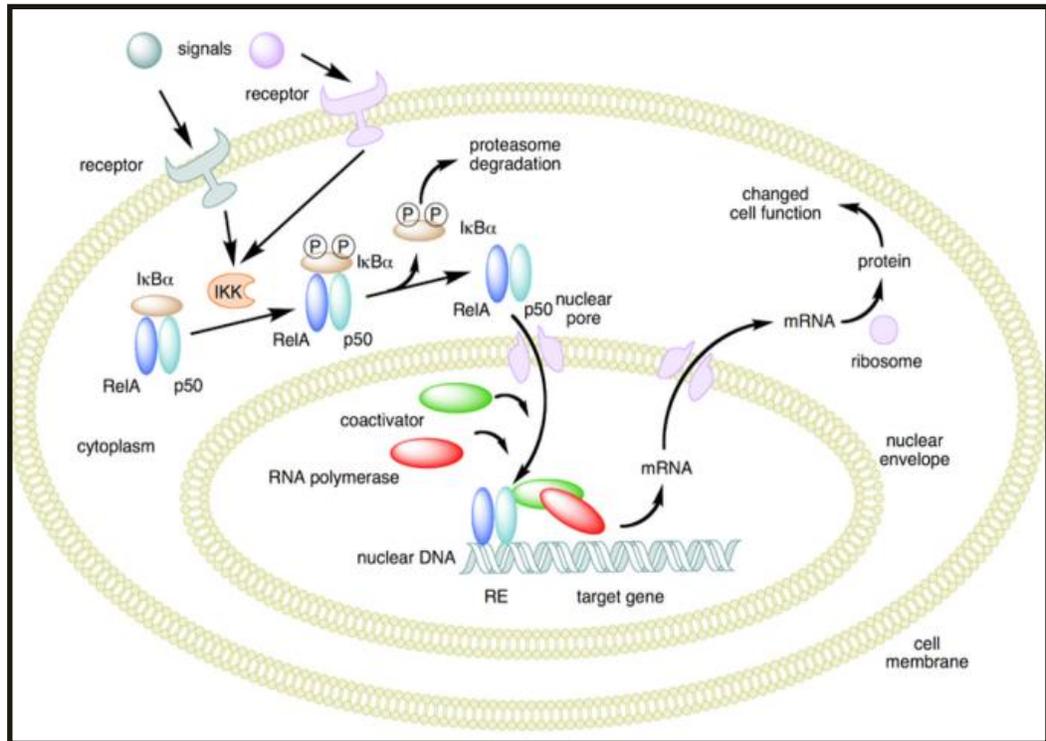


Figura 1. Transducción de señales de la vía NF-κB.

7.7. INFLAMACIÓN Y ATROSCLEROSIS

La aterosclerosis es un proceso inflamatorio crónico de origen multigénico y multifactorial que comienza por modificaciones oxidativas de los lípidos en sangre que causan una disfunción en el endotelio vascular [36]. Es la enfermedad más común y la primera causa de morbilidad en el mundo. Según la OMS, esta enfermedad es y seguirá siendo una de las principales causas de morbilidad en el futuro [37].

Esta enfermedad multifactorial se desarrolla de forma intermitente en el tiempo, observándose que el crecimiento de las placas es discontinuo, intercalándose periodos de inactividad con otro de rápida evolución.

El origen de la placa de ateroma son los cambios en la concentración y en la estructura de algunas lipoproteínas plasmáticas, y la disfunción endotelial. La mayor parte de los lípidos depositados en las lesiones ateroscleróticas provienen de las LDL circulantes, que ingresan en la pared vascular a través del endotelio lesionado o disfuncional. En estas condiciones, las LDL se acumulan en la íntima arterial donde entran en contacto con componentes de ECM. En pacientes diabéticos es posible que, además, se produzca glicación no enzimática de las apolipoproteínas y de otras proteínas arteriales, lo que aceleraría la progresión de la lesión [38].

Las LDL atrapadas en la íntima, fuera de los antioxidantes del plasma, pueden ahora oxidarse por radicales libres de oxígeno producidos por las células endoteliales. Estas LDL oxidadas (oxLDL) representan un potente estímulo proinflamatorio y son capaces de inducir la expresión por las células endoteliales, las VSMC y los macrófagos de proteínas proinflamatorias como TNF- α y otras citoquinas [39]. Las principales citoquinas proinflamatorias son la IL-1, la IL-6, y el TNF- α , mientras que la principal citoquina antiinflamatoria es la IL-10. Estos mediadores de inflamación tendrán acciones sinérgicas, induciéndose su producción entre ellos, frenando o aumentando las vías de autocontrol.

La IL-1 es producida por la mayoría de las células nucleadas. Sin embargo, los principales productores en la inflamación son los macrófagos [40]. Existen dos formas de IL-1, denominadas IL-1 α y la **IL-1 β** , con una homología inferior al 30% entre ellas, pero capaces de unirse a los mismos receptores de superficie celular y mediar las mismas actividades biológicas. Los dos polipéptidos de IL-1 se sintetizan en forma de precursores de 31 kDa y se secretan como proteínas maduras de 17 kDa. La forma activa de IL-1 β es el producto escindido, mientras que la molécula de IL-1 α es activa en ambas formas, como el precursor de 33 kDa y como el producto escindido más pequeño [41]. La mayor parte de la IL-1 que se encuentra en circulación es la forma IL-1 β . La IL-1 β es producida por macrófagos, plaquetas y endotelio dañado, y promueve la interacción de las células endoteliales con los leucocitos circulantes, induce la activación y proliferación de monocitos/macrófagos y estimula la proliferación de células de músculo liso y la síntesis del inhibidor del activador del plasminógeno [41]. Diversos estudios sugieren que esta citoquina tiene un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis y la trombosis [42-45]. El efecto biológico lo produciría a través de su receptor tipo I ya que el tipo II solo actúa como señuelo inhibiendo de forma competitiva la unión de la IL-1 β al receptor tipo I [46].

La IL-1 β es producida como una forma inactiva de 31 kDa denominada pro-IL-1 β , la cual es digerida por la proteasa proinflamatoria caspasa 1, que se activa al reclutarse un complejo multiproteico denominado inflammasoma [47].

Este complejo proteico, formado por un receptor de reconocimiento de patrones (NLRP3) la proteína ASC y la procaspasa-1, es activado con el eflujo del ión potasio mediante el canal iónico P2X7 [48], que a su vez es activado por los altos niveles de ATP extracelular o por ribosilación de ADP, propio de células en necrosis y/o apoptosis [49,50]. Esta unión de ATP a los receptores P2X7 permite el reclutamiento del hemicanal panexina-1 formándose un gran poro a través del cual ingresan productos bacterianos como el lipolisacárido al citosol activándose así el inflamasoma [51,52]. Por otro lado, estudios recientes demuestran que en algunos tipos celulares, como los macrófagos, la autofagia basal inhibe la secreción de IL-1 β , mientras que la autofagia inducida aumenta la secreción de IL-1 β [53].

La **IL-6** es una citoquina proinflamatoria que también tiene un papel fundamental en el metabolismo, es por ello que el gen de *IL6* se expresa en tejidos relacionados con el metabolismo energético, como el tejido adiposo, el músculo esquelético y el hipotálamo [54]. Desde el punto de vista metabólico se ha visto relacionado con la resistencia a la insulina y las alteraciones asociadas del perfil lipídico, por lo tanto es una citoquina ampliamente relacionada con la aterosclerosis. Recientes estudios demuestran que los niveles de IL-6 en plasma están aumentados en pacientes ateroscleróticos y es un predictor de síndromes coronarios agudos [54].

La **IL-10** es uno de los principales inhibidores de la síntesis de citoquinas, disminuye la función de los macrófagos e inhibe la producción óxido nítrico y de

citoquinas proinflamatoria [55]. Esta citoquina es producida por los linfocitos y macrófagos y su producción se inhibe mediante IFN- γ e IL-4. Los niveles de IL-10 en pacientes con infarto al miocardio y además esta citoquina regula la IL-6, disminuyendo sus niveles tanto *in vivo* como *in vitro*, lo que sugiere que el balance entre la IL-6 y la IL-10 determina la perpetuación de la aterogénesis [56,57].

Las citoquinas proinflamatorias a su vez son potentes inductores de la vía NF- κ B, vía que induce la expresión de más moléculas inflamatorias, lo que cierra un círculo vicioso proinflamatorio sostenido. Todos estos factores, así como las oxLDL, aumentan la adhesión de monocitos y linfocitos a la pared vascular, facilitan su entrada a través del endotelio, y finalmente los monocitos se transforman en macrófagos que expresan en su membrana receptores captadores o *scavengers* (CD36, LOX-1, SRAI/II), que captan las oxLDL presentes en el espacio extracelular y se convierten en células espumosas. La acumulación de células espumosas es característica de las lesiones iniciales de la aterosclerosis [38]. Los macrófagos cargados de lípidos y de células espumosas liberan oxLDL, citoquinas como IL-1 β y TNF- α , radicales libres y factores de crecimiento como PDGF que produce un daño endotelial mayor, estimula la proliferación de las VSMC y facilita la dediferenciación del fenotipo contráctil al sintético [38]. En este momento se forman las llamadas lesiones fibroproliferativas que están constituidas por un núcleo lipídico o de consistencia blanda y una cápsula fibrosa. Estas placas no son necesariamente

estenosantes, pero tienen un elevado riesgo de rotura con aparición de fenómenos trombóticos [38].

7.8. EFECTO DEL TNF- α SOBRE LAS VSMC

Se ha observado una relación directa entre el TNF- α y la formación de la placa aterosclerótica a través de la oxidación de LDL. En pacientes con hiperlipidemia se ha reportado una correlación entre los niveles altos de TNF- α y LDL, y negativamente con los niveles de HDL [58]. Esta citoquina tiene un papel importante en el inicio, progresión, susceptibilidad y gravedad de la aterosclerosis [59-61]. El TNF- α se ha descrito incluso como predictor de muerte en esta enfermedad [62] ya que los altos niveles de TNF- α en suero correlacionan con el número de vasos obstruidos y con la puntuación de gravedad de Gensini, una prueba que evalúa la proximidad y gravedad de las lesiones [63]. Por otro lado, los niveles elevados de TNF- α en plasma se correlacionan con el deterioro de la función cardíaca y renal de pacientes ateroscleróticos [64].

Otros efectos reportados respecto al efecto de TNF- α sobre las VSMCs es que esta citoquina aumenta la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, ambas son moléculas de adhesión necesarias para el reclutamiento de las células inmunológicas que circulan por el torrente sanguíneo [65-69]. Además, también se sabe que TNF- α aumenta también la formación de ROS en VSMCs [70] e

induce su proliferación y migración [27]. Es tan claro el efecto del TNF- α sobre estas células que también hay estudios que evalúan cómo frenar estos efectos descritos con moléculas naturales la genipina y la naringenina [27,71].

Pero debido a que en muchos tipos celulares el TNF- α induce proliferación y migración celular, no sabemos si este efecto es porque la VSMC se está desdiferenciando o porque únicamente está proliferando y migrando como en los otros tipos celulares. Por ello es interesante evaluar otros parámetros de diferenciación celular como la expresión de proteínas contráctiles y de matriz extracelular.

7.9. DEGRADACIÓN PROTEICA INTRACELULAR. AUTOFAGIA

La autofagia, es uno de los dos mecanismos celulares, junto al proteosoma, de degradación de proteínas y componentes celulares. Es un proceso programado que permite que las células se adapten a niveles de estrés y que comienza con el secuestro de material citoplasmático en el autofagosoma, una estructura grande de doble membrana de aproximadamente 500-1500 nm en células humanas [72,73]. Cuando el autofagosoma se fusiona con los endosomas se forma el autofagosoma intermedio, que cuenta con bombas de protones por lo que es una estructura ácida de membrana única. Cuando este autofagosoma intermedio interacciona con el lisosoma pasa a denominarse autolisosoma, y es entonces cuando el contenido vacuolar es digerido y reciclado en aminoácidos y energía [72,73]. El proteosoma degrada

la mayoría de las proteínas endógenas, incluidas las aberrantes y mal plegadas, mientras que el sistema lisosomal degrada principalmente proteínas extracelulares y componentes citoplasmáticos. Por otro lado, las proteínas de vida media corta, entre 10 y 120 minutos [74], suelen degradarse en el proteosoma, mientras que la mayoría de las proteínas de larga vida media, entre 24 y 72 h y otras moléculas y organelos son degradados en lisosoma [75].

La autofagia ocurre espontáneamente a niveles basales [76] y se conoce como “autofagia basal”. Sin embargo este proceso se regula rápidamente cuando las células necesitan producir nutrientes y energía en condiciones de privación de nutrientes [77], disminución de factores de crecimiento [78] y cuando se acumulan componentes dañados en la célula, conociéndose el proceso en este caso como “autofagia inducida”. Además, durante una infección patógena [79] o durante estrés oncogénico, como sobreexpresión de ciertos oncogenes como Ras, las células también aumentan su nivel de autofagia [80].

Las proteínas y los genes ATG (AuTophagy) y AUT (AUTophagocytosis) involucrados en la autofagia han sido caracterizados principalmente en levadura [81,82], y esta nomenclatura se ha unificado como ATG [83]. Podemos dividir estas proteínas en tres grupos funcionales, dependiendo del papel que ejerzan en la maquinaria de la autofagia (Figura 2).

1. ATG9 y ATG1: La ATG9 es una proteína integral de membrana de endosomas o de trans-Golgi que se localiza en la membrana

preautofagosomal. No se encuentra en autofagosomas maduros pero es necesario para su formación, la que ocurre cuando interacciona con ATG2 [84]. ATG1 es una ser-tre kinasa que forma un complejo con proteínas reguladoras (ATG13 y ATG17). Su actividad kinasa es importante para la autofagia, ya que en este complejo kinasa regula la magnitud de la autofagia [85,86]. En condiciones ricas en nutrientes, ATG13 se hiperfosforila y su asociación con ATG1 se bloquea, sin embargo en condiciones favorables para la autofagia se defosforila parcialmente, se permite la interacción ATG1 con ATG13 y se genera la membrana del autofagosoma [87].

2. Complejo **Beclin1/ATG6**: La disminución del aporte de aminoácidos en la célula estimula la actividad de PI3K-III asociada a Beclin1 induciendo autofagia [88].
 - a. Complejo Beclin1-PI3K-III: Beclin1 se une al PI3K-III formando un complejo que se localiza en el trans-Golgi [89].
 - b. Complejo Beclin1-UVRAG: UVRAG se une Beclin1 a través de su dominio CCD, induciendo la formación del complejo Beclin1-PI3K lo que estimula la actividad GTPasa de Rab7, así como la fusión del autofagosoma con el lisosoma o el endosoma tardío, favoreciendo la degradación del contenido de la vesícula autofágica [90].

c. Complejo Beclin1-Ambra1: Ambra 1 también es un activador de autofagia mediante la unión con Beclin1 [91].

3. **LC3** o ATG8 fue la primera molécula autofágica encontrada, que se localizó en estructuras autofagosomales [92]. La proteína LC3 se expresa en todas las células eucariotas en condiciones basales pero inmediatamente después de su síntesis es fragmentada en su extremo C-terminal por la proteasa Atg4 formándose la LC3-I, que es la forma que reside en el citosol. Cuando se induce la autofagia, LC3-I se conjuga covalentemente con la fosfatidiletanolamina a partir del residuo glicina de su extremo C-terminal, formándose así una nueva molécula denominada LC3-II, que es un conjugado de LC3-fosfatidiletanolamina. Este complejo, debido a la presencia de la fosfatidiletanolamina, se une tanto a la membrana interna como a la externa del autofagosoma [93-95]. Tras la maduración del autofagosoma, la proteína LC3-II localizada en la membrana externa es fragmentada por proteasas y reciclada, mientras que la LC3-II de la membrana interna es degradada en el lisosoma [96,97]. Por lo tanto, un aumento de los niveles de LC3-II y la aparición de un puntillado característico en experimentos de transfección con la proteína de fusión GFP-LC3 son indicadores fiables para estimar un aumento en la formación de autofagosomas [98].

Sin embargo, la autofagia es un proceso dinámico de degradación en el que los autofagosomas están en continua formación y degradación, por lo que

el número de autofagosomas observados en un momento determinado es un balance entre su velocidad de formación y su velocidad de conversión a autofagolisosomas. Por lo tanto, una acumulación de autofagosomas puede ser debido a una inducción de la autofagia o a una inhibición de la fase de fusión autofagosoma-lisosoma, siendo importante añadir el estudio de otro marcador para confirmar la inducción de la autofagia. La proteína **p62** es un importante eje de señalización ya que es capaz de reclutar y oligomerizar moléculas de señalización en el citoplasma [99,100]. Es una proteína capaz de unirse tanto a LC3 como a ubiquitina, por lo que tiene un papel importante en el marcaje de proteínas disfuncionales poliubiquitinadas hacia los autofagosomas, es decir, la disminución de sus niveles indica una inducción del proceso autofágico [101,102].

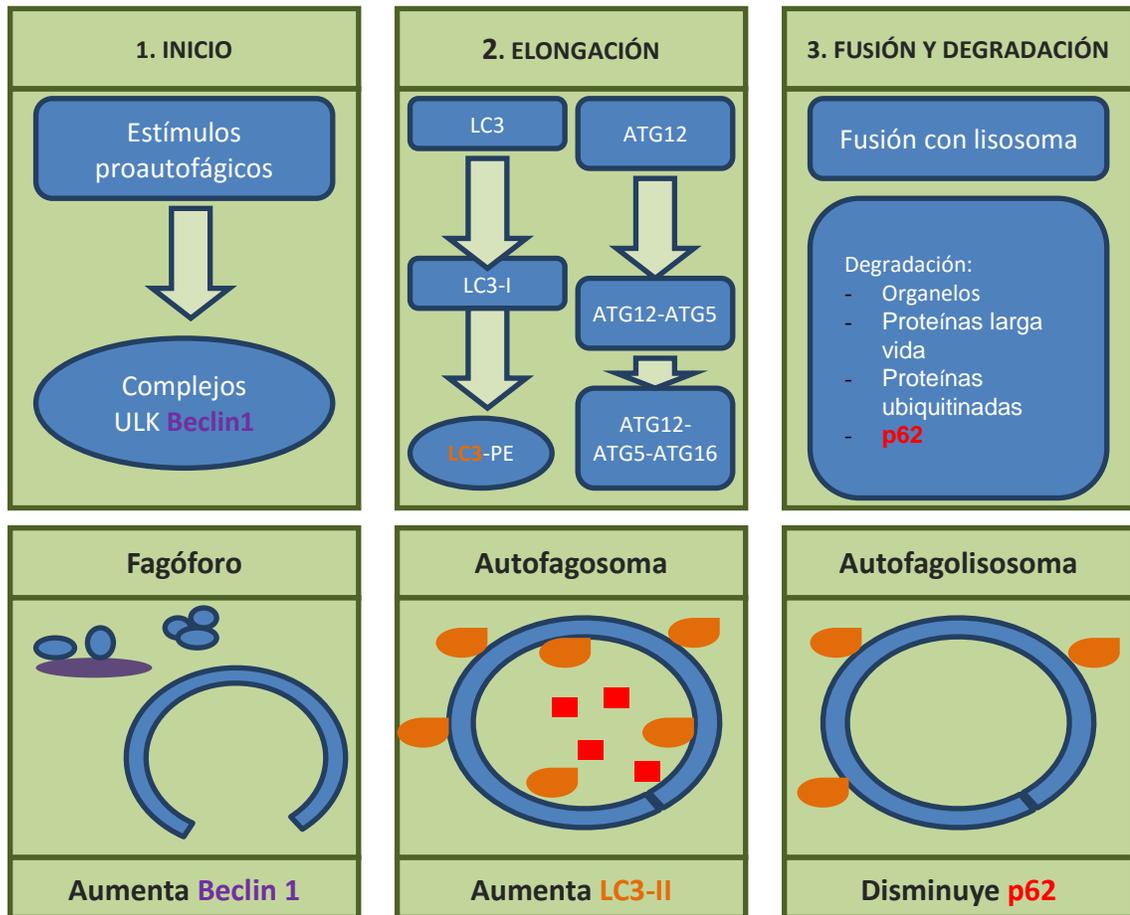


Figura 2. Mecanismo secuencial de la autofagia. Proteínas involucradas utilizadas como marcadores.

Otra vía menos conocida en su papel en la autofagia es la vía NF- κ B, que es una vía muy conocida por su actividad proinflamatoria. La vía clásica o canónica del NF- κ B es activada, como ya comentamos anteriormente, cuando el inhibidor I κ B es fosforilado por la kinasa I κ K, un complejo proteico formado por las subunidades I κ K α , I κ K β e I κ K γ . El complejo I κ K responde a múltiples estímulos como la ausencia de nutrientes, la presencia de especies reactivas de oxígeno o estímulos de citoquinas como TNF- α . Cuando el factor I κ B se

fosforila posteriormente se ubiquitina y se degrada por proteosoma y como consecuencia el factor NF- κ B queda libre y se transloca al núcleo donde actúa como factor de transcripción. Entre sus sitios de unión se encuentra el promotor de Beclin1 modulando positivamente la autofagia [103].

Por otro lado, los estímulos autofágicos activan la vía NF- κ B pero esto lo hacen de forma dependiente de la autofagia. En cultivo de fibroblastos se ha reportado que estímulos autofágicos como rapamicina activan la vía NF- κ B, pero esto no ocurre si a las células se les ha silenciado genes que codifican proteínas esenciales en la autofagia como el Atg5 o el Atg7. Además, en este mismo estudio se reportó que el TNF- α activa la vía NF- κ B tanto en células HeLa como A549s, pero esto ocurría en menor medida cuando se silenciaban genes de autofagia como atg5, atg7 o beclin1 [104]. Por lo tanto, en algunas líneas celulares no sólo la activación de la vía NF- κ B activa la autofagia, sino que además la autofagia regula la activación de la vía NF- κ B, por lo que a este nivel la inflamación está regulada por la autofagia.

7.10. AUTOFAGIA Y CAMBIO FENOTÍPICO DE LAS VSMC

A pesar de que hay varios estudios que describen la importancia de la autofagia en las enfermedades cardiovasculares, es poco lo que se sabe sobre la importancia de la misma en el cambio de fenotipo de las VSMCs. A día de hoy sólo hay un estudio que demuestra que el cambio de fenotipo inducido por

PDGF-BB es dependiente de autofagia [23]. Debido a la importancia del proceso de desdiferenciación de estas células en la génesis y progresión de las enfermedades cardiovasculares, cobra vital importancia entender los mecanismos involucrados en estos cambios.

8. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

8.1. HIPÓTESIS

El TNF- α induce el fenotipo sintético y la secreción de citoquinas proinflamatorias en las células musculares lisas vasculares a través de un mecanismo dependiente de la activación de la macroautofagia.

8.2. OBJETIVO GENERAL

Determinar la participación de la autofagia en el cambio de fenotipo de células musculares lisas vasculares inducida por TNF- α y el efecto de este cambio de fenotipo sobre la secreción de citoquinas proinflamatorias.

8.3. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1) Determinar si TNF- α induce macroautofagia y la desdiferenciación, proliferación y migración en la línea celular de músculo liso vascular A7r5.
- 2) Evaluar si la desdiferenciación, proliferación y migración de las células A7r5 inducidas por TNF- α depende de la activación de la macroautofagia a través de NF- κ B.
- 3) Analizar si el tratamiento de las células A7r5 con TNF- α induce un aumento en la expresión de citoquinas proinflamatorias y una disminución de las antiinflamatorias a través de un mecanismo dependiente de macroautofagia.

9. METODOLOGÍA

9.1. CULTIVO CELULAR

Se utilizó la línea celular A7r5, derivada de músculo liso de aorta torácica de rata (*Rattus norvegicus*, ATCC CRL-1444). Esta línea celular se cultivó en medio DMEM (glucosa 25 mM, piruvato 1 mM, bicarbonato al 0,15%, pH 7,2) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% [v/v]. Las células se cultivaron en incubadores termorregulados a 37°C, en una atmósfera de aire humidificada con 5% de dióxido de carbono y 95% de aire. Las células se plaquearon al alcanzar una confluencia del 80-90%.

9.2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS TOTALES

Las células se sembraron en placas de 60 mm, se cultivaron hasta alcanzar una confluencia del 80-90% y se le cambió el medio a uno suplementado con 2% SFB 18 h previo a los estímulos a menos que se indique lo contrario. Una vez finalizado los diferentes estímulos, las células se lavaron tres veces con solución de amortiguador fosfato salino PBS (NaCl 137 mM; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 10 mM; KH₂PO₄ 2 mM; pH 7,4) fría y luego se lisaron con 80 µL de amortiguador de lisis RIPA (Tris-HCl 10 mM pH 7,4; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; ácido deoxicólico 1% [v/v]; tritón X-100 1% [v/v]) suplementado con inhibidores comerciales de proteasas y fosfatasa (Roche). El

homogenizado se transfirió a un tubo Eppendorf y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min a 4°C. El sobrenadante se recuperó en un tubo nuevo y se determinó su concentración por el método de Bradford (BioRad protein assay, BioRad, Hercules, CA, EEUU). Finalmente, el extracto se desnaturalizó a 100°C por 5 min en amortiguador SDS-PAGE 4x (Tris-HCl 25 mM pH 7,5; glicerol 32% [v/v]; 2 mercaptoetanol 20% [v/v]; SDS 9,2% [p/v]; azul de bromofenol 0,02% [p/v]). Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

9.3. ANÁLISIS POR WESTERN BLOT

Las muestras se resolvieron por electroforesis en geles de SDS poliacrilamida de 8-15% dependiendo de la proteína a analizar. Las proteínas se electrotransferieron a membranas de PVDF, para su posterior detección con anticuerpos el anticuerpo correspondiente según la Tabla 1. Las membranas se revelaron usando un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa y ECL. La luminiscencia se detectó usando sistema de captura digital (Syngene) y las imágenes se procesaron mediante el programa computacional UN-SCAN-IT gel.

Tabla 1. Características de los anticuerpos primarios usados en este trabajo.

PROTEÍNA	kDa	ORIGEN	MARCA	CLONALIDAD	DILUCIÓN WB
Colágeno tipo I	130	Conejo	Millipore	Policlonal	1 en 2000
p62	62	Ratón	Abcam	Monoclonal	1 en 2000
Osteopontina	60	Conejo	Abcam	Policlonal	1 en 2000
Beclin1	60	Conejo	Cell Signaling	Policlonal	1 en 2000
α -SMA	42	Ratón	Abcam	Monoclonal	1 en 20000
GAPDH	37	Conejo	Sigma	Policlonal	1 en 50000
SM22	22	Conejo	Abcam	Policlonal	1 en 10000
LC3-I/II	18-16	Conejo	Cell Signaling	Policlonal	1 en 1000

9.4. INHIBICIÓN DE LA AUTOFAGIA

La autofagia se inhibió usando un método farmacológico y otro genético. El tratamiento farmacológico consistió en tratar las células con cloroquina 20 μ M durante las últimas 4 h de estímulo en los experimentos de estudio del flujo autofágico, y con cloroquina 5 μ M durante 24 h en los experimentos que requirieron inhibir la autofagia desde el comienzo del experimento. El tratamiento genético consistió en la transfección de las células con un siRNA de Beclin1, el cual se realizó con una concentración final de 100 nM del siRNA. Tres μ L del siRNA se disolvieron en 177 μ L de Optimem, mientras que 4 μ L de oligofectamina e disolvieron en 20 μ L de Optimem, incubándose ambas mezclas durante 5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, las soluciones

se mezclaron, se agitaron cuidadosamente y se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente. La mezcla resultante se agregó lentamente a la placa de 35 mm lavada con PBS y mantenida a en volumen final de 1 mL de medio Optimem sin suero. Las células se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ durante 6 h y a continuación se lavaron e incubaron en medio con 2% de SFB durante 24 h para posteriormente realizar los estímulos pertinentes.

9.5. VISUALIZACIÓN VESÍCULAS AUTOFAGOSÓMICAS.

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos con cubreobjetos de vidrio de 18 mm incluyendo 2×10^5 células por pocillo. Posteriormente las células se privaron con 2% de SFB durante 24 h y se transdujeron con adenovirus Ad LC3-GFP durante 24 h usando una multiplicidad de infección (MOI) de 185. Como control se utilizó un adenovirus que sobreexpresa β -galactosidasa (Ad LacZ). Pasado el tiempo de transducción las células se estimularon con TNF- α en presencia y en ausencia de cloroquina. Después de 24 h, las células se lavaron con PBS y se incubaron durante 15 min en una solución de paraformaldehído al 4% [p/v] para fijarlas. Finalmente los cubreobjetos se trataron con Hoechst (dilución 1:1000) para teñir los núcleos y se montaron en portaobjetos utilizando DAKO. Las muestras se analizaron en un microscopio confocal Carl Zeiss Pascal 5.

9.6. DESDIFERENCIACIÓN DE LAS VSMC

Se evaluó determinando α -SMA, SM22, calponina, colágeno tipo I y osteopontina por Western blot.

9.7. TINCIÓN CON FALOIDINA-RODAMINA

Las células después de su respectivo estímulo se fijaron con paraformaldehído al 4% [v/v] durante 20 min. Posteriormente se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0,1% [v/v] durante 15 min. Tras un bloqueo con BSA al 3% [p/v], las células se tiñeron con faloidina-rodamina (1:500). Finalmente, se montaron con solución de montaje y con Hoechst diluido (1:1000) y se observaron las fibras de actina en un microscopio de epifluorescencia.

9.8. PROLIFERACIÓN POR ENSAYO MTT

La actividad reductasa MTT se determinó en células sembradas en una placa de 96 pocillos con una densidad de 25.000 células/pocillo. El medio de cultivo se retiró tras el estímulo y se reemplazó por 100 μ L de reactivo MTT en concentración 0,25 mg/mL en medio de cultivo sin suplementar. Las placas se incubaron durante 4 h en condiciones estándar de cultivo y posteriormente se descartó el sobrenadante y se adicionó 100 μ L de DMSO para disolver el formazán. La absorbancia se midió a 560 nm en un espectrofotómetro.

9.9. PROLIFERACIÓN POR INCORPORACIÓN DE TIMIDINA TRITIADA

Las células se cultivaron en medio suplementado con SFB 5% durante 24 h. Posteriormente se realizaron los estímulos pertinentes añadiendo 1 $\mu\text{Ci/mL}$ de [^3H]-timidina 4 h antes del final del estímulo. Al terminar el estímulo las células se lavaron con NaOH 0,1 M y se dejó reposar hasta que las células se lisaron completamente. El lisado se mezcló con 300 μL de solución de centelleo y se midió en un contador de centelleo.

9.10. ENSAYO DE HERIDA

Se realizaron rayas con punta de pipeta amarilla estéril en placas de 24 pocillos con el cultivo celular en confluencia del 80% en toda la superficie. Se incubó la placa en condiciones estándar y se observó al microscopio la migración de las células mediante el cierre de la herida a diferentes tiempos durante las siguientes 48 h. El cierre de la herida se evaluó midiendo con la herramienta regla de Photoshop el ancho de la herida en cuatro puntos diferentes, a los cuales se les sacó la media obteniendo el valor final que sirvió para comparar las diferentes condiciones. Por lo tanto, a menor ancho de herida mayor cierre de la misma y por lo tanto mayor migración.

9.11. ENSAYO DE TRANSWELL

Para realizar este ensayo se utilizaron las cámaras de Boyden de 8 μm de poro en placas de 24 pocillos (BD Biosciences). Se cultivaron 5000 células en 100 μL de medio con 2% de SFB en la cámara superior y se colocó 550 μL de medio con 2% de SFB en la cámara inferior. Se colocó el estímulo en los dos compartimentos. Después de una incubación de 24 h, se removieron las células de la parte superior con un hisopo de algodón. Las células que migraron hacia la cámara inferior se fijaron durante una hora con cristal de violeta y tras cuatro lavados con agua se cuantificó el número de células migradas mediante observación en el microscopio. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células estimuladas que migraron respecto a las células que migraron en la condición control. Se asignó un valor arbitrario de 100 a la muestra control.

9.12. ZIMOGRAFÍA

Se realizó una electroforesis del sobrenadante del cultivo celular en geles de 7,5% de poliacrilamida con 8,5 mg/mL de gelatina. Las proteínas de las muestras se renaturalizaron mediante el tratamiento del gel con Tritón-X-100 al 2,5% en PBS durante 30 min. El gel se incubó con solución reveladora (5 mL Tris-HCl 1 M pH 8, 4 mL NaCl 5 M, 500 μL CaCl_2 250 mM y agua csp 100 mL) durante 18 h a 37°C. El gel se tiñó con azul de Coomassie hasta observar

bandas blanquecinas correspondientes a las zonas de actividad catalítica de las metaloproteasas.

9.13. ELISA

Los niveles en el sobrenadante celular de IL-1 β , IL-6 e IL-10 se determinaron usando kits ELISA R&D según el protocolo del proveedor. Brevemente, las muestras se centrifugaron a 1.000 rpm durante 5 min para desechar los restos celulares y los sobrenadantes se almacenaron a -80°C durante no más de 3 semanas. El sobrenadante (50 μ L) se incubó con el anticuerpo de captura fijado en la placa durante 2 h a temperatura ambiente. Después de realizar 5 lavados con la solución de lavado, se agregó 100 μ L del anticuerpo de detección conjugado y se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 5 lavados y se añadió la solución sustrato y se determinó la densidad óptica a 450 nm, con una corrección a 540 nm. El contenido de la citoquina se determinó usando una curva estándar preparada con cantidades conocidas de las ILs. De acuerdo a las especificaciones del fabricante la sensibilidad del ensayo para la IL-1 β , IL-6 e IL-10 es de 5, 21 y 10 pg/mL, respectivamente. Todas las muestras se midieron por duplicado.

9.14. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados se muestran como el promedio \pm error estándar medio (EEM) de al menos 3 experimentos independientes. Para estudiar la significancia estadísticas de los resultados se utilizó el análisis estadístico t-student o ANOVA, dependiendo las condiciones, y post-test según lo indicado en cada figura.

10. RESULTADOS

10.1. EFECTO DE TNF- α SOBRE LA AUTOFAGIA EN CÉLULAS A7r5

10.1.1. Efecto de la privación de suero sobre la autofagia en la línea celular A7r5

El objetivo principal de esta Tesis es evaluar el efecto del TNF- α sobre el cambio de fenotipo en la línea celular A7r5 y el papel de la autofagia en este proceso. Para realizar esta evaluación es necesario privar las células de SFB durante 24 h. Sin embargo, esta privación podría inducir autofagia dificultando nuestro estudio. Por lo tanto, se hizo necesario evaluar el efecto de diferentes concentraciones de SFB sobre la autofagia en las células A7r5.

Para estudiar la autofagia evaluamos los niveles proteicos de LC3-II mediante Western blot, en células A7r5 cultivadas con 10%, 5%, 2% y 0% de SFB por 24 h. Como se observa en la Figura 3, cuando la privación es completa (0% de SFB) la expresión de LC3-II aumentó ($1,78 \pm 0,37$ veces, $p < 0,05$). Sin embargo, no se observaron aumentos de los niveles de LC3-II al cultivar las células con 2%, 5% y 10% SFB. Por lo tanto, los experimentos que se realizaron en esta Tesis fueron con medio de cultivo conteniendo SFB al 2%.

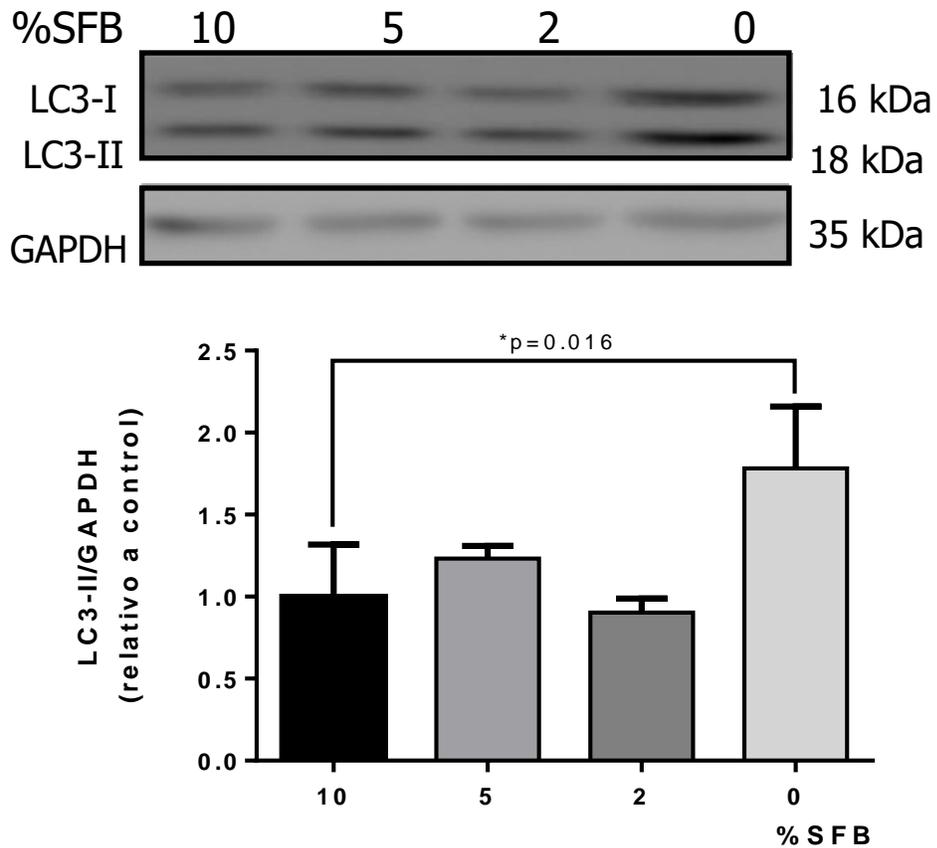


Figura 3. Efecto de distintas concentraciones de suero sobre la autofagia. Las células se mantuvieron en cultivo con las concentraciones de suero fetal bovino indicadas durante 24 h y se obtuvieron los extractos proteicos totales para estudiar la autofagia mediante la expresión de LC3I-II por Western blot. A la izquierda los geles representativos y a la derecha el gráfico de cuantificación. Los resultados son el promedio \pm EEM de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico: Anova de una vía con post test Holm Sidak.

10.1.2. Efecto del TNF- α sobre la autofagia en la línea celular A7r5

El primer objetivo específico de este trabajo fue evaluar si el TNF- α induce autofagia en las células A7r5. Para ello se hizo un estudio de dosis-respuesta y una cinética. En la cinética las células A7r5 se estimularon durante

0, 3, 16 y 24 h con una concentración de TNF- α de 100 ng/mL. Los niveles proteicos de Beclin1, LC3-II y p62 se determinaron mediante Western blot. Se observó que en el estímulo de las 24 h los niveles proteicos de Beclin1 y LC3-II aumentaron ($1,55 \pm 0,24$ veces, $p < 0,05$ y $1,81 \pm 0,24$ veces, $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 4B). Posteriormente se realizó un estudio dosis-respuesta de 0, 1, 10 y 100 ng/mL de TNF- α y se evaluaron los niveles proteicos de los mismos marcadores. En la condición de 100 ng/mL se observó un aumento en Beclin1 y LC3-II ($1,38 \pm 0,3$ veces, $p < 0,05$ y $2,45 \pm 0,45$ veces, $p < 0,05$, respectivamente), y una disminución de p62 ($0,86 \pm 0,02$ veces, $p < 0,05$), no así a concentraciones menores (Figura 4A). Estos resultados sugieren que TNF- α induciría autofagia en las células A7r5.

Sin embargo, para estudiar la autofagia no es suficiente evaluar los niveles proteicos de los marcadores ya mencionados, sino que además es necesario evaluar el flujo autofágico. Esto permite discriminar si el aumento de las vesículas autofágicas se debe a un aumento en la síntesis de las mismas o bien es debido a un defecto en su degradación [105]. Para ello, las células se trataron con cloroquina, un inhibidor de la fusión de los lisosomas con los autofagosomas, durante las últimas 4 h del estímulo con TNF- α . Posteriormente, se determinó los niveles proteicos de LC3-II y p62.

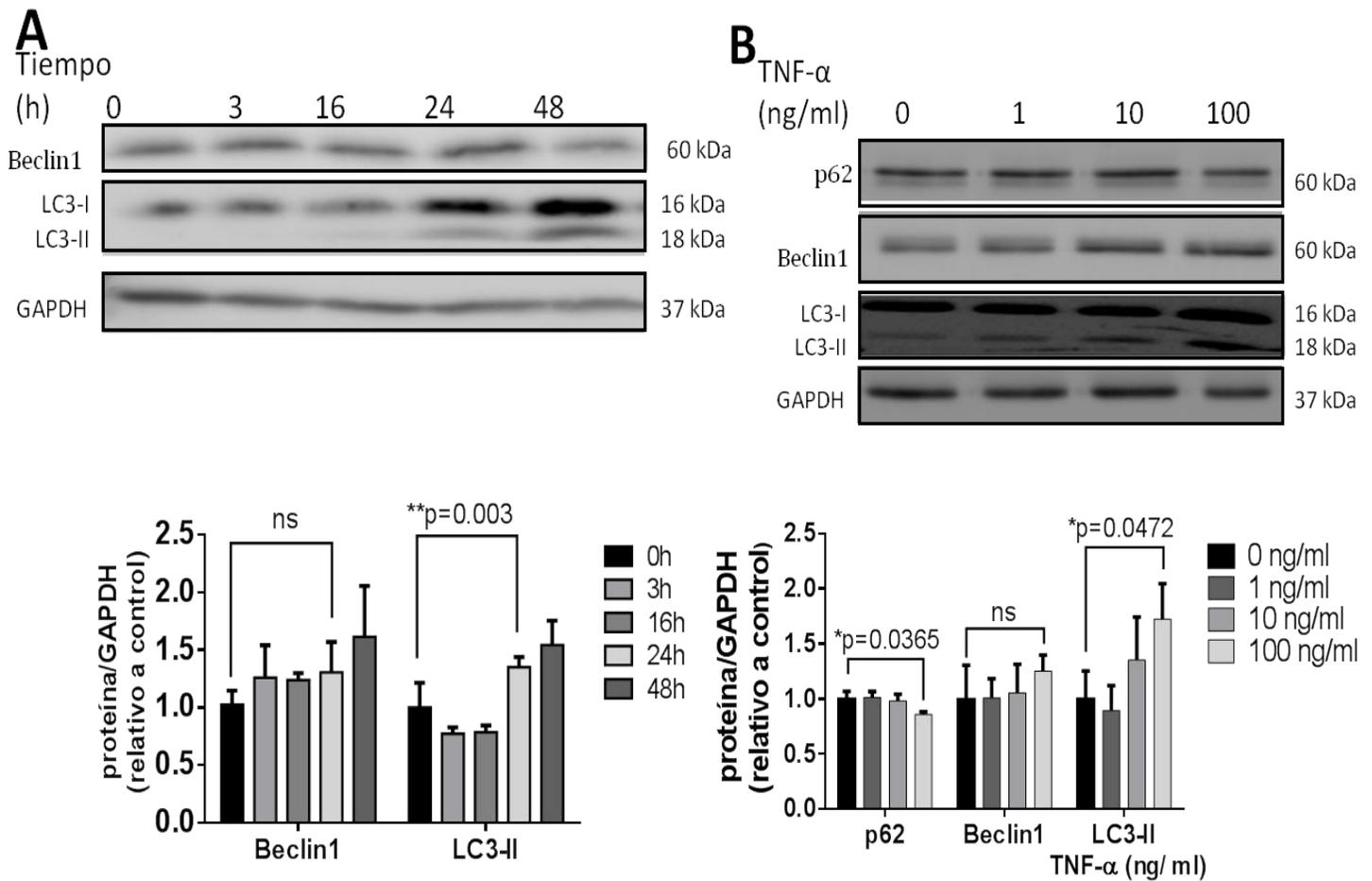


Figura 4. Efecto de TNF- α sobre los marcadores de autofagia en las células A7r5.
(A) Cinética. Las células se estimularon con 100 ng/mL de TNF- α durante diferentes tiempos (0, 3, 16, 24 y 48 h). **(B) Dosis respuesta.** Las células se estimularon con diferentes concentraciones de TNF- α (0, 1, 10 y 100 ng/mL) durante 24 h. Los resultados son el promedio \pm EEM de 4 experimentos independientes. Análisis estadístico: Anova de una vía con post test Dunnett.

La acumulación de LC3-II se observó en la condición con cloroquina con respecto al TNF- α solo, indicando que ésta inhibió la degradación de LC3-II por autofagia. Además, el p62 también recuperó los niveles basales en estas condiciones. Por lo tanto, estos resultados sugieren que el TNF- α induce el flujo autofágico (Figura 5A).

Esto también se estudió mediante la transducción de las células con un adenovirus que contiene LC3 unido a la proteína fluorescente verde (GFP). Como el LC3-II es parte de las vesículas autofágicas, la visualización de LC3-GFP por microscopía confocal, permite evidenciar las vesículas autofágicas. El tratamiento de las células A7r5 con TNF- α indujo un aumento en el número de vesículas autofágicas, visualizadas como puntos de fluorescencia verde. Además, al tratarlas también con cloroquina se indujo un aumento aún mayor de las vesículas LC3-GFP positivas, siendo además estas vesículas de mayor tamaño. Estos resultados confirman la activación del flujo autofágico por TNF- α en las células A7r5 (Figura 5B).

En conjunto, todos estos resultados indican que TNF- α induce autofagia en las células A7r5. La máxima activación ocurriría a las 24 h con una dosis de TNF- α de 100 ng/mL.

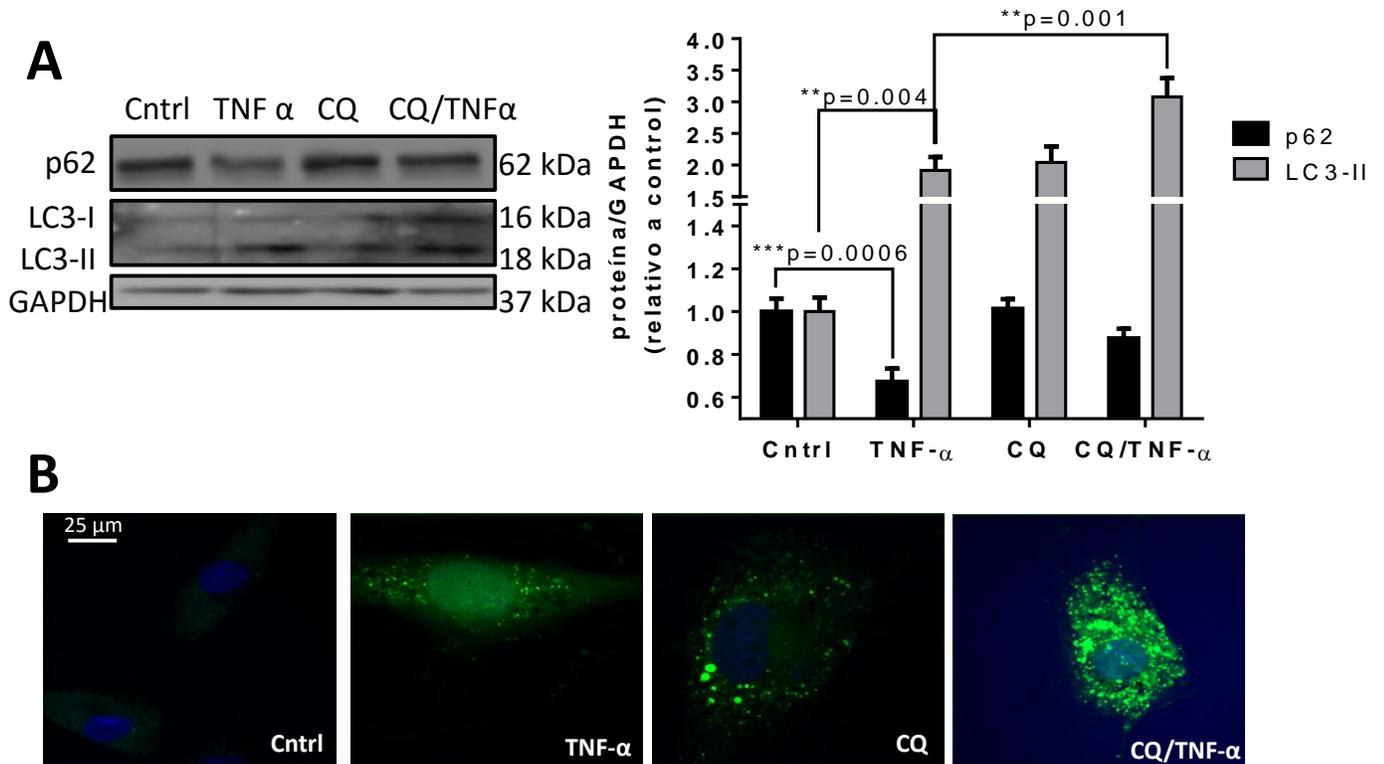


Figura 5. Efecto de TNF- α sobre el flujo autofágico en las células A7r5.

Las células se estimularon con 100 ng/mL de TNF- α con y sin cloroquina 30 mM durante las últimas 4 h de estímulo. **(A)** Se obtuvieron los extractos proteicos y se evaluaron por Western blot los marcadores de autofagia p62 y LC3I-II. **(B)** Las células se transdujeron con un adenovirus que contiene LC3 fusionado con GFP usando un multiplicidad de infección (MOI) de 150, se incubaron por 24 h, y posteriormente se estimularon con TNF- α (100 ng/mL) con y sin cloroquina 30 mM durante 24 h. Las células se observaron en microscopio confocal. Las vesículas autofágicas se evidencian por la acumulación de LC3-GFP en un patrón punteado que corresponde a las vesículas autofágicas. Los resultados son el promedio \pm EEM de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico: Anova de una vía con post test Dunnett.

10.1.3. Papel de la vía NF- κ B sobre la activación de la autofagia por TNF- α

Es bien sabido que en la activación de la vía NF- κ B es requerida para la inducción de autofagia por múltiples estímulos. Por ejemplo, en fibroblastos embrionicos de ratones la privación de nutrientes y la inhibición de mTOR con

rapamicina conlleva la activación de IKK, lo que produce la degradación de I κ B α y la translocación al núcleo de NF- κ B o p65 [104]. En este trabajo quisimos evaluar si la autofagia inducida por TNF- α , un activador característico de la vía NF- κ B, requiere también este factor transcripcional. Para ello preincubamos las células durante 30 minutos con BAY-117082, un inhibidor irreversible de la IKK α y de la fosforilación de la I κ B α . Posteriormente tratamos las células con 100 ng/mL de TNF- α y evaluamos mediante Western blot los niveles de LC3-II como marcador de autofagia. Como se observa en la Figura 6, cuando inhibimos la vía NF- κ B tratando las células con dos concentraciones diferentes de BAY-117082 (1 y 10 μ M) el aumento de los niveles de LC3-II inducida por TNF- α se inhibe. Este resultado sugiere que la autofagia producida por esta citoquina sería dependiente de la vía NF- κ B.

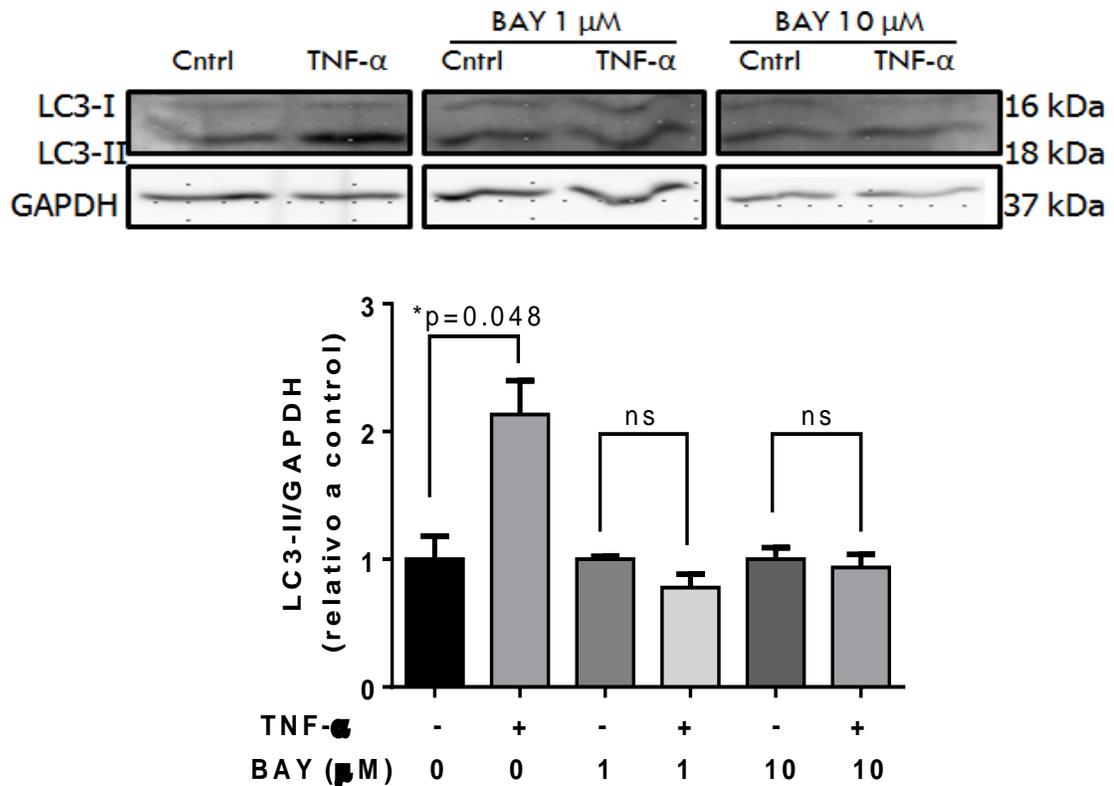


Figura 6. Relevancia de la vía NF-κB en la activación de la autofagia mediada por TNF-α.

Las células se pretrataron con dos concentraciones diferentes de BAY-117082, 1 y 10 μM durante 30 min y después se estimularon con 100 ng/mL de TNF-α durante 24 h. Los niveles de la proteína LC3-II se evaluó mediante Western blot. Los resultados son el promedio ± EEM de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico: t-student pareado, comparando cada condición con su control.

10.2. EFECTO DEL TNF-α SOBRE EL FENOTIPO SINTÉTICO EN LA LÍNEA

A7r5

10.2.1. Efecto del TNF-α sobre la desdiferenciación celular en la línea A7r5

Las VSMC pueden presentar dos fenotipos, el contráctil y el proliferativo. El fenotipo contráctil se caracteriza por su elevado nivel de proteínas contráctiles como la α-SMA, calponina y SM22. Estas células tienen como

función principal ser eminentemente contráctiles para controlar el diámetro y el tono vascular. En cambio, el fenotipo proliferativo corresponde a células poco diferenciadas con una menor expresión de proteínas contráctiles y con gran capacidad de sintetizar matriz extracelular [106]. Como proteína de la matriz extracelular nosotros evaluamos los niveles proteicos de colágeno tipo I y osteopontina. Ambas proteínas se expresan principalmente en las células mesenquimales progenitoras de las VSMC y se expresa en mayor cantidad en las células poco diferenciadas, siendo prácticamente nulo en las VSMC diferenciadas y maduras [107].

Para evaluar el efecto del TNF- α sobre las proteínas de matriz extracelular se evaluaron los niveles proteicos de colágeno tipo I y osteopontina mediante Western blot, tras diferentes tiempos de estímulo con 100 ng/mL de TNF- α . Como se observa en la Figura 7A, los niveles de las dos proteínas aumentaron a las 48 h de estímulo ($1,43 \pm 0,11$ veces, $p < 0,01$ y $1,35 \pm 0,11$ veces, $p < 0,05$, respectivamente).

En cuanto a la maquinaria de contracción se realizó una cinética para evaluar los niveles proteicos de α -SMA, calponina y SM22 mediante Western blot. Como se observa en la Figura 7B, los niveles de las tres proteínas de contracción disminuyeron a las 48 h de estímulo con TNF- α ($0,73 \pm 0,09$ veces, $p < 0,05$; $0,78 \pm 0,11$ veces, $p < 0,05$ y $0,78 \pm 0,02$ veces, $p < 0,05$, respectivamente). Esta disminución fue menor que la que ocurre con el PDGF, el cual a las 48h

disminuye aproximadamente a la mitad la expresión de α -SMA, calponina y SM-22 (0,37 \pm 0,08 veces, $p < 0,001$; 0,46 \pm 0,26 veces, $p < 0,0013$; y 0,71 \pm 0,15 veces, $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 7C).

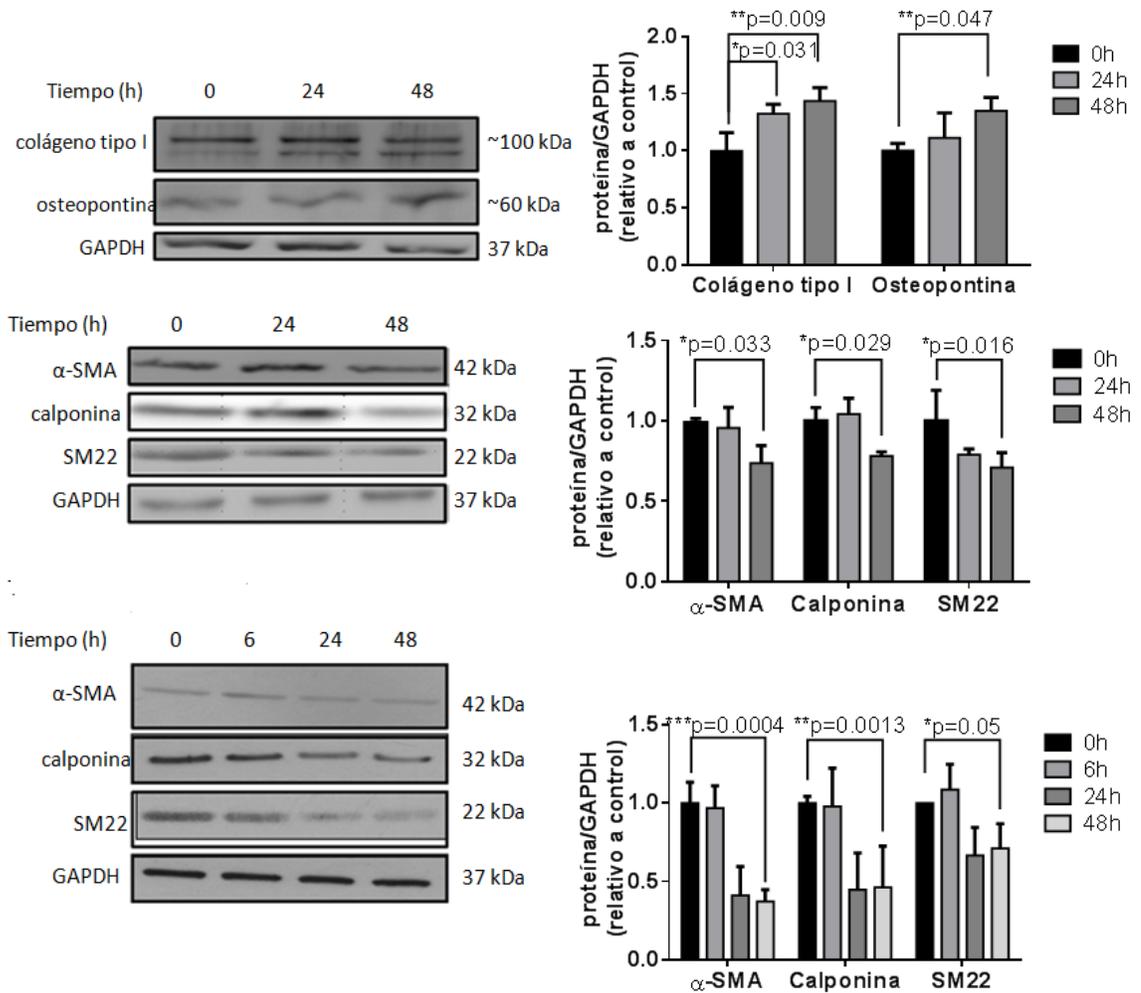


Figura 7. Efecto TNF- α sobre el fenotipo contráctil.

(A) Las células se estimularon con TNF- α (100 ng/mL) durante 24 y 48 h. Se obtuvieron extractos proteicos totales y se midió los niveles de colágeno tipo I y osteopontina mediante Western blot. Las células se estimularon con (B) 100 ng/mL de TNF- α durante 24 y 48h o (C) 1 ng/mL de PDGF durante 6, 24 y 48h, se obtuvieron los extractos proteicos totales y se midieron los niveles de α -SMA, calponina y SM22, Los resultados son el promedio \pm EEM de 3 experimentos independientes Análisis estadístico: Anova de una vía con post test Dunnett.

Por lo tanto, la Figura 7 demuestra que TNF- α induce una disminución del contenido de proteínas contráctiles y un aumento de las de matriz extracelular. Estos resultados nos permiten concluir que el TNF- α induce la desdiferenciación de las células A7r5.

10.2.2. Efecto del TNF- α sobre el fenotipo migratorio en la línea celular A7r5

Otra característica importante del fenotipo sintético es su mayor capacidad de migración. Debido a que éste fenotipo es el predominante cuando hay daño tisular, es necesario que las células migren para que el vaso sanguíneo se regenere [21,36]. Sin embargo, en procesos patológicos, esta migración también es necesaria para que las células contribuyan a la formación de la placa de ateroma en la capa íntima del vaso sanguíneo. Para evaluar el efecto del TNF- α sobre la migración de las VSMC utilizamos un modelo clásico de cierre de herida. Este ensayo, además de permitir analizar la capacidad migratoria de las células, constituye un modelo *in vitro* que simula el proceso de cicatrización que tiene lugar *in vivo* en respuesta a un daño tisular [108]. Para llevar a cabo este experimento se utilizó un cultivo celular cercano a una confluencia máxima y se realizó una raya o herida con una punta de pipeta estéril. A las 24 h de realizar esta herida se monitoreó la migración observando su cierre al microscopio tanto en presencia como en ausencia de TNF- α

(100 ng/mL). Para evitar que el cierre de la herida se deba a proliferación en vez de migración, todos estos experimentos se realizaron en presencia de bromodesoxiuridina.

Para comprobar que la dosis de 100 ng/mL, inductora de autofagia, también induce el fenotipo migratorio, hicimos un estudio de dosis-respuesta para el ensayo de herida. Como se observa en la Figura 8 la concentración que aumentó la migración con respecto al control a las 24 h de estímulo fue la de 100 ng/mL, cerrando la herida aproximadamente un 20% más que la condición control ($0,73 \pm 0,05$ veces, $p < 0,05$). El tamaño de la herida en la condición control fue de aproximadamente 800 μm .

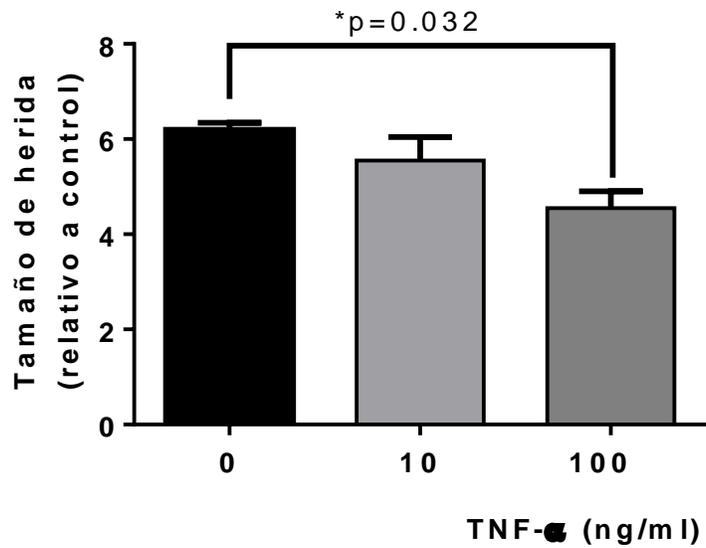
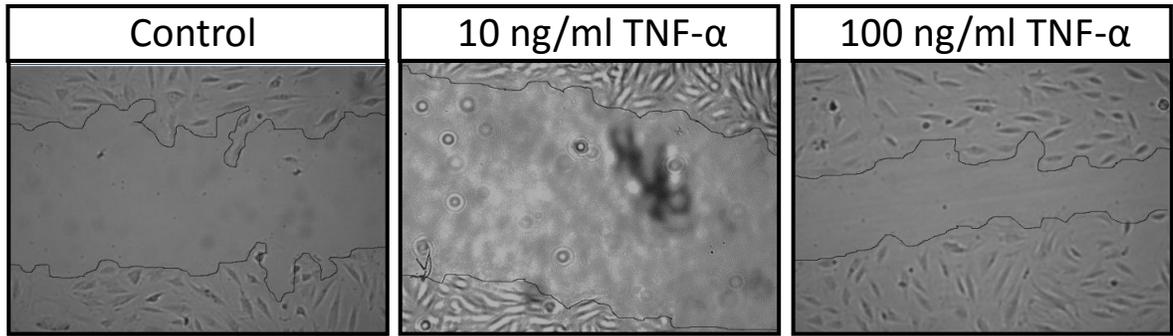


Figura 8. Efecto de TNF- α en la migración celular determinado por el ensayo de cierre de herida.

Las células A7r5 se cultivaron hasta una confluencia cercana al 100%, momento en el que se le realizó una herida con una punta de pipeta. Inmediatamente después, las células se estimularon con TNF- α y bromodesoxiuridina para evitar la proliferación celular. Tras 24 h de estímulo, el cierre de la herida se evaluó midiendo el ancho de la herida mediante el uso de un microscopio. El tamaño de la herida en la condición control es de $\sim 800 \mu\text{m}$. Los resultados son el promedio \pm EEM de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico: Anova de una vía con post test Dunnett.

Otro método para evaluar la migración celular es mediante el ensayo de transwell. En este ensayo se requiere una cámara Boyden que posibilita colocar las células sobre una membrana semipermeable de poliéster separando en dos compartimentos el pocillo. En el compartimento superior se ubican las células que migrarán al compartimento inferior atravesando los poros de la membrana quedándose adheridas al lado inferior de la misma (Figura 9) [109]. Una vez finalizado el estímulo se cuantificaron las células adheridas al lado inferior de la membrana y se compararon con las migradas en la condición control.

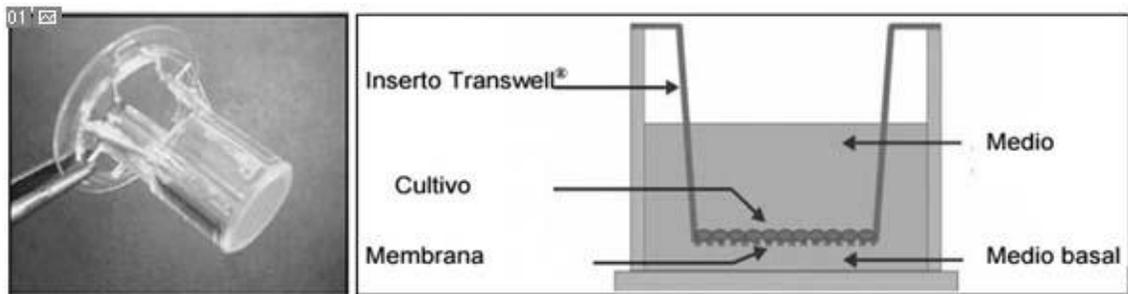


Figura 9. Cámara Boyden y esquema de ensayo Transwell.

Debido a que esta técnica no estaba implementada en el Laboratorio, tuvimos que estandarizar el método. En algunos trabajos publicados mencionan que añaden quimioatrayentes en el medio de cultivo de la cámara inferior para facilitar la migración celular [110]. Así, lo primero que hicimos fue evaluar si era necesaria la presencia de algún quimioatrayente. La migración celular se evaluó tras cultivar 50.000 células con diferentes concentraciones de SFB en la cámara superior e inferior durante 2 h. Como se puede observar en la Figura 10A, en la

condición de SFB 10% en la cámara inferior el número de células que migró fue demasiado elevado haciéndose imposible la cuantificación. Las otras dos condiciones (2% y 5% SFB) tuvieron comportamientos similares. Sin embargo, debido a que en todos los experimentos de este trabajo hemos trabajado con condiciones de suero al 2%, decidimos seleccionar esta concentración para nuestros ensayos Transwell.

A continuación hicimos una cinética para evaluar el tiempo apropiado para ver cambios significativos en la migración de células estimuladas con TNF- α (100 ng/mL), frente a una condición control. Además, hicimos un control positivo de migración estimulando las células con PDGF-BB [111]. A tiempos cortos (2 h) no se observó diferencia significativa en la migración de las células estimuladas con respecto a las de la condición control. A tiempos largos (>4 h), a pesar de verse una mayor diferencia, era tanta la migración basal que no se pudo evaluar si esta diferencia era significativa (Figura 10B).

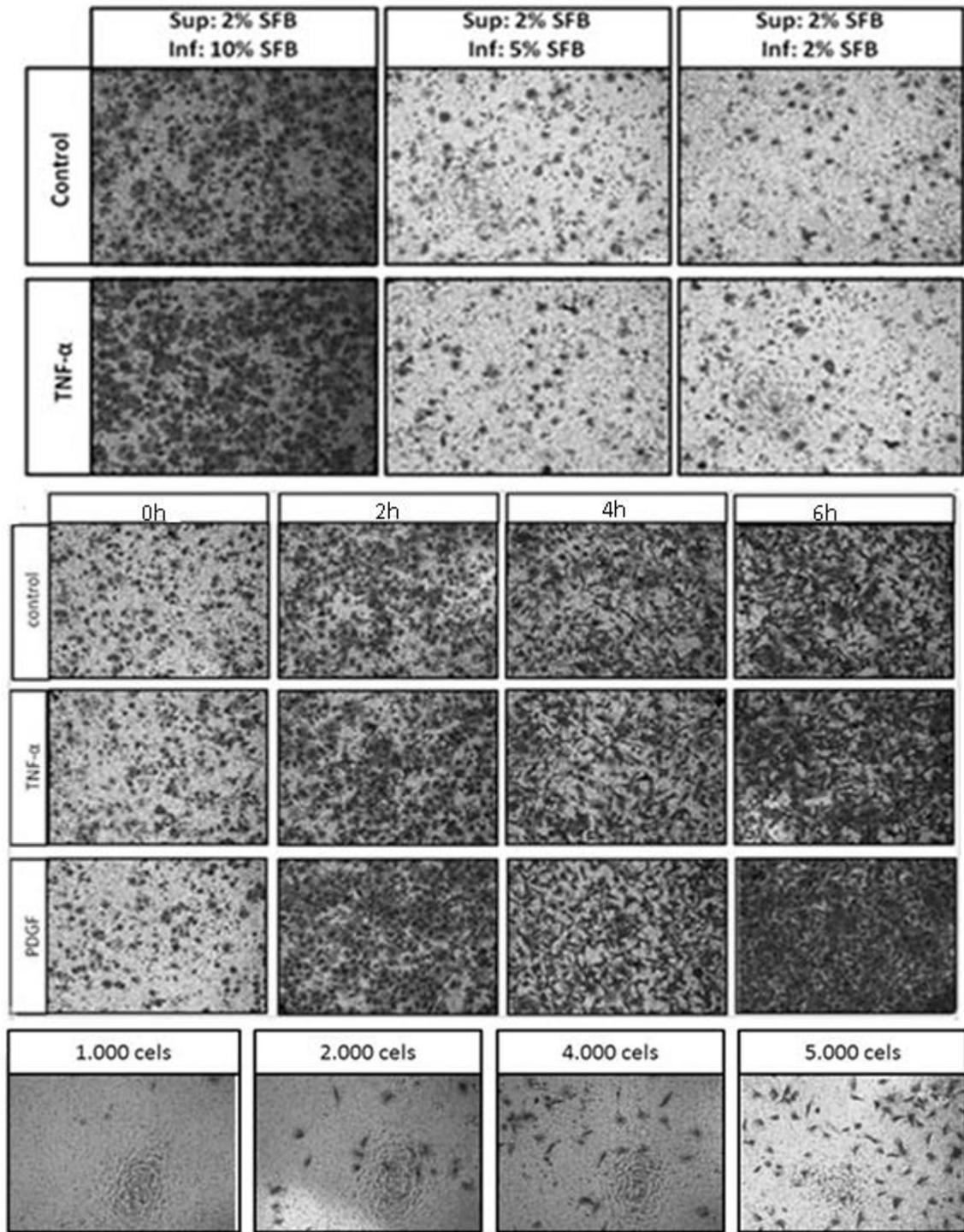
Para poder observar mejor una diferencia de migración con respecto al estímulo, se disminuyó la cantidad de células cultivadas. Esto permitió aumentar el tiempo de ensayo de la migración a 24h. En estas condiciones se logró observar que TNF- α inducía un aumento de la migración de las células (Figura 10C). Para futuros experimentos, se utilizaron estas condiciones experimentales.

Por lo tanto, las condiciones de estudio de migración mediante ensayo Transwell para el resto del trabajo de Tesis fueron el cultivo de 5000 células en la cámara Boyden colocando medio de cultivo suplementado con 2% de SFB en el compartimento superior e inferior y el tiempo de estímulo con TNF- α fue de 24 h. Con estas condiciones, como se observa en la Figura 11A, TNF- α indujo un aumento de la migración de las células A7r5 respecto al control ($1,25 \pm 0,09$ veces, $p=0,05$). El número promedio de células migradas en la condición control fue de aproximadamente 850.

----- (página siguiente)

Figura 10. Estandarización del ensayo Transwell

(superior) Estudio de la necesidad de la presencia de quimioatrayente. Se cultivaron 50.000 células en una cámara Boyden colocando medio de cultivo suplementado con diferentes concentraciones de SFB en el compartimento superior e inferior de la cámara. Las células se estimularon TNF- α (100 ng/mL) durante 2 h. **(medio) Cinética.** Se cultivaron 50.000 células colocando medio de cultivo suplementado con SFB 2% en el compartimento superior e inferior de la cámara. Las células se estimularon con 100 ng/mL de TNF- α o 10 ng/mL de PDGF-BB durante diferentes tiempos. **(inferior) Estudio del número de células en el sembrado.** Se cultivaron diferentes cantidades de células en la cámara Boyden y se observó la migración a las 24 h. Al terminar el estímulo las células del lado inferior de la membrana se fijaron y se tiñeron con solución de cristal de violeta y se fotografiaron usando un microscopio de contraste de fase en un aumento 10x. N=1.



Además, como control positivo, también se realizó este ensayo con PDGF-BB, un potente inductor de la migración en las VSMCs. PDGF-BB indujo la migración de $2,42 \pm 0,28$ veces más células que el control ($p < 0,01$) (Figura 11B).

Los resultados con los ensayos de cierre de herida y de transwell sugieren que TNF- α induce migración de las células A7r5.

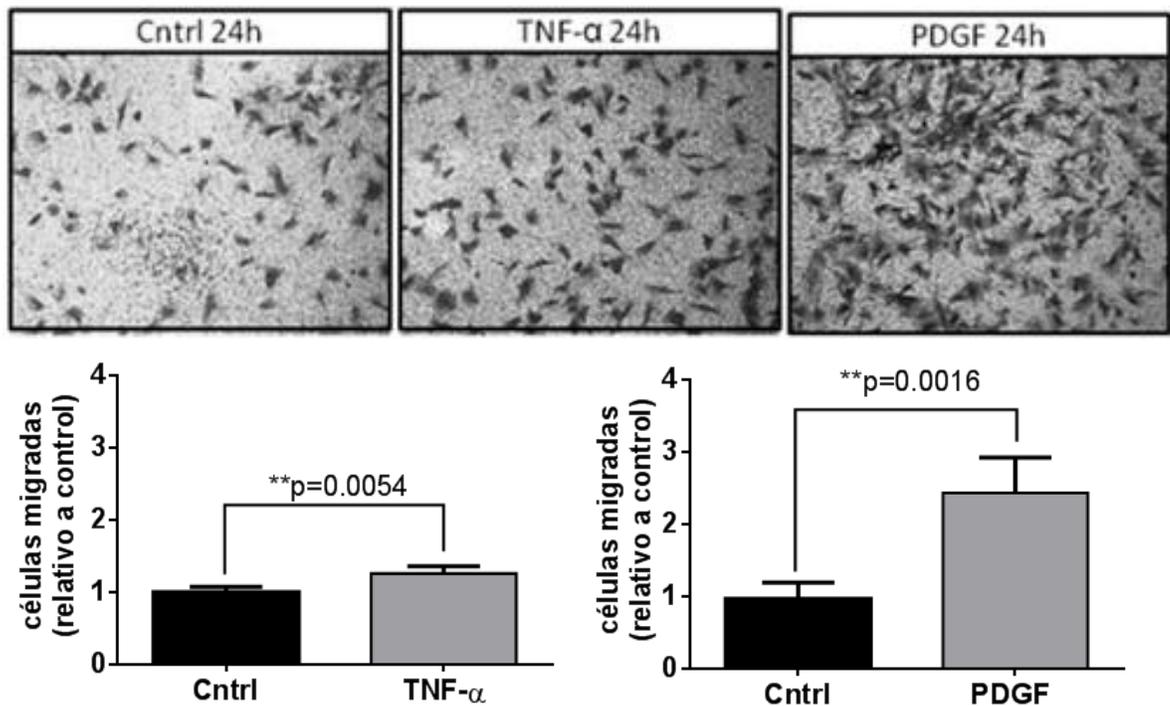


Figura 11. Efecto de TNF- α en la migración de las células A7r5 evaluado por Transwell.

Se cultivaron 5.000 células A7r5 en una cámara Boyden colocando medio de cultivo suplementado con SFB 2% en el compartimento superior e inferior de la cámara. (A). Se añadió 100 ng/mL de TNF- α , (B) Se añadió 10 ng/mL de PDGF. Tras 24 h, las células del lado inferior de la membrana se fijaron y se tiñeron con solución de cristal de violeta. Posteriormente, las células se fotografiaron usando un microscopio de contraste de fase con un aumento de 10x y se cuantificaron. En la condición control migraron a la cámara inferior aproximadamente 850 células. Los resultados son el promedio \pm EEM de 3 y 4 experimentos independientes, respectivamente. Análisis estadístico: t-student pareado.

Pero para que las células puedan migrar han de degradar la matriz extracelular existente en su entorno. Por lo tanto, evaluamos la secreción de la metaloproteasa-9 mediante zimografía. Al realizar una cinética para evaluar la secreción de MMP-9 al medio de cultivo en el tiempo, observamos que a partir de las 16 h comenzó a haber una mayor presencia de MMP-9 en las muestras, llegando a un máximo a las 24 h (15,96 veces $\pm 0,86$, $p < 0,01$) (Figura 12).

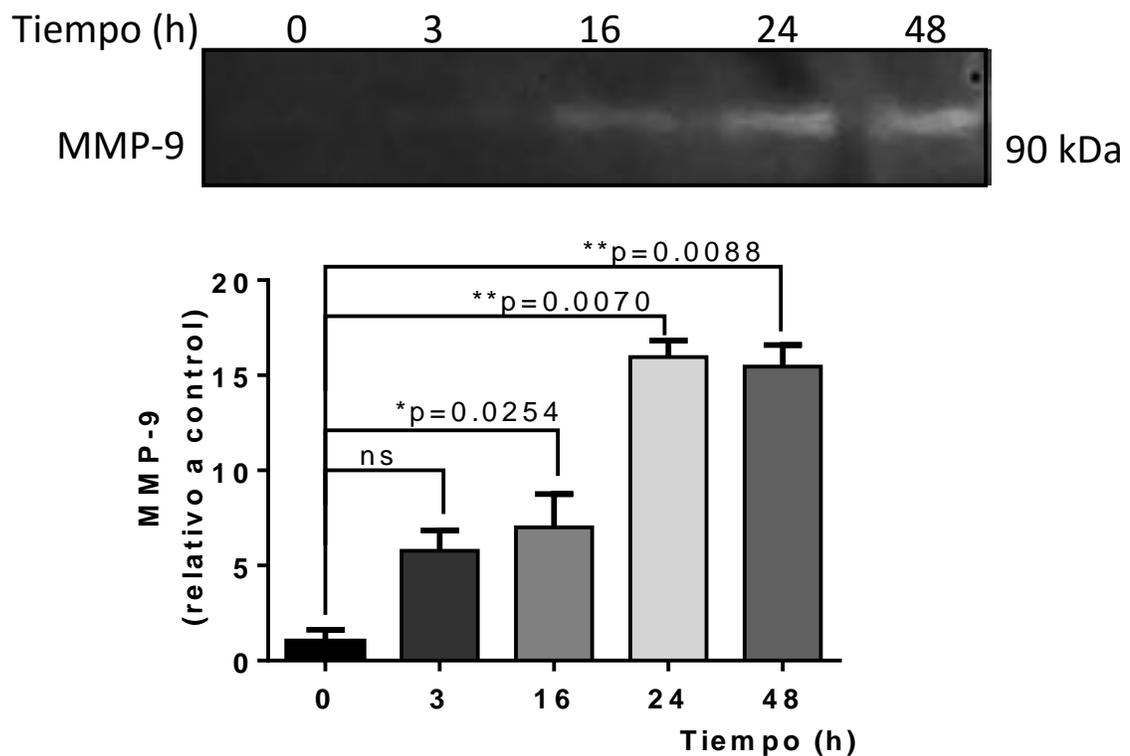


Figura 12. Efecto de TNF- α sobre la secreción de la metaloproteasa MMP-9.

Las células se trataron durante diferentes tiempos con 100 ng/mL de TNF- α y los sobrenadantes se resolvieron por electroforesis en geles de acrilamida con gelatina. Las proteínas se renaturalizaron y el gel se incubó para evaluar la actividad enzimática. El gel fue teñido con azul de Coomassie para observar las bandas claras correspondientes a las zonas con actividad catalítica de las MMPs. Los resultados son el promedio \pm EEM de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico: Anova de una vía con post test de Dunnett.

10.2.3. Efecto del TNF- α sobre el fenotipo proliferativo en la línea celular A7r5

Como ya se mencionó anteriormente el fenotipo sintético de las VSMCs presenta una mayor proliferación celular. Este fenotipo, inducido cuando hay daño tisular, requiere una mayor tasa proliferativa para la regeneración del tejido [36].

La tasa de duplicación de las células A7r5 es aproximadamente de 32 h, así que evaluamos si este tiempo disminuía con el estímulo de TNF- α . Para ello hicimos ensayos de proliferación con tiempo de estímulo de 24 h. Al hacer el ensayo MTT, un indicador actividad mitocondrial que nos podría indicar la presencia de mayor cantidad de células en el caso de que las células mantuvieran la misma actividad mitocondrial en la condición control y estimulada, se observó que la absorbancia a 560 nm de la condición tratada con TNF- α era significativamente mayor que las células control ($1,28 \pm 0,03$ veces, $p < 0,01$) (Figura 13A). Por otro lado, en el estudio de incorporación de [3 H]-Timidina, que evalúa la cantidad de células en proliferación, se vio un aumento aún más claro ($2,33$ veces $\pm 0,24$, $p < 0,05$) (Figura 13B). Además, en ambos casos se comparó con los resultados obtenidos con PDGF-BB, un potente inductor del fenotipo sintético en las VSMCs. Estos resultados sugieren que TNF- α induce proliferación en la línea celular A7r5.

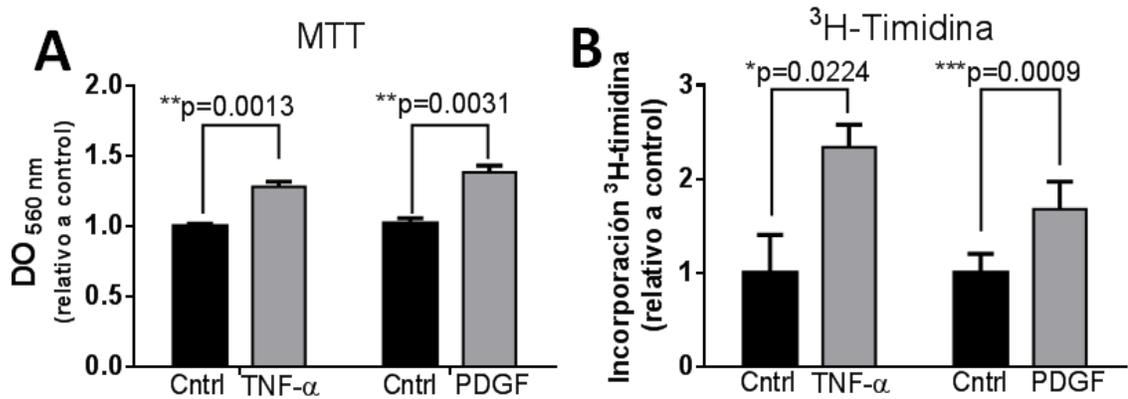


Figura 13. Efecto de TNF- α sobre proliferación de las células A7r5.

Se cultivaron 2.000 células A7r5 en medio suplementado con SFB 5% durante 24 h. Luego se trataron con TNF- α (100 ng/mL) durante 24 h. **(A)** Para evaluar la proliferación celular se añadió 2 mg/mL de MTT durante 4 h y tras eliminar el medio se lisaron las células con DMSO para disolver los cristales morados de formazán. En los sobrenadantes se determinó la absorbancia a 560 nm. **(B)** Para evaluar la proliferación celular se añadió 1 μ Ci/mL de [³H]-timidina 4 h antes del final del estímulo. Al terminar el estímulo las células se lavaron con NaOH 0,1 M y se dejaron reposar hasta que se lisaron completamente. Posteriormente, los lisados se mezclaron con 300 μ L de solución de centelleo y se midieron en un contador de centelleo. Los resultados son el promedio \pm EEM de 4 experimentos independientes. Análisis estadístico: t-student pareado.

10.3. EFECTO DEL TNF- α SOBRE LA SECRECIÓN DE CITOQUINAS

Es poco lo que se sabe sobre la expresión y secreción de citoquina en las VSMCs. Uno de los objetivos de este trabajo es evaluar si estas células presentan un fenotipo inflamatorio cuando son estimuladas con TNF- α , y si este fenotipo depende de la autofagia para su expresión. Cuando seleccionamos las citoquinas a evaluar quisimos trabajar con citoquinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Entre las citoquinas proinflamatorias seleccionamos aquellas con relevancia en el proceso ateroscleróticos pero que no se hubiera descrito su expresión en estas células, como la IL-1 β , o que sabiéndose que se

expresan en estas células no se conoce la relevancia de la autofagia en su proceso de secreción, como la IL-6.

Lo primero que hicimos fue estandarizar el protocolo de ELISA. En primer lugar realizamos un único experimento dosis-respuesta (10 y 100 ng/mL) y una cinética (24 y 48 h) con el estímulo de TNF- α para comprobar que como indica la literatura las condiciones usadas hasta el momento inducían la secreción de IL-6. Cuando comprobamos que 100 ng/mL de TNF- α , la dosis usada en todo el trabajo, inducía la secreción de esta citoquina hicimos un estudio de cinética con esta dosis y se observó que a las 24 h del estímulo con TNF- α había un aumento en la secreción de IL-6 (258 veces \pm 53, $p < 0,01$) (Figura 14C).

Una vez conocidas la dosis y tiempo de estímulo, evaluamos las condiciones para activar el inflamasoma y la consecuente secreción de IL-1 β . La forma clásica de activar el inflamasoma, como mencionamos en la introducción, es coestimular con LPS y ATP que permiten la activación de la procaspasa 1 que es la encargada de cortar la pro-IL-1 β . Pero el LPS es una molécula derivada de bacterias que muy raramente está en contacto con las VSMCs en condiciones fisiológicas. Por lo tanto, decidimos además estimular nuestras células con 100 ng/mL de TNF- α durante 24 h y con ATP 5 mM 30 minutos antes del fin del estímulo.

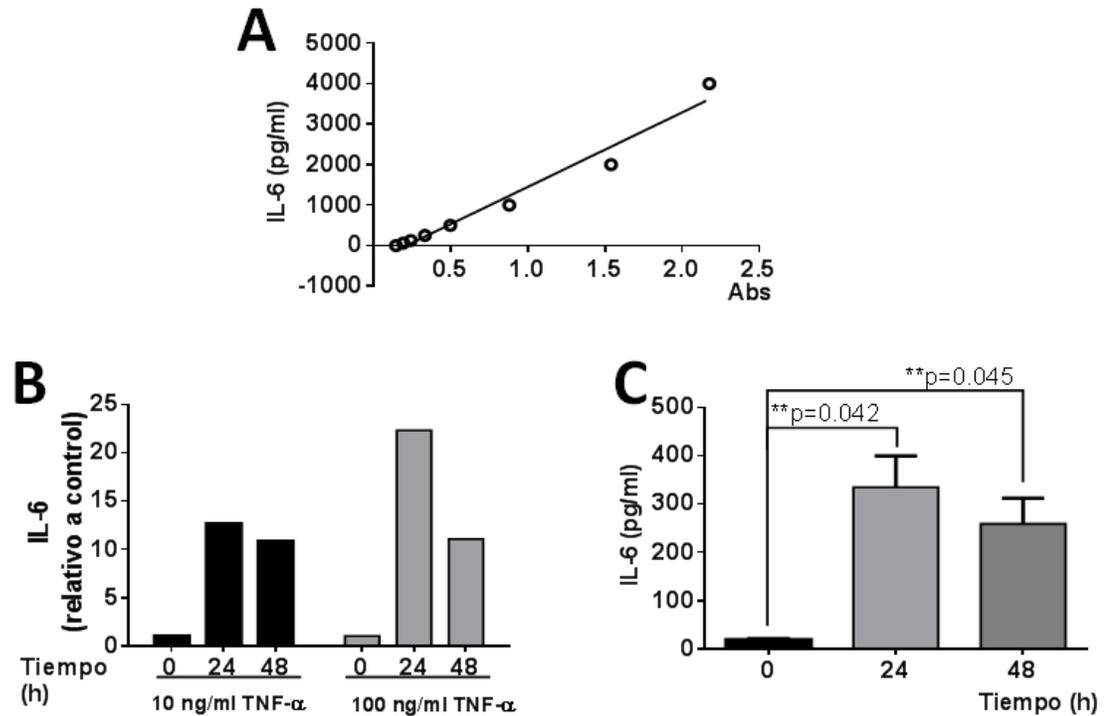


Figura 14. Efecto del TNF- α sobre la secreción de IL-6 en las células A7r5.

(A) Recta de calibración del ensayo de ELISA para IL-6. **(B)** Estudio dosis-respuesta y cinética para evaluar la secreción de IL-6 por el estímulo con TNF- α (10 y 100 ng/mL) durante 24 y 48h. Experimento único. **(C)** Cinética de la secreción de IL-6 por el estímulo de 100 ng/mL de TNF- α . Los resultados son el promedio \pm EEM de 4 experimentos independientes. Análisis estadístico: Anova de una vía con post-test Dunnett.

Como se observa en la Figura 15 las VSMCs no tienen niveles basales detectables de IL-1 β . Además, y cuando se activó el inflammasoma con LPS y ATP tampoco hubo niveles detectables de esta proteína. El TNF- α tampoco tuvo ningún efecto en la inducción de los niveles basales de esta citoquina proinflamatoria. Por lo tanto, podemos concluir estas VSMCs no expresan IL-1 β , ni en su estado basal, ni en un ambiente inflamatorio.

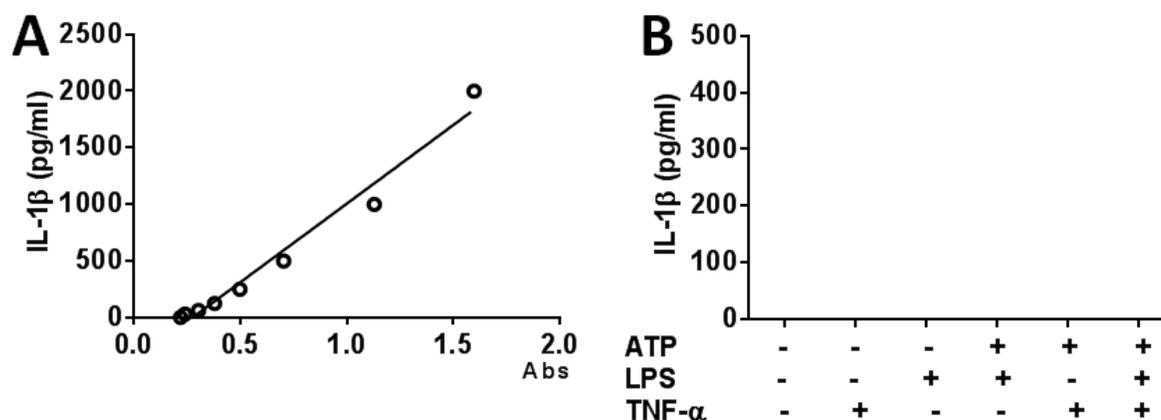


Figura 15. Efecto del TNF- α sobre la secreción de IL-1 β en las células A7r5.

(A) Recta de calibración del ensayo de ELISA para IL-6. **(B)** Estudio de la secreción de IL-1 β por el estímulo de TNF- α activando o no el inflamasoma. Los resultados son el promedio \pm EEM de 4 experimentos independientes.

Por último, la IL-10 es una citoquina antiinflamatoria por su capacidad de inhibir la síntesis de citoquinas proinflamatorias. Debido a que en estudios de experimentación animal se ha observado que los valores bajo de IL-10 favorecen el desarrollo de lesiones ateroscleróticas más extensas y morfológicamente inestables, y que en pacientes con esta enfermedad se han encontrado polimorfismos en el gen de esta proteína [112], nosotros quisimos evaluar el efecto del TNF- α sobre esta citoquina en nuestro modelo celular.

Como se observa en la Figura 16, al igual que con la citoquina anterior, podemos observar que estas células no poseen niveles detectables de IL-10 en su estado basal. Cuando estimulamos con TNF- α tampoco se observó ningún cambio.

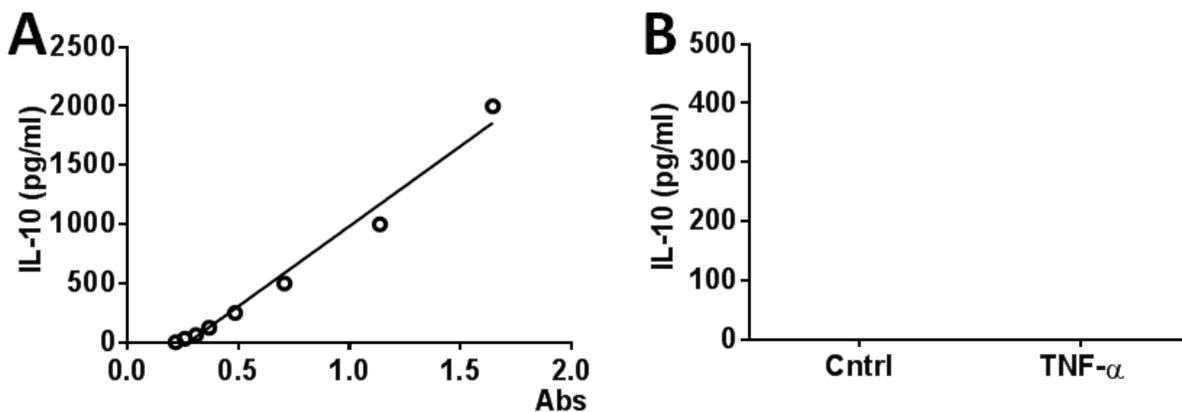


Figura 16. Efecto del TNF- α sobre la secreción de IL-10 en las células A7r5.

(A) Recta de calibración del ensayo de ELISA para IL-6. **(B)** Estudio de la secreción de IL-1 β por el estímulo de TNF- α . Los resultados son el promedio \pm EEM de 5 experimentos independientes.

Otros datos del laboratorio corroboran los resultados de las dos últimas figuras. Se hizo un estudio de la expresión de mRNA de IL-1 β e IL-10 en las células control mediante rtPCR y se observó la inexistencia de amplificación en las muestras (datos no mostrados).

Debido a que estas células responden al TNF- α induciendo, al parecer, sólo IL-6, quisimos evaluar si este aumento en la secreción de IL-6 es característico del estímulo con TNF- α o es del fenotipo sintético-desdiferenciado. Para ello evaluamos la secreción de esta citoquina en células tratadas con PDGF-BB. Al estimular las células A7r5 con PDGF-BB, se observó que igualmente se producía el aumento en la secreción de IL-6 (151 ± 26 veces, $p < 0,001$) (Figura 17). Este resultado permite sugerir que esta el aumento de la secreción de IL-6 no se debería únicamente a que el TNF- α es un estímulo

proinflamatorio *per se*, sino a que sería parte integral del fenotipo sintético de las VSMCs.

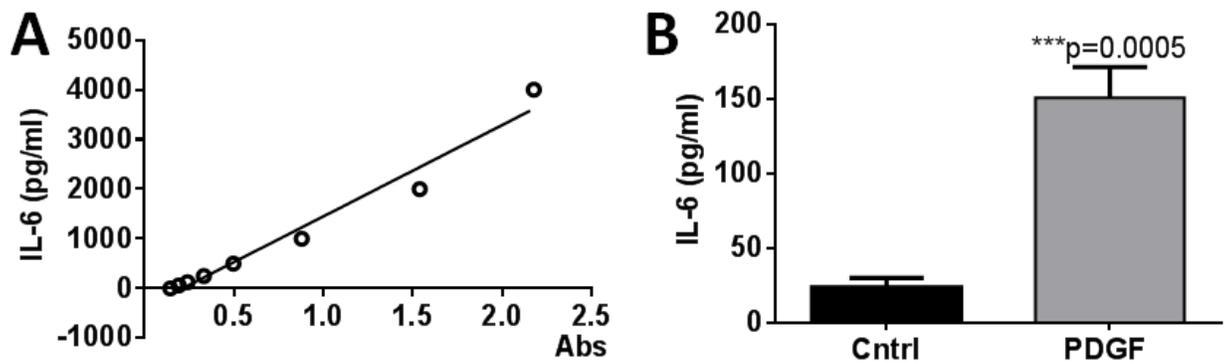


Figura 17. Efecto del PDGF sobre la secreción de citoquina IL-6.

Las células se trataron con 1 ng/mL de PDGF durante 24 h y se midió la presencia de IL-6 en el sobrenadante libre de contenido celular. **(A)** Recta de calibración. **(B)** Los resultados son el promedio \pm EEM de 4 experimentos independientes. Análisis estadístico: t-student pareado.

Por último, a pesar de que no es parte de los objetivos propuestos en este trabajo, también quisimos comprobar si el TNF- α tenía algún efecto sobre la expresión de moléculas que puedan colaborar en el ambiente inflamatorio, como pueden ser las moléculas de adhesión que permiten la captación de linfocitos en el torrente sanguíneo para dirigirlos a las zonas dañadas. Como se observa en la Figura 17, el TNF- α parece aumentar la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1, aunque este experimento no está completado porque sólo se realizó por duplicado.

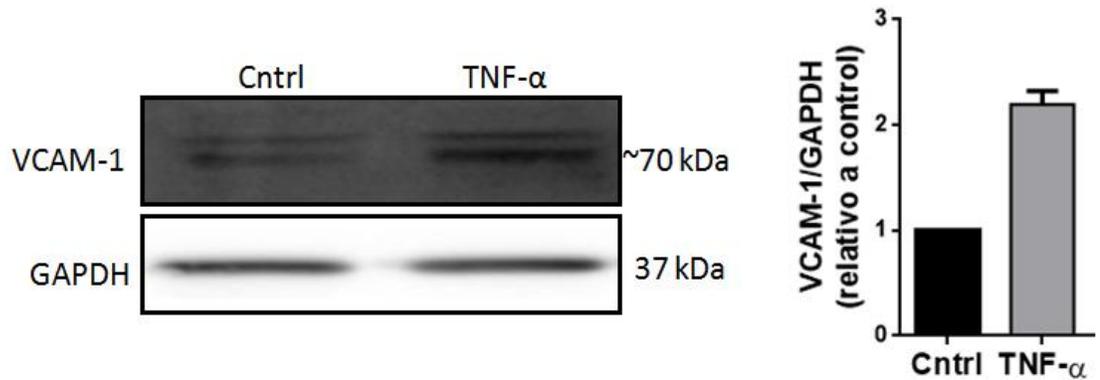


Figura 18. Efecto del TNF- α sobre la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1. Las células se trataron con TNF- α durante 24h y se evaluó mediante Western blot la expresión de VCAM-1. Los resultados son el promedio \pm EEM de 2 experimentos independientes.

Por lo tanto, hasta este punto podemos concluir que el TNF- α , a pesar de tener un potente impacto en las VSMCs en lo que a autofagia, desdiferenciación, proliferación y migración se refiere, no tiene prácticamente efecto sobre la secreción de citoquinas IL-1 β e IL-10. En estas células TNF- α induciría IL-6 y al parecer también VCAM-1. Por lo tanto, esta citoquina podría crear un ambiente proinflamatorio para la inducción de la inflamación y el desarrollo de la placa de ateroma.

10.4. PAPEL DE LA AUTOFAGIA EN EL CAMBIO DE FENOTIPO

Como se explicó en la introducción, la autofagia es un proceso que permite la degradación de proteínas y organelos celulares [113]. Debido a que el cambio de fenotipo de las VSMCs requiere un recambio proteico (degradación de proteínas contráctiles y síntesis de proteína de matriz extracelular) cabe esperar que esta modulación fenotípica sea dependiente de autofagia.

Para estudiar el papel de la autofagia en este proceso interrumpimos el proceso en dos fases clave: en el inicio con la inhibición de la formación del complejo Beclin1, y al final con la inhibición de la fusión del autofagosoma con el lisosoma. Para inhibir la primera etapa utilizamos un RNA interferente. Como se observa en la Figura 19A el uso de este siRNA Beclin1 redujo aproximadamente en un 75% los niveles proteicos de Beclin1 (0,28 veces $\pm 0,09$, $p < 0,001$).

Para inhibir la fusión del autofagosoma con el lisosoma utilizamos un inhibidor farmacológico, la cloroquina que impide la fusión del autofagosoma con el lisosoma [114]. Debido a que la cloroquina es tóxica en tiempos largos, los únicos ensayos que se pudieron realizar inhibiendo la autofagia con cloroquina fueron aquellos en los que el estímulo era de 24 h (migración, proliferación y secreción de citoquinas). Sin embargo, el silenciamiento de la proteína Beclin1, como se observa en la Figura 19B, no presenta cambios en la

morfología y viabilidad de las células. Por lo tanto con esta última forma de inhibir la autofagia la pudimos utilizar en todos los ensayos, tantos los que requieren un estímulo con TNF- α de 24 h como los de 48 h.

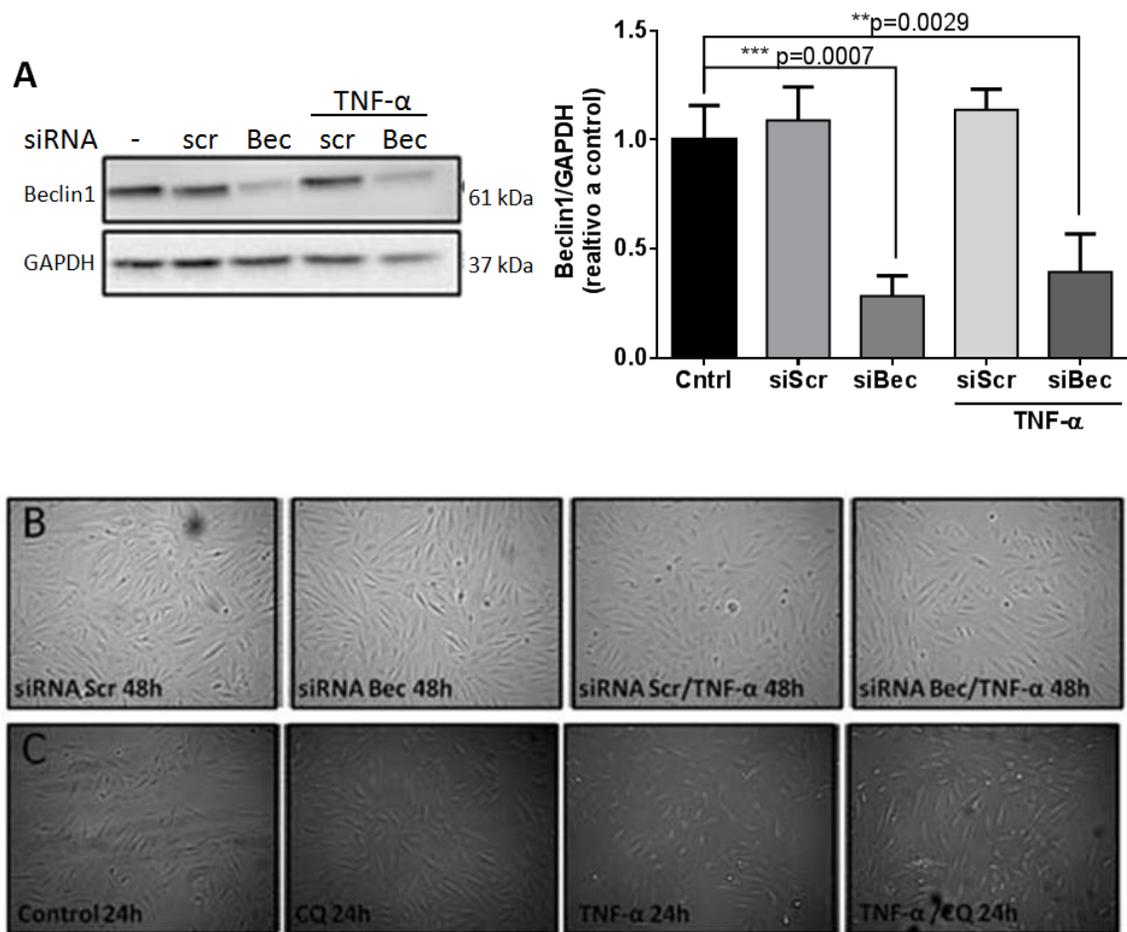


Figura 19. Silenciamiento de Beclin1 con RNA interferente.

(A). Las células A7r5 se transfectaron con 100 nM de siRNA Beclin1 durante 6 h, se privó con medio con 2% SFB durante 16 h y posteriormente se estimuló o no con 100 ng/mL de TNF- α durante 24 h. Se extrajeron los extractos proteicos y se evaluó Beclin1 mediante Western blot. (B) Las células se transfectaron con siRNA scramble o Beclin1 y tratadas con TNF- α durante 48 h. (C) Las células se trataron con cloroquina con y sin TNF- α durante 24 h. Se observó la morfología celular en microscopio de contraste de fase con un aumento de 10x. Los resultados son el promedio \pm EEM de 3 experimentos independientes. Análisis estadístico: Anova de una vía con post Test Dunnett.

10.4.1. Papel de la autofagia en la desdiferenciación celular en la línea A7r5

Para evaluar el papel de la autofagia en la desdiferenciación celular medimos la expresión de las proteínas de contracción (α -SMA y SM22) y de las de matriz extracelular (colágeno tipo I y osteopontina), en células estimuladas con TNF- α . La autofagia se inhibió mediante el tratamiento con un siRNA de Beclin1.

Los resultados de la Figura 20 muestran que cuando las células se trataron con TNF- α , la expresión de α -SMA y SM22 disminuyeron respecto del control (0,74 veces \pm 0,12, $p=0,117$ y 0,54 veces \pm 0,01, $p<0,01$, respectivamente). Esta disminución se previno cuando se silenció Beclin1. Este resultado sugiere que se requiere la autofagia para la disminución de las proteínas contráctiles inducidas por TNF- α en células A7r5.

Por otro lado, además de los niveles de las proteínas contráctiles también es interesante evaluar la organización de las fibras de actina. El aparato contráctil del músculo liso se contrae más lentamente que el del músculo estriado, pero permite un acortamiento mayor de las fibras. El mecanismo de contracción en esta variedad de músculo también se basa en el deslizamiento de los filamentos finos sobre los gruesos. Los filamentos de actina de las fibras musculares lisas son fáciles de detectar a nivel ultraestructural. Una forma es teñirlos con faloidina marcada, una micotoxina

que se una a la F-actina y que al estar unida a un fluoróforo, como la rodamina, permite la visualización de la misma.

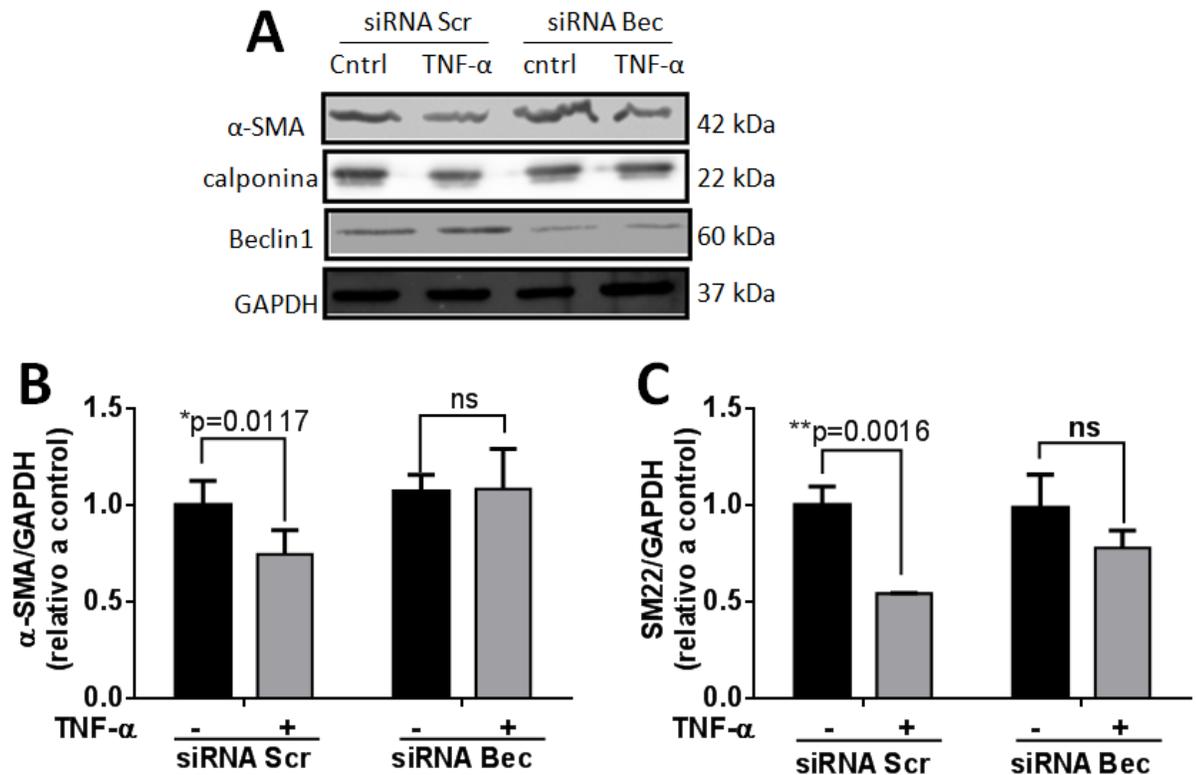


Figura 20. Papel de la autofagia en el cambio del nivel de proteínas contráctiles por TNF- α .

Las células A7r5 tratadas con el RNA interferente se estimularon con 100 ng/mL de TNF- α durante 48 h. Se obtuvieron extractos proteicos totales y se evaluó la expresión de α -SMA y SM22 mediante Western blot. **(A)** Geles representativos. Cuantificación de los niveles proteicos de **(B)** α -SMA y **(C)** SM22. Los resultados son el promedio \pm EEM de 3 y 4 experimentos independientes, respectivamente. Análisis estadístico: Anova de dos vías con post test Sidak.

En una VSMC en fenotipo contráctil, las fibras de actina se disponen ordenadamente en forma paralela. Sin embargo, cuando la célula pasa a un fenotipo sintético, estas fibras se desordenan presentándose las fibras en todas las direcciones, lo que le otorga a la célula una menor capacidad contráctil.

Para evaluar si la autofagia además de disminuir los niveles de las proteínas contráctiles, también desorganiza los filamentos de actina estimulamos las células con cloroquina durante las últimas 24 h del estímulo con TNF- α . Los resultados mostraron que al tratar las células con TNF- α la organización de los filamentos de actina era desordenada en el tratamiento con TNF- α . Esta desorganización se previno parcialmente cuando las células se trataron durante 24 h con cloroquina (Figura 21).

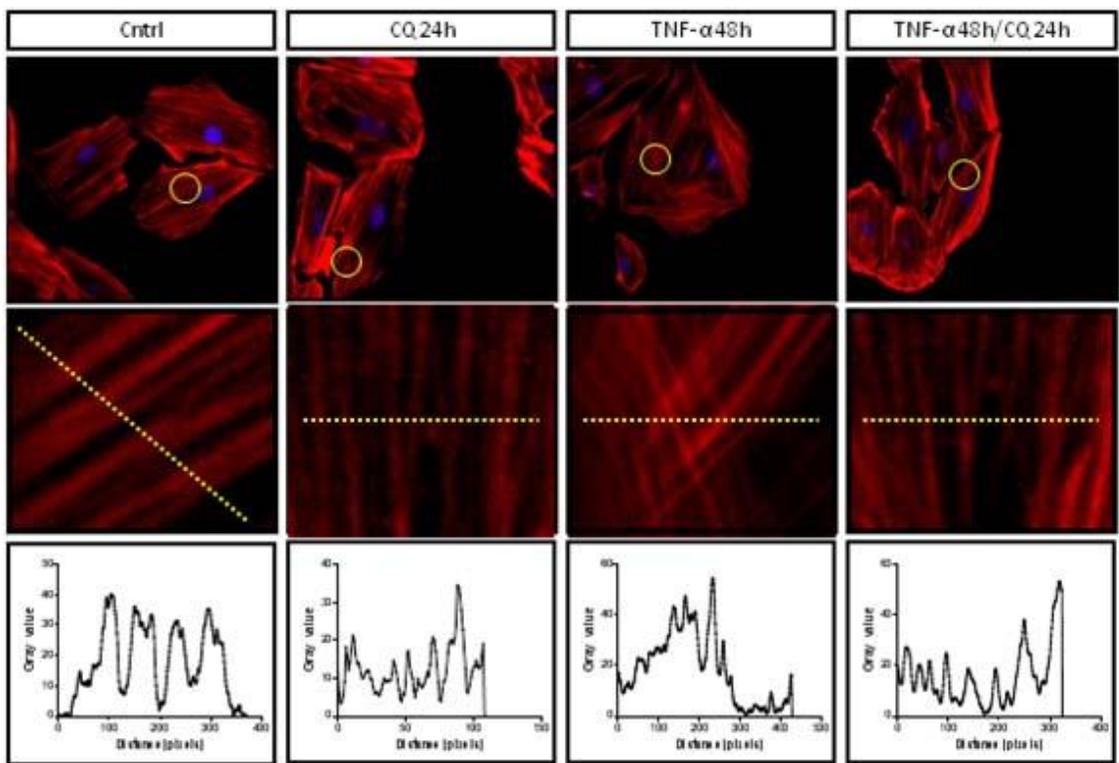


Figura 21. Efecto del TNF- α sobre la organización de las fibras de actina y el papel de la autofagia.

Las células A7r5 estimuladas con TNF- α , en presencia y ausencia de cloroquina, se fijaron y se tiñeron con faloidina-rodamina. La organización de las fibras de actina se observó en un microscopio de epifluorescencia con un aumento de 40x. Los paneles inferiores corresponden a los trazos densitográficos de las respectivas líneas amarillas. En estos trazos se puede apreciar que la pérdida de la regularidad de los patrones se asocia a un aumento de la irregularidad de las fibras de actina teñidas con faloidina-rodamina.

En cuanto a la matriz extracelular, el silenciamiento de la proteína Beclin1 previno el aumento en los niveles de colágeno tipo I y osteopontina inducido por TNF- α ($3,09\pm 0,85$ veces, $p < 0,01$ y $2,32\pm 0,46$ veces, $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 22). Estos resultados sugieren que el aumento de los niveles de las proteínas de la matriz extracelular inducida por TNF- α es dependiente de autofagia.

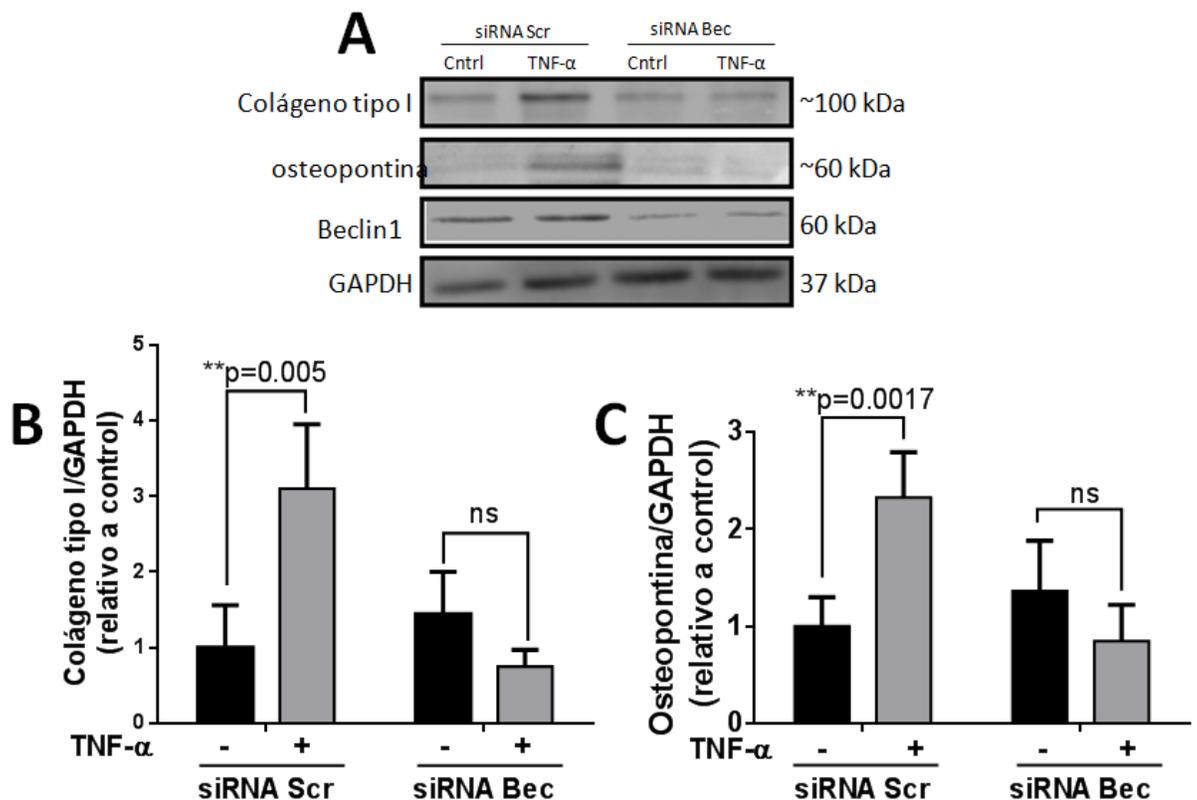


Figura 22. Papel de la autofagia en la síntesis de matriz extracelular.

Las células A7r5 tratadas con el RNA interferente se estimularon con 100 ng/mL de TNF- α durante 48 h. Se obtuvieron extractos proteicos totales y se evaluó mediante Western blot la expresión de colágeno tipo I y osteopontina. **(A)** Geles representativos. Cuantificación de los niveles proteicos de **(B)** colágeno tipo I y **(C)** osteopontina. Los resultados son el promedio \pm EEM de 3 y 4 experimentos independientes, respectivamente. Análisis estadístico: Anova dos vías con post test Holm Sidak.

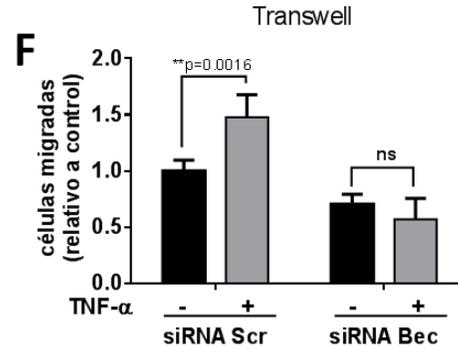
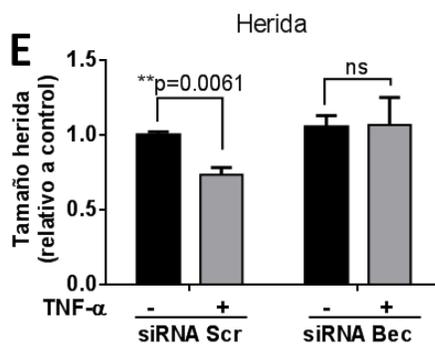
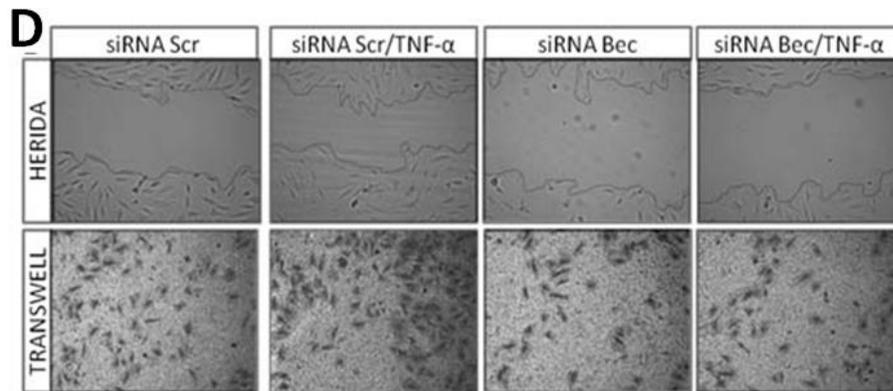
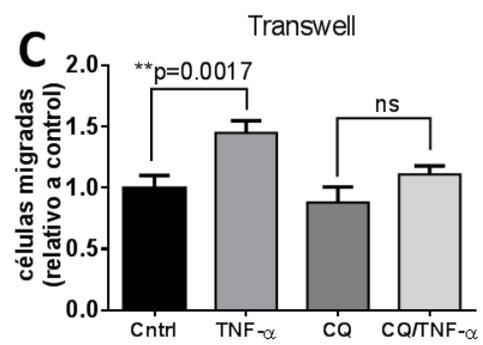
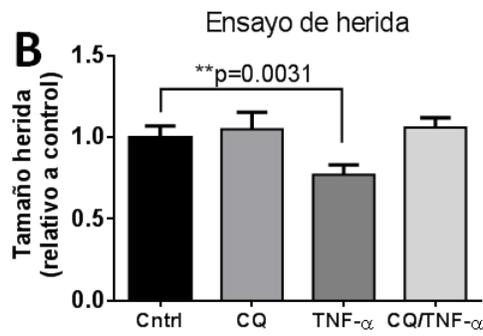
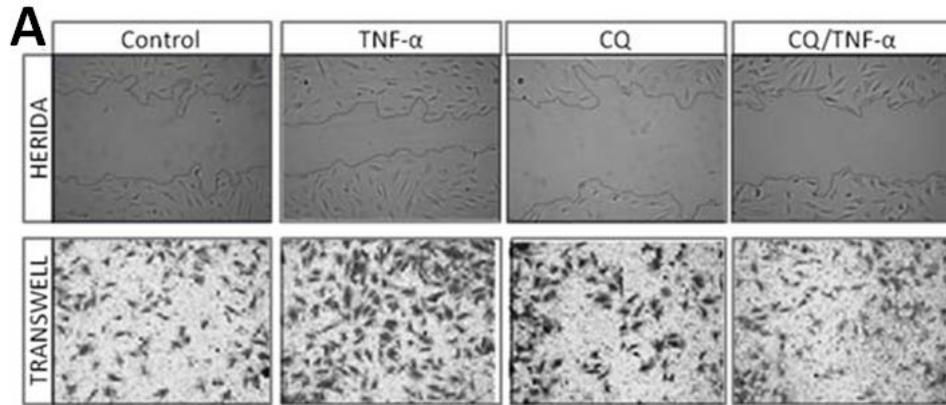
10.4.2. Papel de la autofagia en el fenotipo migratorio en la línea celular

A7r5

Para evaluar el papel de la autofagia en el cambio de fenotipo migratorio realizamos el ensayo de herida inhibiendo el proceso autofágico con cloroquina. Como se demostró anteriormente, TNF- α indujo el cierre de la herida a las 24 h ($0,73 \pm 0,05$ veces, $p < 0,01$) y aumentó la migración celular evaluada mediante el ensayo Transwell ($1,47 \pm 0,19$ veces, $p < 0,01$) (Figura 23). El cotratamiento con cloroquina y el silenciamiento de la proteína Beclin1 previnieron el cierre de la herida inducida por TNF- α (Figura 23A). El mismo resultado se obtuvo cuando la migración celular se evaluó usando el ensayo de transwell (Figura 23B).

Por lo tanto, estos resultados sugieren que la migración producida por TNF- α es dependiente de autofagia.

----- (Página siguiente)
Figura 23. Papel de la autofagia en la migración celular inducida por TNF- α .
(A-C) Ensayo de herida. Las células se cultivaron hasta una confluencia cercana al 100%, momento en el que se le realizó una herida con una punta de pipeta y se estimuló con de TNF- α y/o cloroquina según corresponda. Tras 24 h de estímulo, el cierre de la herida se observó en el microscopio de contraste de fase con un aumento 10x. **(D-F) Ensayo Transwell.** Se sembraron 5000 células en la cámara superior de la cámara Boyden y se estimularon con TNF- α y/o cloroquina según corresponda. Tras 24 h de migración las células del lado inferior de la membrana se fijaron y tiñeron con solución de cristal de violeta y se observó en el microscopio de contraste de fase con un aumento 10x. Los resultados son el promedio \pm EEM de 4 experimentos independientes. Análisis estadístico: Anova de dos vías con post test Holm Sidak.



10.4.3. Papel de la autofagia en el fenotipo proliferativo en la línea celular A7r5

Por último se comprobó si la proliferación inducida por TNF- α también era dependiente de autofagia. La proliferación celular se evaluó mediante el ensayo MTT y por incorporación de [3 H]-timidina. La participación de la autofagia se investigó mediante la coestimulación de las células con cloroquina y con el siRNA Beclin1.

La inhibición de la autofagia con cloroquina previno el aumento de la proliferación celular determinado por el ensayo de MTT y por la incorporación de [3 H]-timidina ($1,28 \pm 0,03$ veces, $p < 0,01$ y $2,33 \pm 0,24$ veces, $p < 0,05$, respectivamente) (Figura 24A y 24B). Al realizar ambos ensayos, pero ahora silenciado a Beclin1, se observaron prácticamente los mismos efectos ($1,15 \pm 0,1$ veces, $p < 0,01$ y $2,48 \pm 0,71$ veces, $p < 0,01$, respectivamente) (Figura 24C y 24D).

Estos resultados sugieren que el incremento de la proliferación de las células A7r5 inducidas por TNF- α requiere la activación y ejecución de la autofagia.

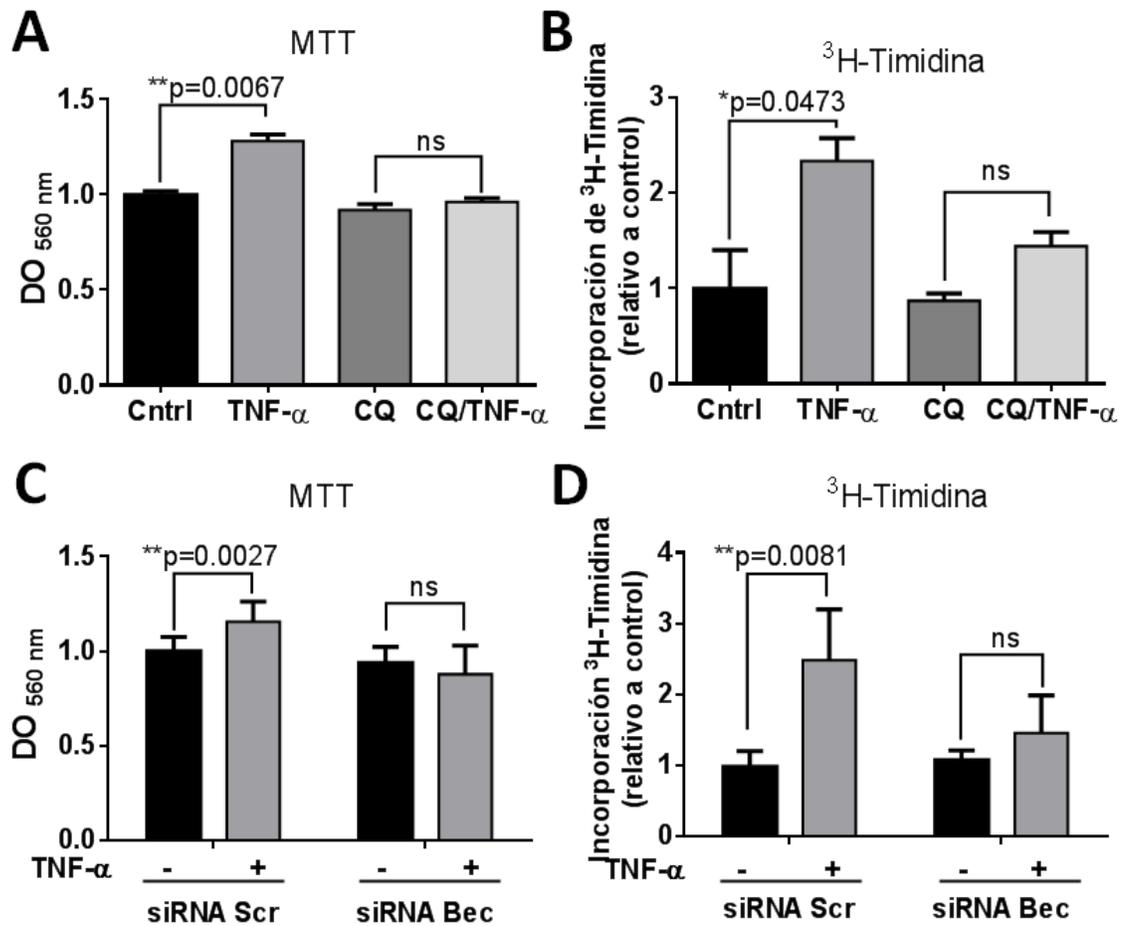


Figura 24. Papel de la autofagia en la proliferación celular.

(A y C) Ensayo MTT. En una placa de 24 pocillos se cultivaron 2000 células. Tras 24 h se reemplazó el medio con uno que contenía 2% SFB y se estimularon con TNF- α (100 ng/mL) en presencia y ausencia de cloroquina (CQ, 30 mM). Tras 24 h de estímulo se añadió 2 mg/mL de MTT durante 4 h y tras eliminar el medio, las células se lisaron con DMSO para disolver los cristales morados de formazán y medir la absorbancia a 560 nm. **(B y D) Ensayo de incorporación de [³H]-timidina.** En una placa de 24 pocillos se cultivaron 4000 células, se transfectaron con siRNA Scramble (siRNA Scr) o siRNA Beclin1 (siRNA Bec) según corresponda y se incubaron durante 6 h. Posteriormente se estimularon durante 24 h con 100 ng/mL de TNF- α . Cuatro horas antes del fin del estímulo se añadió 1 μ Ci/mL de [³H]-timidina. Al terminar el estímulo, las células se lavaron con NaOH 0,1 M y se lisaron. El lisado se mezcló con 300 μ L de solución de centelleo y se midió en un contador de centelleo. Los resultados son el promedio \pm EEM de 4 experimentos independientes. Análisis estadístico de A y C: Anova de dos vías con post test Sidak. Análisis estadístico de B y D: Anova de una vía con post-test Dunnett.

10.4.4. Papel de la autofagia en la secreción de citoquinas en VSMC

La primera estrategia para evaluar el papel de la autofagia sobre la secreción de citoquinas fue inhibirla mediante el silenciamiento de Beclin1, al igual que hicimos en el resto del trabajo de Tesis. Sin embargo, cuando realizamos el ensayo vimos que la secreción de citoquinas aumentaba en condiciones control (Figura 25). Este resultado sugiere que el tratamiento con la oligofectamina o al hecho de poner en contacto las células con un RNA exógeno activó el proceso inflamatorio. Por otra parte, es sabido que los RNAs exógenos de hebra simple pueden activar ciertos TLRs como el TLR-7 y el TLR-8 que podrían dar cuenta de este resultado [115].

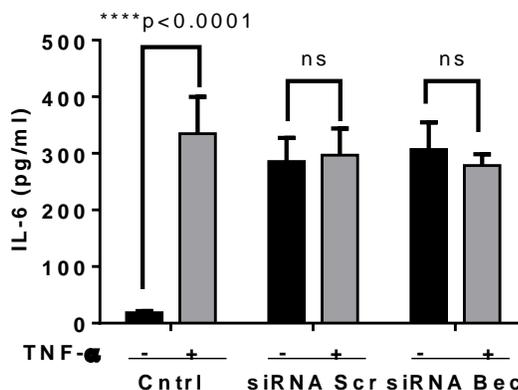


Figura 25. Efecto del RNA interferente de Beclin1 sobre la secreción de IL-6 inducida por TNF- α .

En una placa de 12 pocillos se cultivaron 5000 células y tras 24 h se transfectaron con siRNA Scramble (siRNA Scr) o siRNA Beclin1 (siRNA Bec) según corresponda y se incubaron por 6 h. Posteriormente, se estimularon durante 24 h con 100 ng/mL de TNF- α . Al cabo de ese tiempo, el sobrenadante se centrifugó para eliminar restos celulares y se realizó el ELISA. Los resultados son el promedio \pm EEM de 4 experimentos independientes. Análisis estadístico: Anova de dos vías con post-test Holm-Sidak.

Por lo tanto, repetimos el experimento inhibiendo la autofagia farmacológicamente con cloroquina durante las 24 h de estímulo con TNF- α . La coincubación con cloroquina inhibió el aumento de la secreción de IL-6 inducida por TNF- α (Figura 26). Este resultado permite sugerir que el aumento de la secreción de IL-6 inducida por TNF- α en las células A7r5, sería dependiente de la activación de la autofagia.

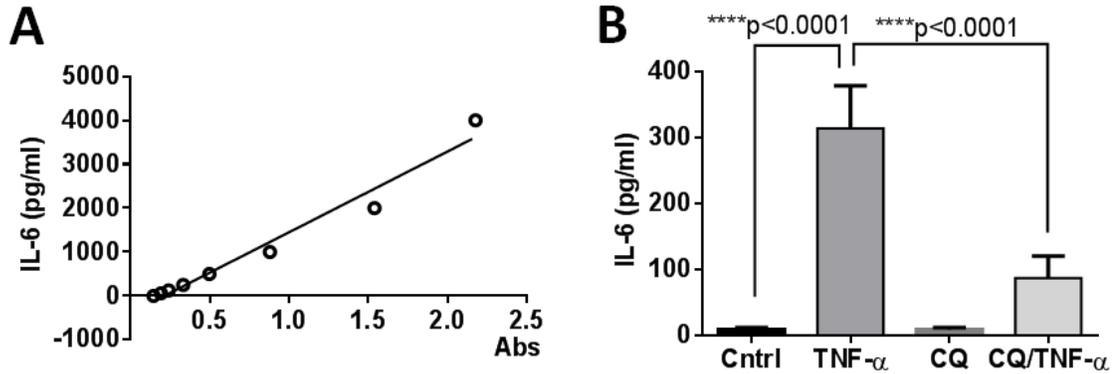


Figura 26. Efecto de la inhibición de la autofagia con cloroquina sobre la secreción de IL-6 inducida por TNF- α .

En una placa de 24 pocillos se cultivaron 5000 células y se trataron con TNF- α con y sin cloroquina durante 24 h. El sobrenadante se centrifugó para eliminar restos celulares y se realizó el ELISA. **(A)** Recta de calibración. **(B)** Los resultados son el promedio \pm EEM de 4 experimentos independientes. Análisis estadístico: Anova de una vía con post test de Tukey.

11. DISCUSIÓN

El remodelado vascular es un proceso de gran relevancia debido a que afecta a diferentes enfermedades cardiovasculares con elevada prevalencia en el mundo. Conocer las causas de este remodelado es un avance para su futura profilaxis o tratamiento. En este trabajo concluimos que el TNF- α , una de las citoquinas proinflamatorias mayoritaria en los tejidos y sangre de los pacientes con aterosclerosis, podría intervenir en este proceso de remodelado vascular, induciendo desdiferenciación de las VSMCs, disminuyendo su capacidad contráctil, aumentando su capacidad de secreción de matriz extracelular, y favoreciendo el fenotipo proliferativo y migratorio. Por otro lado, también hemos demostrado que en estas células, el TNF- α tendría un efecto proinflamatorio discreto, induciendo selectivamente la secreción de IL-6 por las VSMCs.

En los últimos años se ha relacionado la autofagia con diversos fenómenos patológicos y se ha descrito como diana terapéutica en alguno de ellos. Hay varios estudios que documentan la existencia de la autofagia en el tejido cardiovascular. En 1961 se publicó la primera evidencia de que las VSMCs presentan autofagia en muestras de pacientes con enfermedades cardiovasculares. Posteriormente esto también se observó en conejos alimentados con dieta rica en colesterol, monos y ratas [116-120]. Este aumento en los niveles de autofagia son debidos, en parte, a que las células deben adaptarse a las nuevas condiciones de estrés en un ambiente altamente

inflamatorio, como el desarrollado en la enfermedad aterosclérotica. Sin embargo, aún no es del todo conocido el papel de este proceso adaptativo en estas enfermedades, cuáles son las causas que la inducen, ni el efecto fisiopatológico de su inhibición.

A pesar de que ya estaba descrito en la literatura que el TNF- α induce el proceso autofágico en VSMCs [121], en ese trabajo sólo se evalúan marcadores de autofagia como Beclin1 y LC3-II, no estudiando el flujo autofágico [121]. Como describimos en la introducción y resultados, es necesario evaluar el flujo para corroborar que la autofagia está aumentada en todas sus etapas, ya que la acumulación de LC3-II, marcador autofágico, puede deberse también a una menor fusión del autofagosoma con el lisosoma, lo que indicaría justamente lo contrario, una disminución en el proceso autofágico. Nuestros resultados permitieron corroborar que el TNF- α induce autofagia en este modelo celular. Para ello medimos los marcadores de autofagia Beclin1, p62 y LC3-II a diferentes tiempos y realizamos los estudios de flujo autofágico pertinentes, tanto con las proteínas p62 como con la LC3-II. Observamos que al estimular nuestras células con una dosis de 100 ng/mL de TNF- α , la autofagia se veía aumentada a las 24 h. A pesar de que hubiera esperado que los estímulos con cloroquina acumulen p62 esto no ocurrió, probablemente porque esta proteína tiene un control de síntesis, que es frenada cuando se alcanza cierto nivel basal (Figura 5). Otro aporte de este trabajo fue determinar que la vía transduccional del factor de transcripción NF- κ B, concretamente la proteína

IKK, participa en la activación de la autofagia por TNF- α en las VSMCs (Figura 6).

El siguiente objetivo a estudiar fue el efecto del TNF- α sobre la desdiferenciación celular y la participación de la autofagia en este proceso. El marcador más claro que pudimos detectar en el proceso de desdiferenciación de las VSMC correspondió a las proteínas de matriz extracelular. Pasaron de estar prácticamente ausentes en las células diferenciadas a aumentar más del 100% tanto en el colágeno tipo I como en la osteopontina. Sin embargo, en las proteínas contráctiles α -SMA y SM22, tuvieron una disminución siempre menor de un 50 % (Figura 7). De acuerdo a lo que está reportado en la literatura, estos cambios son de magnitudes similares a los inducidos por el PDGF-BB, el modulador fenotípico de estas células por excelencia. En estos trabajos se observa una disminución en el α -SMA en aproximadamente un 40% [122], magnitud también observada en estudios no publicados de nuestro laboratorio. En cuanto al efecto del PDGF-BB sobre la matriz extracelular, ese mismo trabajo reporta que el PDGF-BB también induce un aumento de aproximadamente el 100% de osteopontina, efecto similar al observado en nuestro trabajo con el TNF- α . Por otro lado, el efecto del PDGF-BB sobre la migración y la proliferación, en un trabajo publicado por nuestro laboratorio se observó que aumenta la migración en un 100% y la proliferación en un 45% [123]. Estos efectos fueron un poco dispares en el caso del TNF- α el cual

parece tener mayor efecto sobre la proliferación (aumentándola hasta un 100%) y menor efecto en la migración, la cual se induce en menos del 50%.

En el remodelado vascular las VSMCs también se caracterizan por poseer una mayor tasa de proliferación y migración. A pesar de que ya estaba reportado el efecto del TNF- α sobre estos procesos [124,125] no se conocía su dependencia de la autofagia. El ensayo por MTT no es un método muy confiable para medir proliferación celular, principalmente debido a que la reducción del MTT está asociado a la actividad mitocondrial [126]. Aunque originalmente se describió que existía una relación entre la cantidad de MTT reducido y el número de células, su reducción también puede ser influenciado por el grado de actividad mitocondrial celular [127]. Debido a que el TNF- α también está involucrado en la iniciación de apoptosis [31], podría ser que los efectos de esta citoquina sobre la reducción del MTT sea debido a un cambio en la actividad mitocondrial más que cambios en la proliferación celular. Por esta razón repetimos todos estos ensayos utilizando la incorporación de [3 H]- timidina. Aunque técnicamente es más dificultosa su aplicación, sus resultados son más concluyentes que aquellos obtenidos por MTT.

Al igual que observamos en la desdiferenciación celular, el aumento de la tasa proliferativa y migratoria de las VSMCs por el estímulo con TNF- α se previno al bloquearse o inhibirse la autofagia. Por lo tanto, nuestros datos muestran que la autofagia es absolutamente necesaria para la

desdiferenciación de las VSMC inducida por TNF- α . La inhibición de la autofagia, ya sea en su etapa inicial realizada con el siRNA Beclin1 o en su etapa final usando cloroquina, inhibió la aparición de todos los marcadores de desdiferenciación de las VSMCs. Esto nos hace pensar que la autofagia participaría en el mecanismo de desdiferenciación de las VSMC con un rol que iría más allá que el solo hecho de estar involucrado en la degradación de las proteínas contráctiles. Sólo de esta manera se podría explicar su papel en el favorecimiento de la migración, proliferación o de la secreción de proteínas de matriz extracelular.

Recientemente se describió que la autofagia es necesaria para la movilidad e invasión de células cancerígenas metastásicas [128]. En estas células la autofagia promovería el recambio de las adhesiones focales a través de un mecanismo que involucraría la degradación de paxilina, una proteína clave de las adhesiones focales. La paxilina contiene un dominio de interacción con LC3 (dominio LIR) y sería dirigido al autofagosoma por su unión a LC3 a través de un mecanismo regulado por Src [128].

Por otro lado, está descrito que la autofagia está involucrada en la inducción de la proliferación de las VSMCs en respuesta a diferentes estímulos, incluido el TNF- α evaluado en este trabajo. Varios estudios han demostrado que la activación de la autofagia contribuye a la proliferación de VSMCs. Por ejemplo, el tratamiento de las VSMCs con la proteína secretada Sonic

hedgehog (Shh) induce la autofagia de una manera dependiente de Akt y aumenta la proliferación de las VSMCs [129]. Este efecto es muy importante en la patogénesis de la enfermedad vascular proliferativa incluida la reestenosis [129]. Además, la autofagia inducida por PDGF-BB se asocia con aumento de la migración y la proliferación de VSMCs y su inhibición por 3-metil adenina o spautin-1 reduce la proliferación inducida por PDGF [23]. Se ha sugerido que la deficiencia en la autofagia en las VSMCs induce a la detención del ciclo celular en G1 a través de un mecanismo dependiente de p16, así como de aumentar la migración asociada con la regulación positiva de metaloproteinasas de matriz 9 (MMP9), factor de crecimiento transformante beta y quimioquinas (C-X-C) con motivo ligando 12 (CXCL12), siendo responsable en la formación de neointima después de una lesión vascular [130].

En trabajos publicados recientemente se ha relacionado la diferenciación celular con el factor de transcripción de tipo Kruppel KLF4 [122]. La expresión de KLF4 está asociada con el efecto inhibitorio sobre la proliferación celular ejerciendo este efecto fundamentalmente en la etapa G1/S del ciclo celular [131]. Debido a que en la placa de ateroma se destaca la hiperproliferación y dediferenciación de las VSMCs, se pensó que KLF4 podría tener un papel importante en este proceso. Se demostró que el KLF4 no se expresa en VSMCs diferenciadas [132], pero si lo hace en tejidos vasculares dañados. Debido a que el KLF4 tiene gran relevancia en el cambio de fenotipo inducido por PDGF-BB [133], es probable que también lo tenga en el proceso de

desdiferenciación inducido por TNF- α . Esta idea estaría apoyado por el trabajo en el que se observó que factores inflamatorios como IFN- γ , LPS o TNF- α inducen la expresión de KLF4 [134]. En cuanto a la relación existente entre la autofagia y el KLF4, en un trabajo publicado recientemente se demostró que el KLF4 se une al promotor del p62 incrementando su expresión [135]. Con esto son varias las evidencias que sugieren que sería interesante evaluar si el KLF4 es un factor relevante en la desdiferenciación celular dependiente de autofagia inducida por TNF- α en las VSMCs.

Curiosamente, la rapamicina y sus derivados, que inducen una fuerte inducción de la autofagia [136,137], no sólo inhiben la proliferación celular [138], sino que también evitan la migración de las VSMCs [139] y la restenosis [140]. En consecuencia, los fármacos derivados de la rapamicina se utilizan comúnmente en los stents liberadores de fármacos para prevenir la reestenosis después de la angioplastia [141]. Estos fármacos parecen prevenir la proliferación y la migración de las VSMCs mediante la inhibición de S6K1 y de esta manera inhibir la expresión de proteínas clave del ciclo celular [142,143]. Por lo tanto, los efectos de los medicamentos derivados de rapamicina es poco probable se deban a su capacidad de activar la autofagia. Es de destacar que los stents liberadores de fármacos derivados de rapamicina son superiores a otros stents que liberan inhibidores de la proliferación celular como por ejemplo paclitaxel [144,145]. Esto sugiere que los fármacos derivados de rapamicina no sólo participarían en la detención del ciclo celular, sino que podrían involucrar

otros mecanismos adicionales que expliquen su efectividad. Sin embargo, esta característica no es exclusiva sólo de los fármacos derivados de rapamicina. Verapamilo [146] y emodina [147] también inducen autofagia e inhiben la proliferación de las VSMC. Por otro lado, telmisartán y la atorvastatina, medicamentos usados en patologías cardiovasculares, inducen formas de autofagia asociadas con la menor incorporación de lípidos y una menor calcificación, respectivamente [148,149].

En cuanto a los datos del efecto del TNF- α sobre la secreción de citoquinas proinflamatorias, se puede afirmar que a pesar de que las VSMCs responden fuertemente al TNF- α induciendo a autofagia y cambio de fenotipo, su efecto sobre la secreción de citoquinas proinflamatorias es menor. Esta característica pareciera ser particular de las VSMCs ya que el TNF- α induce fuertemente la secreción de citoquinas en otros modelos celulares [31,150]. Los únicos efectos proinflamatorios que vimos fue el aumento en la secreción de IL-6 y una tendencia al aumento de la expresión de la molécula de adhesión VCAM-1. Sin embargo, no observamos efectos sobre la secreción de IL-1 β y de IL-10. Una explicación podría ser la no expresión de estas citoquinas en las VSMCs, aunque interesantemente se ha descrito la expresión de ambas citoquinas en VSMCs de primates y el aumento de la IL-1 β y la disminución de la IL-10 cuando estas células envejecían [151].

Por otra parte, se ha descrito que la autofagia participa en la vía secretora no convencional para la secreción de IL-1 β [53]. Esta vía de exportación depende de Atg5, inflamasoma, y al menos una de las dos proteínas de apilamiento de reensamblaje del Golgi (GRASP) parálogas de mamífero, GRASP55 (GORASP2) y Rab8a [53]. Más recientemente, en un carcinoma nasofaríngeo y en una línea celular monocítica se demostró de que se requiere la proteína EB1 asociada a microtúbulos para la secreción dependiente de autofagia de IL-1 β por el inflamosoma AIM2 [152]. Además, en macrófagos humanos, la vía dectin-1/Syk activa una vía de secreción de proteínas mediada por vesículas no convencional que depende tanto del inflamosoma como de la actividad de la autofagia [153]. Sería interesante evaluar a futuro si un mecanismo similar a lo descrito para las células cancerígenas y macrófagos es el responsable del aumento de la secreción de IL-6 inducida por TNF- α en VSMCs. Además, también sería importante estudiar si hay diferentes mecanismos de secreción de citoquinas, ya que como vemos en la figura 25, la IL-6 secretada cuando las células fueron transfectadas con siRNA de Beclin1 es claramente independiente de autofagia, mientras que cuando inhibimos la autofagia con cloroquina la IL-6 secretada por estímulo de TNF- α sí que es inhibida. Esto nos hace pensar que podría haber dos mecanismos diferentes de secreción de citoquinas, uno que sea meramente de defensa ante un estímulo patógeno, prácticamente una respuesta innata, y otro que está asociado al cambio de fenotipo.

A raíz de estos resultados, en los que tanto el TNF- α como la autofagia tienen gran relevancia en la modulación fenotípica y en contribución del ambiente inflamatorio en la aterosclerosis, pueden abordarse como dianas terapéuticas para esta enfermedad. Existen antagonistas del TNF- α , como el etanercept, infliximab y adalimumab, los cuales son utilizados en diferentes enfermedades autoinmunes o con elevado componente inflamatorio como la artritis reumatoide, psoriasis y las enfermedades inflamatorias intestinales [154,155]. El papel de estos fármacos ha sido estudiado en enfermedades cardiovasculares y paradójicamente aumenta la mortalidad [156,157]. La razón de esto no se ha explicado bien hasta el momento ya que en pacientes con artritis reumatoide el tratamiento con terapia anti-TNF reduce claramente la incidencia de enfermedades cardiovasculares [158,159]. Debido a esto se necesitan otros estudios para evaluar el efecto de la terapia anti-TNF en la aterosclerosis. Sólo de esta manera se podrá concluir si esta terapia podría tener utilidad en la práctica clínica.

Por otro lado, hay fármacos que regulan más específicamente la autofagia, como la cloroquina y la spautin-1 (un inhibidor de USP10 y USP13). Ambas moléculas podrían ser buenos candidatos para el tratamiento de la aterosclerosis. En estudios celulares se vio que spautin-1 inhibe la autofagia de forma independiente a Akt inhibiendo la hiperproliferación de las VSMCs causada por PDGF [23]. Algo similar se ve con la cloroquina en nuestro trabajo, donde la cloroquina inhibe el fenotipo proliferativo y migratorio de las VSMCs.

La cloroquina es fármaco aprobado actualmente para el uso humano y que además ha mostrado tener efectos beneficiosos en la prevención de hipertensión en modelos murinos [160]. La proyección de esta área de estudio es encontrar un modulador autofágico que sea capaz de discriminar entre la autofagia basal y autofagia patológica, siendo capaz de modular sólo aquellas vías metabólicas que están desreguladas en la enfermedad.

12. RESUMEN GRÁFICO

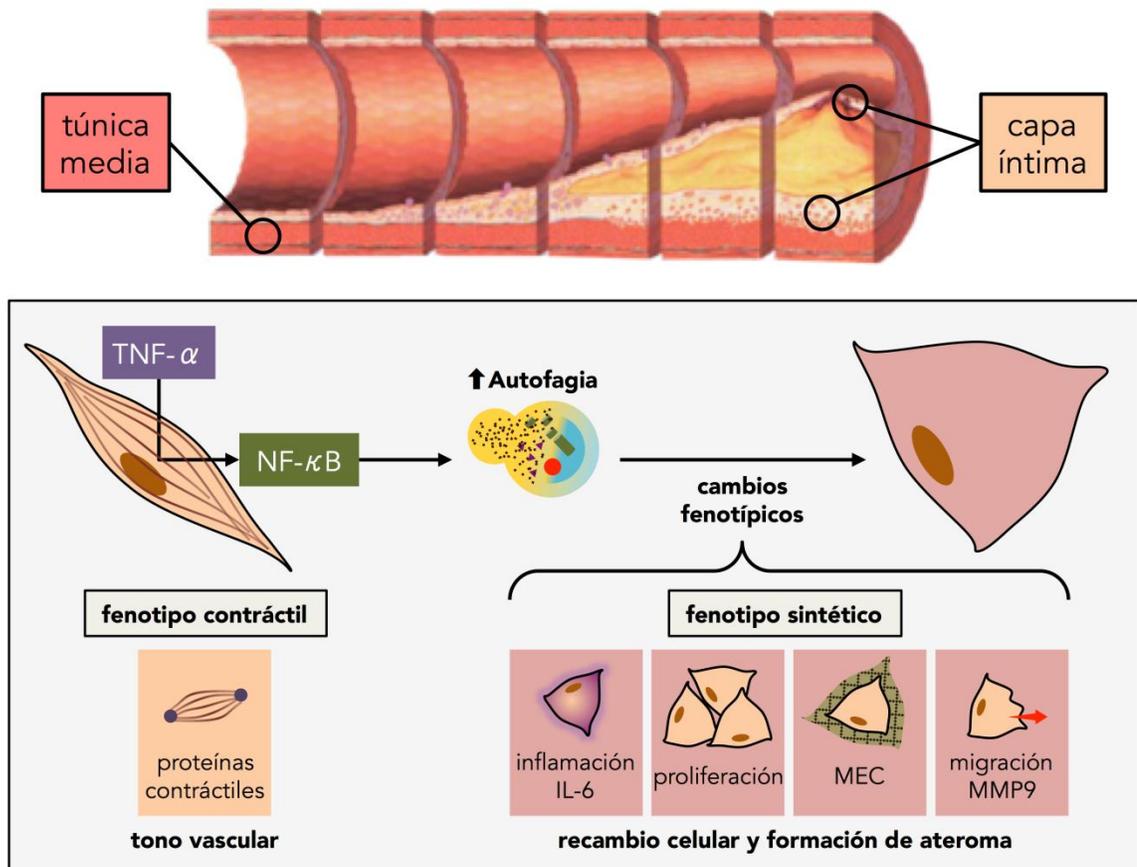


Figura 27. Resumen gráfico.

En el panel superior se observa que las células de músculo liso vascular se encuentran en un vaso sanguíneo sano principalmente en la túnica media y en la capa íntima cuando se ha formado la placa de ateroma. En el panel inferior se representa que el TNF- α induce autofagia vía NF- κ B lo que permite el cambio de fenotipo que se caracteriza principalmente por la disminución de los niveles proteicos de la maquinaria contráctil, el aumento de la matriz extracelular y el aumento de la tasa migratoria, con un aumento de la secreción de la MMP9, y proliferación celular. Además, también se demuestra en este trabajo que en este fenotipo sintético está incluido el aumento de la secreción de la IL-6.

13. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos hasta el momento se puede concluir que en las VSMCs el TNF- α induciría desdiferenciación celular, con una disminución de los niveles de proteínas contráctiles y un aumento de la matriz extracelular, fenotipo proliferativo y fenotipo migratorio. Todo esto dependiente de autofagia, la cual sería dependiente de IKK, una proteína clave de la vía NF- κ B..

Además también concluimos que TNF- α induciría un aumento de la secreción de IL-6 por un mecanismo dependiente de autofagia. El aumento de la secreción de IL-6 no sería específico de TNF- α , y sería más bien una característica común del fenotipo sintético, ya que otro inductor del cambio de fenotipo, el PDGF-BB, también induce dicho incremento.

Por lo tanto, en una condición de aterosclerosis, las VSMCs, que se encontrarían estresadas debido a las condiciones inflamatorias del medio, aumentarían su nivel de autofagia para adaptarse a estas condiciones. Además, esta autofagia podría ser responsable de un cambio de fenotipo a uno sintético-desdiferenciado que sería, en parte, una de las causas de la génesis y progresión de la enfermedad. Por lo tanto, a futuro, se podría investigar si la autofagia, el TNF- α o la vía inflamatoria NF- κ B serían dianas terapéuticas en esta enfermedad.

14. REFERENCIAS

1. WHO (2013) www.who.int/gho/ncd/en/index.html Global Health Observatory (GHO).
2. Tennant M, McGeachie JK (1990) Blood vessel structure and function: a brief update on recent advances. *Aust N Z J Surg* 60: 747-753.
3. McGrath JC, Deighan C, Briones AM, Shafaroudi MM, McBride M, et al. (2005) New aspects of vascular remodelling: the involvement of all vascular cell types. *Exp Physiol* 90: 469-475.
4. Leloup AJ, Van Hove CE, Heykers A, Schrijvers DM, De Meyer GR, et al. (2015) Elastic and Muscular Arteries Differ in Structure, Basal NO Production and Voltage-Gated Ca(2+)-Channels. *Front Physiol* 6: 375.
5. Hacking WJ, VanBavel E, Spaan JA (1996) Shear stress is not sufficient to control growth of vascular networks: a model study. *Am J Physiol* 270: H364-375.
6. Ward MR, Pasterkamp G, Yeung AC, Borst C (2000) Arterial remodeling. Mechanisms and clinical implications. *Circulation* 102: 1186-1191.
7. Somlyo AP, Somlyo AV (1968) Vascular smooth muscle. I. Normal structure, pathology, biochemistry, and biophysics. *Pharmacol Rev* 20: 197-272.
8. Webb RC (2003) Smooth muscle contraction and relaxation. *Adv Physiol Educ* 27: 201-206.
9. Tanzer ML (2006) Current concepts of extracellular matrix. *J Orthop Sci* 11: 326-331.
10. Boudreau NJ, Jones PL (1999) Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem J* 339 (Pt 3): 481-488.
11. Cole JE, Georgiou E, Monaco C (2010) The expression and functions of toll-like receptors in atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 2010: 393946.
12. Curtiss LK, Tobias PS (2009) Emerging role of Toll-like receptors in atherosclerosis. *J Lipid Res* 50 Suppl: S340-345.

13. Lee GL, Chang YW, Wu JY, Wu ML, Wu KK, et al. (2012) TLR 2 induces vascular smooth muscle cell migration through cAMP response element-binding protein-mediated interleukin-6 production. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 2751-2760.
14. Yang X, Coriolan D, Murthy V, Schultz K, Golenbock DT, et al. (2005) Proinflammatory phenotype of vascular smooth muscle cells: role of efficient Toll-like receptor 4 signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289: H1069-1076.
15. Li H, Xu H, Sun B (2012) Lipopolysaccharide regulates MMP-9 expression through TLR4/NF-kappaB signaling in human arterial smooth muscle cells. *Mol Med Rep* 6: 774-778.
16. Wang CC, Lin WN, Lee CW, Lin CC, Luo SF, et al. (2005) Involvement of p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK, and NF-kappaB in IL-1beta-induced VCAM-1 expression in human tracheal smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288: L227-237.
17. Liang KC, Lee CW, Lin WN, Lin CC, Wu CB, et al. (2007) Interleukin-1beta induces MMP-9 expression via p42/p44 MAPK, p38 MAPK, JNK, and nuclear factor-kappaB signaling pathways in human tracheal smooth muscle cells. *J Cell Physiol* 211: 759-770.
18. Song Y, Shen H, Schenten D, Shan P, Lee PJ, et al. (2012) Aging enhances the basal production of IL-6 and CCL2 in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 103-109.
19. Tang HP, Sun LX, Han W (2013) Endothelial cells on the proliferation and expression of intercellular adhesion molecule 1 and interleukin 8 of vascular smooth muscle cells. *Genet Mol Res* 12: 4363-4370.
20. Owens GK (1998) Molecular control of vascular smooth muscle cell differentiation. *Acta Physiol Scand* 164: 623-635.

21. Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR (2004) Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev* 84: 767-801.
22. Rzucidlo EM, Martin KA, Powell RJ (2007) Regulation of vascular smooth muscle cell differentiation. *J Vasc Surg* 45 Suppl A: A25-32.
23. Salabei JK, Cummins TD, Singh M, Jones SP, Bhatnagar A, et al. (2013) PDGF-mediated autophagy regulates vascular smooth muscle cell phenotype and resistance to oxidative stress. *Biochem J* 451: 375-388.
24. Daemen MJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM (1991) Angiotensin II induces smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res* 68: 450-456.
25. Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ (1992) Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs. hyperplasia. Autocrine transforming growth factor-beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 90: 456-461.
26. Mugabe BE, Yaghini FA, Song CY, Buharalioglu CK, Waters CM, et al. (2010) Angiotensin II-induced migration of vascular smooth muscle cells is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase-activated c-Src through spleen tyrosine kinase and epidermal growth factor receptor transactivation. *J Pharmacol Exp Ther* 332: 116-124.
27. Chen S, Ding Y, Tao W, Zhang W, Liang T, et al. (2012) Naringenin inhibits TNF-alpha induced VSMC proliferation and migration via induction of HO-1. *Food Chem Toxicol* 50: 3025-3031.
28. Pass HI, Mew D, Pass HA, Temeck BK (1995) The macrophage, TNF, and other cytokines. *Chest Surg Clin N Am* 5: 73-90.
29. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD (1988) A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF. *Cell* 53: 45-53.

30. Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, Tsukamoto H, Shimoda T (2010) Transmembrane TNF- α : structure, function and interaction with anti-TNF agents. *Rheumatology (Oxford)* 49: 1215-1228.
31. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P (2003) Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* 10: 45-65.
32. Thomas PS (2001) Tumour necrosis factor- α : the role of this multifunctional cytokine in asthma. *Immunol Cell Biol* 79: 132-140.
33. Chen G, Goeddel DV (2002) TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296: 1634-1635.
34. Ozes ON, Mayo LD, Gustin JA, Pfeffer SR, Pfeffer LM, et al. (1999) NF- κ B activation by tumour necrosis factor requires the Akt serine-threonine kinase. *Nature* 401: 82-85.
35. Karin M (2006) NF- κ B and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog* 45: 355-361.
36. Ross R (1993) The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 362: 801-809.
37. Weber C, Noels H (2011) Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 17: 1410-1422.
38. Kato M, Dote K, Sasaki S, Ueda K, Kono Y, et al. (2009) Clinical impact of dyslipidemia for coronary plaque vulnerability in acute coronary syndrome without metabolic syndrome. *J Cardiol* 54: 394-401.
39. Albelda SM, Smith CW, Ward PA (1994) Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 8: 504-512.
40. Giri JG, Lomedico PT, Mizel SB (1985) Studies on the synthesis and secretion of interleukin 1. I. A 33,000 molecular weight precursor for interleukin 1. *J Immunol* 134: 343-349.
41. Ikonomidis I, Andreotti F, Economou E, Stefanadis C, Toutouzas P, et al. (1999) Increased proinflammatory cytokines in patients with chronic stable angina and their reduction by aspirin. *Circulation* 100: 793-798.

42. Libby P (2001) Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104: 365-372.
43. Auer J, Weber T, Berent R, Lassnig E, Lamm G, et al. (2003) Genetic polymorphisms in cytokine and adhesion molecule genes in coronary artery disease. *Am J Pharmacogenomics* 3: 317-328.
44. Vohnout B, Di Castelnuovo A, Trotta R, D'Orazi A, Panniteri G, et al. (2003) Interleukin-1 gene cluster polymorphisms and risk of coronary artery disease. *Haematologica* 88: 54-60.
45. Latkovskis G, Licis N, Kalnins U (2004) C-reactive protein levels and common polymorphisms of the interleukin-1 gene cluster and interleukin-6 gene in patients with coronary heart disease. *Eur J Immunogenet* 31: 207-213.
46. Mantovani A, Locati M, Vecchi A, Sozzani S, Allavena P (2001) Decoy receptors: a strategy to regulate inflammatory cytokines and chemokines. *Trends Immunol* 22: 328-336.
47. Schroder K, Tschopp J (2010) The inflammasomes. *Cell* 140: 821-832.
48. Jin C, Flavell RA (2010) Molecular mechanism of NLRP3 inflammasome activation. *J Clin Immunol* 30: 628-631.
49. Holbourn KP, Shone CC, Acharya KR (2006) A family of killer toxins. Exploring the mechanism of ADP-ribosylating toxins. *FEBS J* 273: 4579-4593.
50. Khakh BS, North RA (2006) P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 442: 527-532.
51. Hung SC, Choi CH, Said-Sadier N, Johnson L, Atanasova KR, et al. (2013) P2X4 assembles with P2X7 and pannexin-1 in gingival epithelial cells and modulates ATP-induced reactive oxygen species production and inflammasome activation. *PLoS One* 8: e70210.
52. Fernandes-Alnemri T, Wu J, Yu JW, Datta P, Miller B, et al. (2007) The pyroptosome: a supramolecular assembly of ASC dimers mediating

- inflammatory cell death via caspase-1 activation. *Cell Death Differ* 14: 1590-1604.
53. Dupont N, Jiang S, Pilli M, Ornatowski W, Bhattacharya D, et al. (2011) Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1beta. *EMBO J* 30: 4701-4711.
 54. Biasucci LM, Vitelli A, Liuzzo G, Altamura S, Caligiuri G, et al. (1996) Elevated levels of interleukin-6 in unstable angina. *Circulation* 94: 874-877.
 55. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR (1993) Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11: 165-190.
 56. La Flamme AC, MacDonald AS, Pearce EJ (2000) Role of IL-6 in directing the initial immune response to schistosome eggs. *J Immunol* 164: 2419-2426.
 57. Anguera I, Miranda-Guardiola F, Bosch X, Filella X, Sitges M, et al. (2002) Elevation of serum levels of the anti-inflammatory cytokine interleukin-10 and decreased risk of coronary events in patients with unstable angina. *Am Heart J* 144: 811-817.
 58. Jovinge S, Hamsten A, Tornvall P, Proudler A, Bavenholm P, et al. (1998) Evidence for a role of tumor necrosis factor alpha in disturbances of triglyceride and glucose metabolism predisposing to coronary heart disease. *Metabolism* 47: 113-118.
 59. Kleinbongard P, Heusch G, Schulz R (2010) TNFalpha in atherosclerosis, myocardial ischemia/reperfusion and heart failure. *Pharmacol Ther* 127: 295-314.
 60. Aoyama T, Hayashi T, Fujikawa H, Ogata T, Cho H, et al. (2013) [Clinical significance of the human epidermal growth factor receptor 2(HER2) in patients with recurrent gastric cancer who received S-1 adjuvant chemotherapy]. *Gan To Kagaku Ryoho* 40: 1647-1649.

61. Giacconi R, Cipriano C, Muti E, Costarelli L, Malavolta M, et al. (2006) Involvement of -308 TNF-alpha and 1267 Hsp70-2 polymorphisms and zinc status in the susceptibility of coronary artery disease (CAD) in old patients. *Biogerontology* 7: 347-356.
62. Morange PE, Tregouet DA, Godefroy T, Saut N, Bickel C, et al. (2008) Polymorphisms of the tumor necrosis factor-alpha (TNF) and the TNF-alpha converting enzyme (TACE/ADAM17) genes in relation to cardiovascular mortality: the AtheroGene study. *J Mol Med (Berl)* 86: 1153-1161.
63. Gotsman I, Stabholz A, Planer D, Pugatsch T, Lapidus L, et al. (2008) Serum cytokine tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 associated with the severity of coronary artery disease: indicators of an active inflammatory burden? *Isr Med Assoc J* 10: 494-498.
64. Safranow K, Dziedziejko V, Rzeuski R, Czyzycka E, Wojtarowicz A, et al. (2009) Plasma concentrations of TNF-alpha and its soluble receptors sTNFR1 and sTNFR2 in patients with coronary artery disease. *Tissue Antigens* 74: 386-392.
65. Chung HK, Lee IK, Kang H, Suh JM, Kim H, et al. (2002) Statin inhibits interferon-gamma-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in vascular endothelial and smooth muscle cells. *Exp Mol Med* 34: 451-461.
66. Kwon JS, Joung H, Kim YS, Shim YS, Ahn Y, et al. (2012) Sulforaphane inhibits restenosis by suppressing inflammation and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 225: 41-49.
67. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, et al. (1993) The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol* 171: 223-229.
68. Libby P, Li H (1993) Vascular cell adhesion molecule-1 and smooth muscle cell activation during atherogenesis. *J Clin Invest* 92: 538-539.

69. Park SH, Koo HJ, Sung YY, Kim HK (2013) The protective effect of *Prunella vulgaris* ethanol extract against vascular inflammation in TNF-alpha-stimulated human aortic smooth muscle cells. *BMB Rep* 46: 352-357.
70. Choi H, Dikalova A, Stark RJ, Lamb FS (2015) c-jun N-terminal kinase attenuates TNFalpha signaling by reducing Nox1-dependent endosomal ROS production in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med*.
71. Turner M, Feldmann M (1988) Comparison of patterns of expression of tumour necrosis factor, lymphotoxin and interleukin-6 mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 153: 1144-1151.
72. Klionsky DJ, Emr SD (2000) Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 290: 1717-1721.
73. Petiot A, Pattingre S, Arico S, Meley D, Codogno P (2002) Diversity of signaling controls of macroautophagy in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 27: 431-441.
74. Goldberg AL (2003) Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* 426: 895-899.
75. Mortimore GE, Poso AR (1987) Intracellular protein catabolism and its control during nutrient deprivation and supply. *Annu Rev Nutr* 7: 539-564.
76. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* 15: 1101-1111.
77. Mortimore GE, Poso AR (1988) Amino acid control of intracellular protein degradation. *Methods Enzymol* 166: 461-476.
78. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, et al. (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120: 237-248.

79. Kirkegaard K, Taylor MP, Jackson WT (2004) Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2: 301-314.
80. Chi S, Kitanaka C, Noguchi K, Mochizuki T, Nagashima Y, et al. (1999) Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene* 18: 2281-2290.
81. Tsukada M, Ohsumi Y (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333: 169-174.
82. Thumm M, Egner R, Koch B, Schlumpberger M, Straub M, et al. (1994) Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 349: 275-280.
83. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Jr., Emr SD, Sakai Y, et al. (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5: 539-545.
84. Ferraro E, Cecconi F (2007) Autophagic and apoptotic response to stress signals in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys* 462: 210-219.
85. Matsuura A, Tsukada M, Wada Y, Ohsumi Y (1997) Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 192: 245-250.
86. Kamada Y, Funakoshi T, Shintani T, Nagano K, Ohsumi M, et al. (2000) Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex. *J Cell Biol* 150: 1507-1513.
87. Reggiori F, Tucker KA, Stromhaug PE, Klionsky DJ (2004) The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 and Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure. *Dev Cell* 6: 79-90.

88. Tassa A, Roux MP, Attaix D, Bechet DM (2003) Class III phosphoinositide 3-kinase--Beclin1 complex mediates the amino acid-dependent regulation of autophagy in C2C12 myotubes. *Biochem J* 376: 577-586.
89. Kihara A, Kabeya Y, Ohsumi Y, Yoshimori T (2001) Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* 2: 330-335.
90. Liang C, Lee JS, Inn KS, Gack MU, Li Q, et al. (2008) Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* 10: 776-787.
91. Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, et al. (2007) Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* 447: 1121-1125.
92. Kirisako T, Baba M, Ishihara N, Miyazawa K, Ohsumi M, et al. (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol* 147: 435-446.
93. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y (2009) Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 458-467.
94. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, et al. (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J* 19: 5720-5728.
95. Sou YS, Waguri S, Iwata J, Ueno T, Fujimura T, et al. (2008) The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice. *Mol Biol Cell* 19: 4762-4775.
96. Tanida I, Sou YS, Ezaki J, Minematsu-Ikeguchi N, Ueno T, et al. (2004) HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues and delipidates microtubule-associated protein light chain 3- and GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *J Biol Chem* 279: 36268-36276.

97. Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, et al. (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J Cell Biol* 151: 263-276.
98. Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, et al. (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* 152: 657-668.
99. Duran A, Serrano M, Leitges M, Flores JM, Picard S, et al. (2004) The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis. *Dev Cell* 6: 303-309.
100. Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, et al. (2008) The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis. *Cancer Cell* 13: 343-354.
101. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, et al. (2005) p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* 171: 603-614.
102. Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun JA, et al. (2007) p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 282: 24131-24145.
103. Copetti T, Demarchi F, Schneider C (2009) p65/RelA binds and activates the beclin 1 promoter. *Autophagy* 5: 858-859.
104. Criollo A, Chereau F, Malik SA, Niso-Santano M, Marino G, et al. (2012) Autophagy is required for the activation of NFkappaB. *Cell Cycle* 11: 194-199.
105. Jiang P, Mizushima N (2015) LC3- and p62-based biochemical methods for the analysis of autophagy progression in mammalian cells. *Methods* 75: 13-18.

106. Gittenberger-de Groot AC, DeRuiter MC, Bergwerff M, Poelmann RE (1999) Smooth muscle cell origin and its relation to heterogeneity in development and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 19: 1589-1594.
107. Hillebrands JL, Klatter FA, van den Hurk BM, Popa ER, Nieuwenhuis P, et al. (2001) Origin of neointimal endothelium and alpha-actin-positive smooth muscle cells in transplant arteriosclerosis. *J Clin Invest* 107: 1411-1422.
108. Gotlieb AI, Spector W (1981) Migration into an in vitro experimental wound: a comparison of porcine aortic endothelial and smooth muscle cells and the effect of culture irradiation. *Am J Pathol* 103: 271-282.
109. Obeso JL, Auerbach R (1984) A new microtechnique for quantitating cell movement in vitro using polystyrene bead monolayers. *J Immunol Methods* 70: 141-152.
110. Senger DR, Perruzzi CA, Streit M, Koteliansky VE, de Fougères AR, et al. (2002) The alpha(1)beta(1) and alpha(2)beta(1) integrins provide critical support for vascular endothelial growth factor signaling, endothelial cell migration, and tumor angiogenesis. *Am J Pathol* 160: 195-204.
111. Sun L, Zhao R, Zhang L, Zhang T, Xin W, et al. (2012) Salvianolic acid A inhibits PDGF-BB induced vascular smooth muscle cell migration and proliferation while does not constrain endothelial cell proliferation and nitric oxide biosynthesis. *Molecules* 17: 3333-3347.
112. Esperanca JC, Miranda WR, Netto JB, Lima FS, Baumwocel L, et al. (2015) Polymorphisms in IL-10 and INF-gamma genes are associated with early atherosclerosis in coronary but not in carotid arteries: A study of 122 autopsy cases of young adults. *BBA Clin* 3: 214-220.
113. Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ (2011) Microautophagy in mammalian cells: revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy* 7: 673-682.

114. Kung CP, Budina A, Balaburski G, Bergenstock MK, Murphy M (2011) Autophagy in tumor suppression and cancer therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 21: 71-100.
115. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, et al. (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303: 1526-1529.
116. Geer JC, Mc GH, Jr., Strong JP (1961) The fine structure of human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 38: 263-287.
117. Buck RC (1962) Lesions in the rabbit aorta produced by feeding a high cholesterol diet followed by a normal diet. An electron microscopic study. *Br J Exp Pathol* 43: 236-240.
118. Parker F, Odland GF (1966) A light microscopic, histochemical and electron microscopic study of experimental atherosclerosis in rabbit coronary artery and a comparison with rabbit aorta atherosclerosis. *Am J Pathol* 48: 451-481.
119. Goldfischer S, Schiller B, Wolinsky H (1975) Lipid accumulation in smooth muscle cell lysosomes in primate atherosclerosis. *Am J Pathol* 78: 497-504.
120. Kockx MM, De Meyer GR, Buysens N, Knaapen MW, Bult H, et al. (1998) Cell composition, replication, and apoptosis in atherosclerotic plaques after 6 months of cholesterol withdrawal. *Circ Res* 83: 378-387.
121. Jia G, Cheng G, Gangahar DM, Agrawal DK (2006) Insulin-like growth factor-1 and TNF-alpha regulate autophagy through c-jun N-terminal kinase and Akt pathways in human atherosclerotic vascular smooth cells. *Immunol Cell Biol* 84: 448-454.
122. Panigada M, Porcellini S, Sutti F, Doneda L, Pozzoli O, et al. (1999) GKLF in thymus epithelium as a developmentally regulated element of thymocyte-stroma cross-talk. *Mech Dev* 81: 103-113.

123. Torres G, Morales PE, Garcia-Miguel M, Norambuena-Soto I, Cartes-Saavedra B, et al. (2016) Glucagon-like peptide-1 inhibits vascular smooth muscle cell dedifferentiation through mitochondrial dynamics regulation. *Biochem Pharmacol* 104: 52-61.
124. Jiang F, Jiang R, Zhu X, Zhang X, Zhan Z (2013) Genipin inhibits TNF- α -induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration via induction of HO-1. *PLoS One* 8: e74826.
125. Hoshi S, Goto M, Koyama N, Nomoto K, Tanaka H (2000) Regulation of vascular smooth muscle cell proliferation by nuclear factor- κ B and its inhibitor, I- κ B. *J Biol Chem* 275: 883-889.
126. Berridge MV, Tan AS (1993) Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303: 474-482.
127. van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J (2011) Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol* 731: 237-245.
128. Sharifi MN, Mowers EE, Drake LE, Collier C, Chen H, et al. (2016) Autophagy Promotes Focal Adhesion Disassembly and Cell Motility of Metastatic Tumor Cells through the Direct Interaction of Paxillin with LC3. *Cell Rep* 15: 1660-1672.
129. Li H, Li J, Li Y, Singh P, Cao L, et al. (2012) Sonic hedgehog promotes autophagy of vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 303: H1319-1331.
130. Grootaert MO, da Costa Martins PA, Bitsch N, Pintelon I, De Meyer GR, et al. (2015) Defective autophagy in vascular smooth muscle cells accelerates senescence and promotes neointima formation and atherogenesis. *Autophagy* 11: 2014-2032.

131. Chen X, Johns DC, Geiman DE, Marban E, Dang DT, et al. (2001) Kruppel-like factor 4 (gut-enriched Kruppel-like factor) inhibits cell proliferation by blocking G1/S progression of the cell cycle. *J Biol Chem* 276: 30423-30428.
132. Gimbrone MA, Jr., Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G (2000) Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 902: 230-239; discussion 239-240.
133. Berk BC, Abe JI, Min W, Surapisitchat J, Yan C (2001) Endothelial atheroprotective and anti-inflammatory mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 947: 93-109; discussion 109-111.
134. Feinberg MW, Cao Z, Wara AK, Lebedeva MA, Senbanerjee S, et al. (2005) Kruppel-like factor 4 is a mediator of proinflammatory signaling in macrophages. *J Biol Chem* 280: 38247-38258.
135. Riz I, Hawley TS, Hawley RG (2015) KLF4-SQSTM1/p62-associated prosurvival autophagy contributes to carfilzomib resistance in multiple myeloma models. *Oncotarget* 6: 14814-14831.
136. Kim YC, Guan KL (2015) mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J Clin Invest* 125: 25-32.
137. Zhou X, Li C, Lu X (2013) Autophagy activation by rapamycin improves left ventricular function in diabetic rats. *Int J Cardiol* 168: 4429-4431.
138. Marx SO, Jayaraman T, Go LO, Marks AR (1995) Rapamycin-FKBP inhibits cell cycle regulators of proliferation in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 76: 412-417.
139. Poon M, Marx SO, Gallo R, Badimon JJ, Taubman MB, et al. (1996) Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration. *J Clin Invest* 98: 2277-2283.
140. Gallo R, Padurean A, Jayaraman T, Marx S, Roque M, et al. (1999) Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine

- coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle. *Circulation* 99: 2164-2170.
141. Serruys PW, Regar E, Carter AJ (2002) Rapamycin eluting stent: the onset of a new era in interventional cardiology. *Heart* 87: 305-307.
 142. Martin KA, Merenick BL, Ding M, Fetalvero KM, Rzucidlo EM, et al. (2007) Rapamycin promotes vascular smooth muscle cell differentiation through insulin receptor substrate-1/phosphatidylinositol 3-kinase/Akt2 feedback signaling. *J Biol Chem* 282: 36112-36120.
 143. Martin KA, Rzucidlo EM, Merenick BL, Fingar DC, Brown DJ, et al. (2004) The mTOR/p70 S6K1 pathway regulates vascular smooth muscle cell differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 286: C507-517.
 144. Cho Y, Yang HM, Park KW, Chung WY, Choi DJ, et al. (2010) Paclitaxel-versus sirolimus-eluting stents for treatment of ST-segment elevation myocardial infarction: with analyses for diabetic and nondiabetic subpopulation. *JACC Cardiovasc Interv* 3: 498-506.
 145. Wessely R, Kastrati A, Mehilli J, Dibra A, Pache J, et al. (2007) Randomized trial of rapamycin- and paclitaxel-eluting stents with identical biodegradable polymeric coating and design. *Eur Heart J* 28: 2720-2725.
 146. Salabei JK, Balakumaran A, Frey JC, Boor PJ, Treinen-Moslen M, et al. (2012) Verapamil stereoisomers induce antiproliferative effects in vascular smooth muscle cells via autophagy. *Toxicol Appl Pharmacol* 262: 265-272.
 147. Wang X, Zou Y, Sun A, Xu D, Niu Y, et al. (2007) Emodin induces growth arrest and death of human vascular smooth muscle cells through reactive oxygen species and p53. *J Cardiovasc Pharmacol* 49: 253-260.
 148. Li BH, Liao SQ, Yin YW, Long CY, Guo L, et al. (2015) Telmisartan-induced PPARgamma activity attenuates lipid accumulation in VSMCs via induction of autophagy. *Mol Biol Rep* 42: 179-186.

149. Liu D, Cui W, Liu B, Hu H, Liu J, et al. (2014) Atorvastatin protects vascular smooth muscle cells from TGF-beta1-stimulated calcification by inducing autophagy via suppression of the beta-catenin pathway. *Cell Physiol Biochem* 33: 129-141.
150. Kalliolias GD, Ivashkiv LB (2016) TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol* 12: 49-62.
151. Csiszar A, Sosnowska D, Wang M, Lakatta EG, Sonntag WE, et al. (2012) Age-associated proinflammatory secretory phenotype in vascular smooth muscle cells from the non-human primate *Macaca mulatta*: reversal by resveratrol treatment. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 67: 811-820.
152. Wang LJ, Huang HY, Huang MP, Liou W, Chang YT, et al. (2014) The microtubule-associated protein EB1 links AIM2 inflammasomes with autophagy-dependent secretion. *J Biol Chem* 289: 29322-29333.
153. Ohman T, Teirila L, Lahesmaa-Korpinen AM, Cypryk W, Veckman V, et al. (2014) Dectin-1 pathway activates robust autophagy-dependent unconventional protein secretion in human macrophages. *J Immunol* 192: 5952-5962.
154. Komaki Y, Komaki F, Sakuraba A, Cohen R (2016) Approach to Optimize Anti-TNF-alpha Therapy in Patients With IBD. *Curr Treat Options Gastroenterol* 14: 83-90.
155. Yamauchi PS, Bissonnette R, Teixeira HD, Valdecantos WC (2016) Systematic review of efficacy of anti-tumor necrosis factor (TNF) therapy in patients with psoriasis previously treated with a different anti-TNF agent. *J Am Acad Dermatol*.
156. Chung ES, Packer M, Lo KH, Fasanmade AA, Willerson JT (2003) Randomized, double-blind, placebo-controlled, pilot trial of infliximab, a chimeric monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha, in patients with moderate-to-severe heart failure: results of the anti-TNF Therapy

- Against Congestive Heart Failure (ATTACH) trial. *Circulation* 107: 3133-3140.
157. Mann DL, McMurray JJ, Packer M, Swedberg K, Borer JS, et al. (2004) Targeted anticytokine therapy in patients with chronic heart failure: results of the Randomized Etanercept Worldwide Evaluation (RENEWAL). *Circulation* 109: 1594-1602.
158. Jacobsson LT, Turesson C, Gulfe A, Kapetanovic MC, Petersson IF, et al. (2005) Treatment with tumor necrosis factor blockers is associated with a lower incidence of first cardiovascular events in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 32: 1213-1218.
159. Wolfe F, Michaud K (2004) Heart failure in rheumatoid arthritis: rates, predictors, and the effect of anti-tumor necrosis factor therapy. *Am J Med* 116: 305-311.
160. Long L, Yang X, Southwood M, Lu J, Marciniak SJ, et al. (2013) Chloroquine prevents progression of experimental pulmonary hypertension via inhibition of autophagy and lysosomal bone morphogenetic protein type II receptor degradation. *Circ Res* 112: 1159-1170.