

Estudio de las vías de señalización implicadas en la sobrexpresión de la proteína Hemooxigenasa-1 en Células Endoteliales Progenitoras estimuladas con secretoma aterosclerótico



Departamento de Biomedicina, Biotecnología y
Salud Pública

José Ángel Alonso Piñeiro

Tutores:

Francisco García Cózar

M.^a Carmen Durán Ruiz

Cádiz, marzo de 2022

Fuente imagen de portada: ESA

https://www.esa.int/ESA_Multimedia/Images/2019/11/Endothelial_cells



Escuela de Doctorado de la Universidad de Cádiz (EDUCA)

Hospital Real**Oficina de Posgrado, Universidad de Cádiz****Plaza Falla, 8- 11002 Cádiz****ANEXO II**

**MODELO DE INFORME FAVORABLE DEL DIRECTOR DE LA TESIS PARA
EL DEPÓSITO DE TESIS DOCTORALES DESARROLLADAS DE ACUERDO
CON EL REAL DECRETO 99/2011, DE 28 DE ENERO**

Los doctores D. Francisco J. García Cózar y la Dra. M.^a Carmen Durán Ruiz, profesores del departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública y directores de la tesis doctoral de D. Jose Ángel Alonso Piñero, alumno del programa de doctorado de Biomoléculas, regulado por el Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, informan favorablemente la solicitud de autorización para el depósito de la tesis doctoral de D Jose Ángel Alonso Piñero, titulado:

“Estudio de las vías de señalización implicadas en la sobreexpresión de la proteína Hemooxigenasa-1 en Células Endoteliales Progenitoras estimuladas con secretoma aterosclerótico”. Este trabajo de investigación se ha desarrollado de acuerdo con los requisitos de control de calidad para las tesis doctorales recogidos en la memoria del programa de doctorado de referencia, y cumple los requisitos necesarios para ser presentado y defendido como tesis doctoral.

En Cádiz, a 4 de marzo de 2022

Firmado: Francisco J. García Cózar

Firmado: M.^a Carmen Durán Ruiz

CSV (Código de Verificación Segura)	IV7CY6XS2E446X4IA5VGMEJF74	Fecha	03/03/2022 19:02:55	
Normativa	Este documento incorpora firma electrónica reconocida de acuerdo a la ley 6/2020, de 11 de noviembre, reguladora de determinados aspectos de los servicios electrónicos de confianza	Validez del documento	Original	
Firmado por	FRANCISCO JOSE GARCIA COZAR			
Firmado por	MARIA DEL CARMEN DURAN RUIZ			
Url de verificación	https://sede.uca.es/verifirma/code/IV7CY6XS2E446X4IA5VGMEJF74	Página	1/1	

Dedicación

Dedicado a mi familia que tanto me ha apoyado. Y a todos aquellos que se han ido desde que empecé. Aunque nos hayáis dejado siempre estaréis con nosotros.

«Decía Bernardo de Chartres que somos como enanos a los hombros de gigantes. Podemos ver más, y más lejos que ellos, no por la agudeza de nuestra vista ni por la altura de nuestro cuerpo, sino porque somos levantados por su gran altura.»

«Metalogicon», Juan de Salisbury s XII

Son tantas las personas a las que tengo que dar las gracias, por tanto, y tan poco el espacio para hacerlo, que seguro me dejaré a algunas fuera. Espero que me perdonen.

En primer lugar, quisiera dar las gracias a mi tutor y director Curro por permitirme trabajar con él y por sus correcciones. Y muy especialmente a mi directora Carmen, sin la cual este trabajo no habría salido adelante. Carmen, muchas gracias por tu paciencia, tus enseñanzas y tu cariño. Tu pasión por el trabajo es contagiosa.

A Sara, mi compañera de Western, por los ratos que hemos echado entre lavado y lavado, las charlas y los buenos momentos. A Lucía, Marta y M.^a Jesús, mis compis de doctorado por vuestra ayuda, interés, comentarios y consejos. A Ismael, Antonio, Marga y Almudena, por todo lo que me habéis ayudado y enseñado. En general a todo el grupo de “Terapia Regenerativa Cardiovascular y proteómica aplicada” mi segunda familia de estos años, nunca olvidaré esos almuerzos y reuniones tan agradables, ni los buenos momentos que hemos vivido. Ha sido un gustazo trabajar con vosotros.

A los miembros de los grupos de Quique y Curro: Quique, Curro, Juanpe, Miquel, Lucía, Isaac e Inma. Siempre dispuestos a ayudar y con quienes aprendí lo bien que puede sentar una charla de un par de minutos en el pasillo en un día duro de trabajo.

A todo el grupo de Farma, mis compis del 81; a los técnicos de los SSCC, especialmente a Fernando y Chelo; y en general a toda la 3^a planta. Donde siempre encontré a alguien dispuesto a echar una mano en lo que haga falta.

Por último, quiero dar las gracias a mis amigos y sobre todo a mi familia por su inconmensurable apoyo. A mis padres políticos y biológicos y a mi hermano, en un mundo donde la conciliación familiar es una utopía no se puede trabajar sin ellos. A mis cuñados y sobrinos, cuya curiosidad también me motiva a avanzar. A mi mujer, que no ha dejado de apoyarme ni un solo momento y que siempre me ha empujado hacia delante. No pude escoger mejor compañera de vida. Y, por último, pero no por ello menos importante a mis hijos, no hay dolor ni tristeza que una abrazo suyo no pueda curar.

Muchas gracias a todos, sin vosotros no lo hubiera conseguido.

Contenido

ABREVIATURAS	9
RESUMEN	12
SUMMARY	13
1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. Aterosclerosis	16
<u>1.1.1. Anatomía de la arteria</u>	17
<u>1.1.2. Evolución de la aterosclerosis</u>	18
1.2. Estrés oxidativo	30
<u>1.2.1. Sistemas de defensa ROS</u>	32
<u>1.2.2. Aterosclerosis y estrés oxidativo: rutas metabólicas</u>	33
1.3. Tratamientos actuales	40
<u>1.3.1. Tratamientos farmacológicos</u>	40
<u>1.3.2. Cirugía</u>	43
<u>1.3.3. Terapias dirigidas a reducir el estrés oxidativo. Modulación de los niveles de HMOX1</u>	44
<u>1.3.4. Terapia celular angiogénica</u>	45
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	49
3. MATERIALES Y METODOS.....	51
3.1. Obtención de las muestras biológicas	51
<u>3.1.1. Obtención de los sobrenadantes arteriales</u>	51
<u>3.1.2. Obtención de las EPC</u>	52
<u>3.1.3. Caracterización de las EPC</u>	54
<u>3.1.4. Incubación de EPCs con secretomas arteriales ateroscleróticos y no ateroscleróticos</u>	55
<u>3.1.5. Incubación de las EPCs con secretomas ateroscleróticos a distintas concentraciones y distintos tiempos</u>	56
3.2. Análisis de expresión génica	57
<u>3.2.1. Extracción y purificación del ARN total</u>	58
<u>3.2.3. PCR cuantitativa o a tiempo real (RT-qPCR)</u>	59
3.3. Análisis de expresión proteica	66
<u>3.3.1. Fraccionamiento</u>	66
<u>3.3.2. Western Blot</u>	67
3.4. Análisis de los niveles de ROS	69
<u>3.4.1. Cultivo celular para el ensayo ROS</u>	69

3.4.2. Ensayo de ROS	70
3.5. Análisis estadístico	70
3.5.1. RT-qPCR: Normalización de los resultados y análisis estadístico	70
3.5.2. Western Blot: Análisis estadístico	71
3.5.3. Ensayo de ROS	71
4. RESULTADOS	72
4.1. Caracterización de las EPC	72
4.2. Cambios de expresión génica en EPCs en respuesta al tratamiento con sobrenadantes ateroscleróticos	73
4.2.1. Pasos previos al análisis de expresión génica. Selección de cebadores y eficiencia	75
4.2.2. Pasos previos al análisis de expresión génica. Concentración de RNA	76
4.2.3. Evaluación de los cambios de expresión génica en EPCs en respuesta a secretomas ateroscleróticos y arterias mamarias no ateroscleróticas.	78
4.2.4. Evaluación de los cambios de expresión génica en EPCs en respuesta a secretomas ateroscleróticos a distintas concentraciones y tiempos	79
4.3. Evaluación de los cambios de expresión proteica en EPCs en respuesta a secretomas ateroscleróticos a distintas concentraciones y tiempos	84
4.4. Estudio de la translocación de proteínas citosólicas al núcleo como respuesta de las EPCs al tratamiento con secretomas ateroscleróticos a distintas concentraciones y tiempos	87
4.5. Ensayo de ROS	88
5. DISCUSIÓN	89
5.1. Evaluación de los cambios de expresión génica en EPCs en respuesta a secretomas ateroscleróticos y arterias mamarias no ateroscleróticas.	89
5.2. Evaluación de los cambios de expresión en EPCs en respuesta a secretomas ateroscleróticos a distintas concentraciones y tiempos para NRF2, HSF1 y HMOX1.	92
5.3. Evaluación de los cambios de expresión en EPCs en respuesta a secretomas ateroscleróticos a distintas concentraciones y tiempos para NQO1, GCLC y GCLM.	96
5.4. Evaluación de los cambios de expresión en EPCs en respuesta a secretomas ateroscleróticos a distintas concentraciones y tiempos para proteínas dependientes de la expresión de HMOX1: Ferritina (FHC), Biliverdin-reductasa A (BLVR-A) y B (BLVR-B).	97
5.5. Ensayo de ROS	98
5.6. Limitaciones y perspectivas futuras	98
6. CONCLUSIONES	101
7. BIBLIOGRAFÍA	103

ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$: Oxígeno singlete

aa: aminoácidos

AC: Accidentes cerebrovasculares

ACAT1: Acetil Coa Acetiltransferasa 1

Ac-LDL: Lipoproteína de baja densidad acetilada

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADNasa: ADN nucleasa

AMPK: Proteína quinasa activada por 5'-AMP (del inglés AMP-activated protein kinase)

AP: Placa aterosclerótica

AP-1: Proteína activadora 1 (del inglés Activating protein-1)

ARE: Elementos de respuesta antioxidante

ARN: Ácido ribonucleico

ARNasa: ARN nucleasa

ATF1: Factor de transcripción de activación dependiente del hemo 1 (del inglés Activating Transcription Factor 1)

BCH1: Homologo BTB y CNC 1

BSA: Albumina de suero bovino

BVR: Biliverdin reductasa

CAC: Células angiogénicas circulantes

CAT: Catalasa

CNC: Cap'n'Collar

CO: Monóxido de carbono

Ct: Ciclo umbral (Threshold Cycle)

DCF: 2',7'-diclorofluoresceína

Dil: Perclorato de dioctadecil-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina

DMSO: Dimetilsulfóxido

EC: Células endoteliales (del inglés, endothelial cells)

ECFC: Células endoteliales formadoras de colonias (del inglés, endothelial colony forming cells).

ECV: Enfermedades cardiovasculares

eEPC: EPC tempranas

EIC: Enfermedades isquémicas cardiacas

eNOS: Óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS).

EPC: Células endoteliales progenitoras (del inglés Endothelial progenitor cells)

FBS: Suero fetal bovino

FHC: Cadena pesada de la ferritina

FITC: Isotiocianato de 5/6-fluoresceína

GCL: Glutamato-cisteína ligasa

GCLC: Glutamato-cisteína ligasa catalítica

GCLM: Glutamato-cisteína ligasa modificadora

GPX: Glutación peroxidasa

GSH: Glutación reducido

GSSG: Glutación disulfuro

H2DCFDA: Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína

H₂O₂: Peróxido de hidrógeno

hESC-Pg: Células progenitoras cardiovasculares derivadas de células madre embrionarias humanas

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

HMOX1: Hemoxigenasa-1

HSF1: Factor de transcripción de choque térmico

HSS: Alta tensión de cizallamiento

IFN γ : Interferón gamma

IL: Interleucina

KEAP1: Proteína 1 asociada a la ECH similar a Kelch

LDL: Lípidos de baja densidad

LDLox: LDL oxidada

LOX-1: Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1

LPS: Lipopolisacárido

LSS: Baja tensión de cizallamiento

LTA: Ácido lipoteicoico

MA: Arteria mamaria

MAC: Células angiogénicas mieloides (del inglés myeloid angiogenic cells)

MMP: Metaloproteinasas de matriz

MP: Mieloperoxidasas

MSC: Células madre mesenquimales

NF- κ B: Factor nuclear kappa beta

NO: Óxido nítrico

NOS: NADPH oxidasa

NQO1: NAD(P)H quinina oxidoreductasa 1
NRF2: Factor nuclear derivado de eritroide 2 similar al 2
O₂: Oxígeno molecular
O₂⁻: Radical superóxido
O₂²⁻: Ion peroxilo
OH·: Radical hidroxilo
Pb: Pares de bases
PBMC: Células mononucleares de sangre periférica
PBS: Tampón fosfato salino
PPAR: Receptores activados por proliferadores peroxisómicos
RNS: Especies reactivas de nitrógeno
ROO·: Hidroperóxidos
ROS: Especies reactivas de oxígeno
RT-qPCR: Reacción de la polimerasa en tiempo real (cuantitativa)
sMAF: Proteína pequeña fibrosarcoma musculoaponeurótico
SMCs: Células musculares lisas
SO₂H: Ácido sulfínico
SO₃H: Ácido sulfónico
SOD: Superóxido dismutasa
SOH: Ácido sulfénico
TBST: Tris buffer salino con Tween
TGF-β: Factor de crecimiento transformante-β
TLR: Receptores similares a toll
T_m: Temperatura de fusión
TNF-α: Factor de necrosis tumoral-alfa
Trx: Tiorredoxinas
UEA1: Aglutinina de Ulex europaeus 1 (Lectina)
VCAM-1: Molécula 1 de adhesión celular vascular
VSMC: Células del músculo liso vascular
XO: Xantina oxidasa

RESUMEN

Las enfermedades cardiovasculares siguen siendo una de las principales causas de muerte en el mundo. La etiología subyacente a estas enfermedades es la aterosclerosis, que conlleva un proceso inflamatorio exacerbado que afecta a la pared arterial. La aterosclerosis comienza con la activación las células endoteliales que recubren el interior de la arteria debido a diversos factores físico-químicos y mayoritariamente en respuesta a estrés oxidativo. Esto hace que el endotelio sea más permeable al paso de ciertas sustancias como lipoproteínas de baja densidad (LDL) que se oxida en su interior (LDLox) y a ciertos tipos celulares como los macrófagos, que fagocitan las LDLox convirtiéndose en células espumosas, que pierden su movilidad y que liberan citoquinas quimioatrayentes que reclutan más células a la zona de lesión. Con el avance de la enfermedad, entran en juego la necrosis o la calcificación, pudiendo producirse la ruptura de la placa obstruyendo el vaso, o formando un trombo que cause necrosis en otras zonas periféricas.

En la actualidad no ha hay ningún tratamiento que consiga remitir el proceso aterosclerótico y devolver el tejido a su estado inicial, únicamente tratamientos farmacológicos que frenan el avance de la lesión, así como cirugías de revascularización, amputaciones, etc. Existen diversas terapias en estudio que implican el uso de activadores farmacológicos de proteínas antiinflamatorias y antioxidantes como HMOX1. Es de especial interés el uso de terapias celulares que implicarían el uso de células endoteliales progenitoras (EPC) del propio paciente.

En trabajos previos del grupo, se estudió la expresión diferencial de EPCs en respuesta a la incubación directa con los secretomas procedentes de arterias ateroscleróticas frente a arterias no-ateroscleróticas, encontrando variaciones de ciertas proteínas, entre ellas la sobreexpresión de HMOX1. De acuerdo con estos resultados, en el presente trabajo de Tesis se ha analizado más en profundidad el efecto de factores ateroscleróticos sobre los niveles de HMOX1, así como otras proteínas relacionadas en EPCs, dado su potencial interés como agente antiaterosclerótico. Para ello se ha estudiado la ruta de señalización de HMOX1 desde un doble enfoque, proteómico y génico.

En ambos enfoques, se han encontrado cambios en la expresión y la regulación de las proteínas y genes implicados en la ruta de señalización dependientes del tiempo y las concentraciones de incubación.

SUMMARY

Cardiovascular diseases remain one of the main causes of death worldwide. In this sense, atherosclerosis constitutes the common factor in all these diseases, a chronic inflammatory disease that affects the arterial walls by formation and deposition of atherosclerotic plaques over the inner walls of vascular vessels. In response to certain agents, including oxidative stress, the endothelial layer of the inner walls becomes activated. For instance, oxidation of low-density lipoproteins (ox-LDL) induces endothelial dysfunction, foam cell activation, and inflammatory response, resulting in the formation of fatty streaks in the atherosclerotic wall.

The deposition of lipid-rich cell debris within the damaged area takes place as result of apoptosis of foam cells and immune cells, building-up the “necrotic core. In the worst scenario, plaque rupture is responsible of partial or total blockade of the arterial lumen, what promotes thrombotic events as well as myocardial infarction and or strokes.

There are no current treatments capable to revert the atherosclerotic process, while the pharmacological treatments available are used to control cholesterol deposition and other factors in an attempt to stop the disease progression. Alternatively, surgical removal of atherosclerotic lesions is not an option for many patients due to related comorbidities. To date, the application of therapies targeting anti-inflammatory and antioxidant agents such as HMOX1 constitute a promising approach. Moreover, the combination of such therapies with cell therapies based on the administration of endothelial progenitor cells (EPCs) to promote revascularization might help to recover the damaged endothelium.

Previously, the research group in which this PhD project was carried out, evaluated the response of EPCs to the direct incubation with the secretome of atherosclerotic arteries and non-atherosclerotic arteries, identifying several proteins altered in EPCs after this treatment, including up-regulation of HMOX1. Based on these preliminary results, in the current PhD project we have further analyzed the effect of atherosclerotic factors over the expression of HMOX1 and other related proteins in healthy EPCs, given its anti-atherosclerotic role. Thus, several proteins related to HMOX1 signaling pathway have been evaluated at both, proteomic and genomic level. The results have reported time-dose dependent expression changes in EPCs.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) continúan siendo la principal causa de muerte a nivel mundial. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estimó el número de muertes por ECV en 2019 en 17,9 millones de personas [1, 2].

El término ECV engloba distintas afecciones:

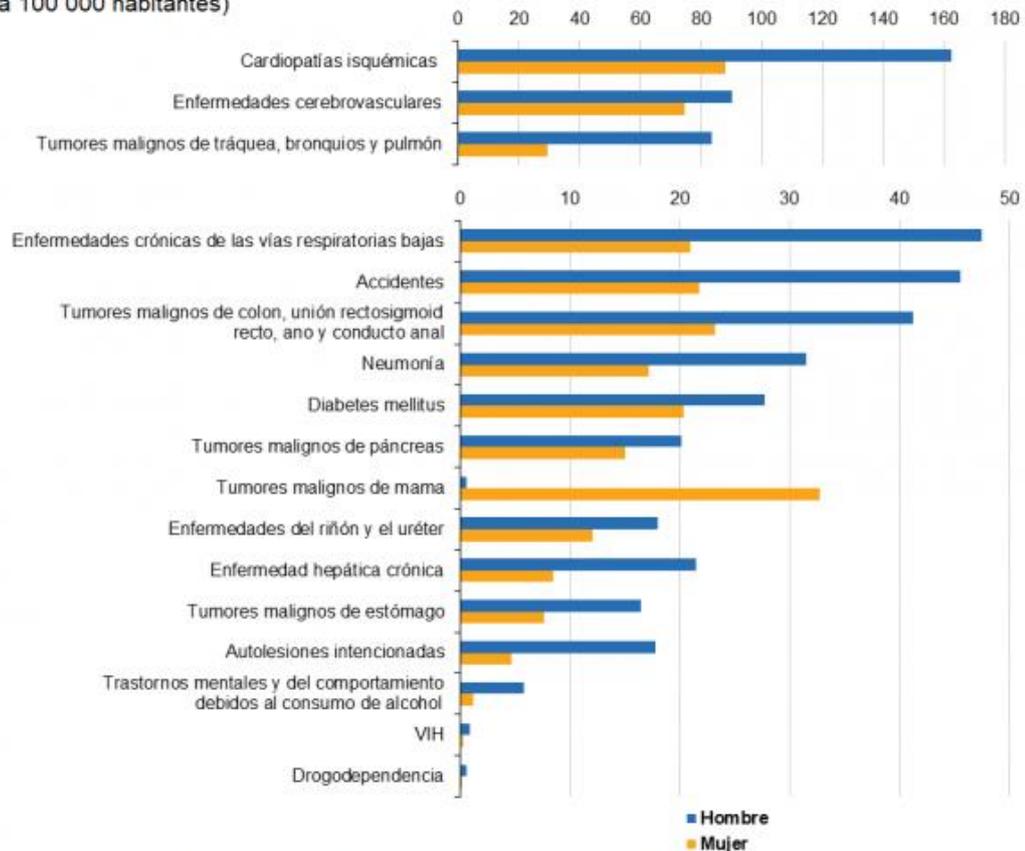
- Enfermedad cardíaca coronaria o cardiopatía isquémica: Afección que consiste en el bloqueo de las arterias coronarias, encargadas del suministro de sangre al corazón, causando la muerte de parte del tejido cuando este corte es lo suficientemente largo [1, 3].
- Enfermedad cerebrovascular: Consiste en el bloqueo de los vasos sanguíneos en el cerebro produciendo que se detenga el flujo sanguíneo a la cabeza. Si el bloqueo dura demasiado tiempo, provoca la muerte de las neuronas y un daño permanente [1, 3].
- Enfermedad arterial periférica: En este caso la oclusión ocurre en las arterias que irrigan de sangre las extremidades, brazos y piernas [1, 3, 4].
- Trombosis venosa profunda y embolia pulmonar: Es la formación de un coágulo de sangre en las venas de las piernas, que pueden desprenderse y trasladarse al corazón y los pulmones [1, 5].
- Enfermedad cardíaca reumática: Es una afección que aparece por la fiebre reumática causada por bacterias estreptocócicas. Puede provocar daño en las válvulas cardíacas [1].
- Cardiopatía congénita: Distintos tipos de defectos o malformaciones del corazón con origen congénitos que afectan el desarrollo y a su funcionamiento normales del corazón [1].

De estas enfermedades, tan sólo la enfermedad cardíaca coronaria y los accidentes cerebrovasculares supusieron el 89 % de las muertes por ECV en el mundo en 2019 [1]. Según el Eurostat, en 2016 hubo una media de 119,4 muertes por cada 100.000 habitantes debido a

cardiopatías isquémicas y 81,1 muertes por cada 100.000 habitantes debido a enfermedades cerebrovasculares. En ambos casos la incidencia fue mayor en hombres que en mujeres (Tabla 1) [6].

Causas de muerte — tasa de mortalidad normalizada, EU-27, 2016

(por cada 100 000 habitantes)



Nota: la cifra se clasifica en función de la media entre hombres y mujeres. Obsérvese la diferencia en las escalas utilizadas en las dos partes del gráfico.

Fuente: Eurostat (código de datos en línea: hlth_cd_asdr2)

eurostat

Figura 1. Causas de muerte por cada 100.000 habitantes en la Unión Europea de los 27 en 2016 [6].

En España las estadísticas son un poco distintas. Según el Instituto Nacional de Estadística (INE), en 2018 las enfermedades isquémicas del corazón y las cerebrovasculares supusieron las primeras causas de muerte (Tabla 1). Si tenemos en cuenta el género, las enfermedades cerebrovasculares ocupan el tercer puesto en hombres, desplazadas por el cáncer de bronquios y pulmón [7].

Tabla 1. Número de defunciones en función de la causa más frecuente en España en el año 2018 [7].**Defunciones según las causas de muerte más frecuentes¹. Año 2018**

	Total	Hombres	Mujeres
Total enfermedades	427.721	216.442	211.279
Enfermedades isquémicas del corazón	31.152	18.423	12.729
Enfermedades cerebrovasculares	26.420	11.435	14.985
Cáncer de bronquios y pulmón	22.133	17.181	4.952
Demencia	21.629	7.144	14.485
Insuficiencia cardiaca	19.142	7.266	11.876
Enfermedad de Alzheimer	14.929	4.454	10.475
Enf. crónicas de las vías respiratorias inferiores (ECVRI)	14.607	10.594	4.013
Enfermedad hipertensiva	12.496	4.108	8.388
Cáncer de colon	11.265	6.690	4.575
Neumonía	10.415	5.430	4.985
Diabetes mellitus	9.921	4.407	5.514
Cáncer de páncreas	7.132	3.299	3.833
Insuficiencia renal	7.120	3.745	3.375
Cáncer de mama	6.621	87	6.534
Cáncer de próstata	5.841	5.841	0

¹ Causas con peso relativo superior al 1,4%.

El impacto económico que estas dolencias ocasionan en la Unión Europea se ha estimado en 59.000 millones de euros al año, en el caso de las enfermedades isquémicas cardíacas (EIC), y de 45.000 millones para los accidentes cerebrovasculares (AC). Estas cifras incluyen tanto los costes médicos directos como hospitalizaciones, medicación, etc. (32% para EIC y 44% para AC); pérdidas de productividad asociadas a la mortalidad y a la morbilidad (33% para EIC y 22% para AC) y otros gastos médicos asociados (35 % para las EIC y AC) [8].

1.1. Aterosclerosis

La principal etiología subyacente a las enfermedades cardiovasculares es la aterosclerosis. Se conoce como aterosclerosis a la inflamación crónica de las arterias de tamaño medio y grande, provocada por la acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), células del sistema inmune y restos necróticos en su capa íntima, en el espacio subendotelial. La acumulación de todos estos elementos causa una deformación del tejido, que acaba originando

una placa de ateroma (Figura 2). Dependiendo de la evolución de la enfermedad, la placa de ateroma puede terminar generando la oclusión parcial de la arteria, o el bloqueo total de la misma, desencadenando eventos trombóticos [9]. Esta afección se suele asociar a un estado de elevado estrés oxidativo [10].

1.1.1. Anatomía de la arteria

Antes de hablar de la aterosclerosis, de su comienzo y evolución, resulta necesario describir brevemente la anatomía de las arterias para poder comprender mejor en que consiste el proceso aterosclerótico (Figura 2). Las arterias están compuestas por tres capas distintas: la túnica íntima, la túnica media y la túnica adventicia.

La *túnica íntima*, es la capa más interna, constituida por una monocapa de células endoteliales (EC, del inglés endothelial cell), que se encuentra unida a la membrana basal, una capa de matriz extracelular, mediante moléculas de adhesión. Esta matriz es una mezcla de proteínas, proteoglicanos y glucoproteínas. Esta capa funciona como un soporte estructural, como una barrera física y media en las interacciones celulares. Algunas de las macromoléculas que conforman la matriz extracelular tienen la capacidad de retener lipoproteínas, facilitando su acumulación. La monocapa de EC ayuda a mantener la homeostasis del tejido, así como el tono vascular [10-12].

Capa media o túnica media. En la túnica media encontramos un tejido formado principalmente por células del músculo liso vascular (Vascular Smooth Muscle Cell, VSMC) y matriz extracelular. Las VSMC se encargan de mediar en la relajación-constricción del vaso (VSMC contráctiles) y secretar matriz extracelular (VSMC secretoras) [10-12]. Entre la túnica media y la íntima se ubica la lámina elástica interna, compuesta de 79% de elastina, 17% de colágeno y un 3,9 % de proteínas solubles (es un tipo de matriz extracelular diferenciada del resto) [11, 13].

Túnica adventicia. Separada de la anterior por la lámina elástica externa. Esta última capa está compuesta principalmente por tejido conectivo, tejido adiposo vascular y distintos tipos de células como fibroblastos (el tipo celular más abundante), macrófagos, linfocitos o células dendríticas. Participa en la respuesta inflamatoria, inmunoinflamatoria, mantenimiento de tono vascular etc. En esta capa se encuentra el *vasa vasorum*, una red de pequeños vasos

que suministran nutrientes y retira los desechos a las partes más exteriores de la túnica media y a la propia adventicia, las terminaciones nerviosas y los vasos linfáticos [10-12].

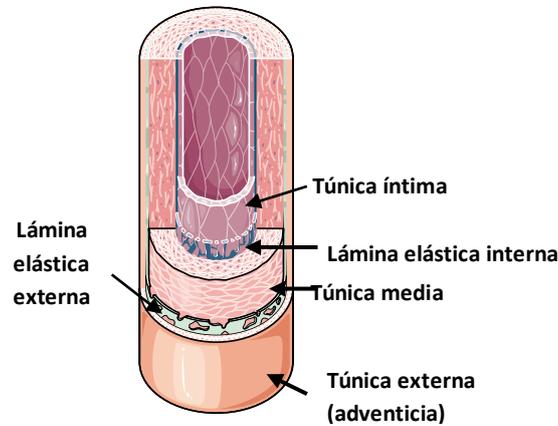


Figura 2. Anatomía de una arteria sana.

1.1.2. Evolución de la aterosclerosis

1.1.2.1. Formación de la placa

El endotelio juega un papel determinante en las etapas iniciales de la aterosclerosis. En condiciones normales, el endotelio se encarga de controlar el tono vascular, el crecimiento y la estructura del vaso. Además, mantiene la homeostasis del tejido y tiene propiedades antiinflamatorias, anticoagulantes, antiplaquetaria y fibrinolíticas [2, 14]. El tono vascular es regulado por el endotelio mediante la liberación de distintas sustancias como el óxido nítrico (NO), la bradiquinina, la prostaciclina, la endotelina o la angiotensina II. El NO, la bradiquinina y la prostaciclina son vasodilatadores y están implicados en la inhibición de la agregación plaquetaria. El NO tiene actividad anti aterosclerótica al inhibir la oxidación de la LDL, y se relaciona con la inhibición de la adhesión de los leucocitos y de su infiltración. La bradiquinina también está implicada en la fibrinólisis impidiendo que se formen coágulos. Por otro lado, la endotelina o la angiotensina II actúan como vasoconstrictores y tienen propiedades proliferativas sobre las VSMC. En condiciones normales existe un equilibrio entre estos factores antagonísticos [14, 15].

Debido a diversos factores físico-químicos, la capacidad del endotelio de regular la dilatación vascular puede verse comprometida. Esto está muy relacionado con la disminución de la disponibilidad de NO. La pérdida de la capacidad de mantener el equilibrio entre los compuestos antagonistas antes mencionados se conoce como disfunción endotelial. Cuando se produce esta disfunción, el endotelio se vuelve más permeable a la entrada de ciertas sustancias y tipos celulares, y libera diversas moléculas de adhesión y proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) o la interleucina 6 (IL-6) [15, 16].

El endotelio es muy sensible a ciertas moléculas que pueden causar su apoptosis. Tal es el caso de la presencia de altos niveles de glucosa, de forma directa, o bien a través de la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y otras sustancias como la LDL oxidada (LDL_{ox}) o la citoquina proinflamatoria TNF- α [17–22].

En cuanto a los factores físicos responsables de la disfunción, se encuentran el tipo de flujo sanguíneo al que se ven expuestas las EC y la tensión. Un flujo laminar ejerce una fuerza tangencial denominada tensión de cizallamiento (Figura 3). Una alta tensión de cizallamiento (HSS por sus siglas en inglés) tiene un efecto protector frente a la apoptosis de las EC, modulando ciertas rutas metabólicas como la cascada de caspasas [22]. Esta HSS induce en estas células la síntesis diversos tipos de compuestos como el NO a través de la enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS). Este compuesto protege el endotelio gracias a su efecto vasodilatador y antiapoptótico, impidiendo la síntesis de citoquinas quimio-atrayentes de macrófagos, la adhesión de neutrófilos o la agregación de plaquetas [14, 22].

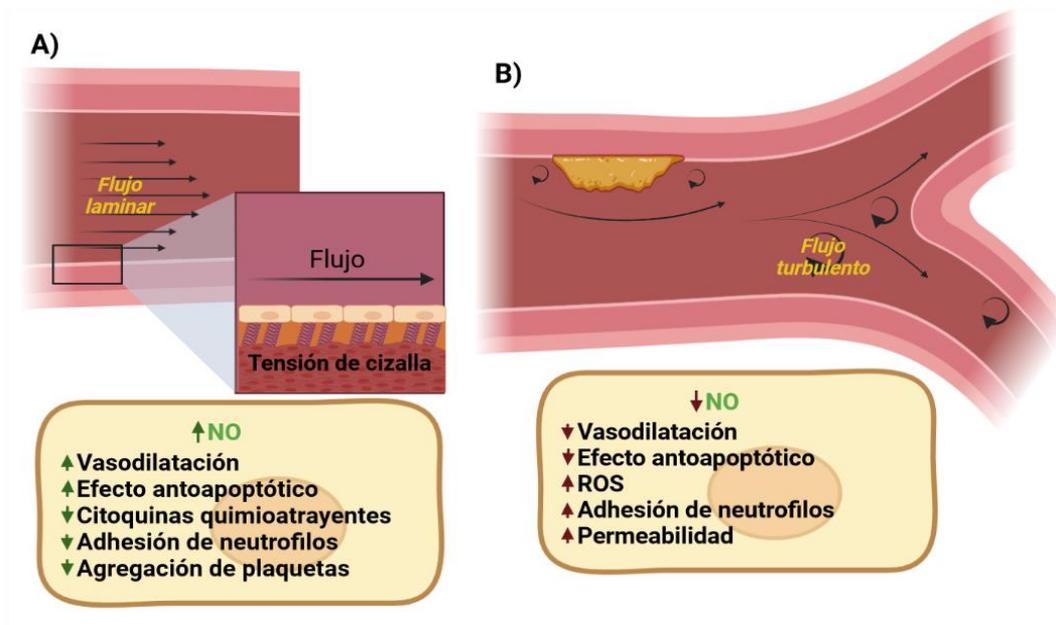


Figura 3. Tipos de flujos existentes en las arterias. A) Flujo laminar, genera el aumento de sustancias protectoras como el NO que desencadenan un efecto antiaterogénico. B) Flujo turbulento, desencadena un efecto proaterogénico.

En las ramificaciones arteriales, el flujo pasa de laminar a turbulento y el esfuerzo cortante exhibido es mucho más bajo (Low shear stress, LSS) (Figura 3). Esto hace que disminuya la síntesis de NO y su efecto ateroprotector, y que aumenten los niveles de ROS [22]. Las ROS aumentan este efecto ya que interfieren en la actividad de la eNOS y retira NO del medio, reaccionando con él para producir peroxinitrito [15]. Esto se traduce en que el endotelio comienza a expresar moléculas de adhesión que reclutan a los leucocitos circulantes, un aumento de la permeabilidad del endotelio y cambio en la matriz extracelular subendotelial. Todo esto facilita la entrada de LDL, junto con las células inflamatorias (principalmente monocitos), dentro de la pared arterial, oxidándose [10]. La LDLox retroalimenta la lesión del endotelio, ya que es capaz de inducir la apoptosis de las EC [23, 24].

Las LDL funcionan como despensas de toda clase de lípidos (esteroles, ácidos grasos, policétidos, fenoles, glicerosfolípidos, glicoesfingolípidos), llegando a almacenar 3000 de estas moléculas en su interior [25]. Con forma esférica, los lípidos en su interior se encuentran rodeados de una capa de fosfolípidos con Apolipoproteína B [12]. Ya sea degradada enzimáticamente para acceder a los lípidos de su interior, u oxidada por las ROS, esta LDL se agrega dentro del subendotelio, y lo hace con mayor probabilidad en regiones de la arteria sometidas a flujo turbulento y a un bajo esfuerzo de cizalla (Figura 3)[9].

Una vez allí, la LDLox es reconocido e interiorizado por los macrófagos y las células VSMC gracias a sus receptores scavenger [9, 12, 15, 22, 25]. En los lisosomas de los macrófagos, la lipasa del ácido lisosomal hidroliza los ésteres de colesterol a colesterol libre. Este abandona el lisosoma, y puede volver a ser reesterificado dentro del macrófago mediante la Acetil Coa Acetiltransferasa 1 (ACAT1), formando gotas de lípidos. Además, el incremento de colesterol libre de la LDL en el lisosoma, inhibe la lipasa antes mencionada, con lo que también se formarán estas gotas de ésteres de colesterol en los lisosomas. Esto acaba originando las células espumosas que ven reducida drásticamente su capacidad migratoria (Figura 5) [9, 22, 25, 26]. Aunque la mayoría de este tipo de células derivan de los macrófagos, una pequeña parte también se forman a partir de VSMC, mediante la activación del factor nuclear κB (NF- κB) y la inducción de ACAT1, y EC. [9, 15]. Además de esto, los lípidos pueden unirse a los “receptores similares a toll” (TLR, del inglés Toll-like receptors), que inducen respuestas inflamatorias, agravando la inflamación [9, 25]. Por si fuera poco, los macrófagos actúan como mantenedores de la inflamación local, ya que producen ROS y secretan citoquinas y quimiocinas proinflamatorias que promueven la quimiotaxis de células B, T y más macrófagos [9, 22, 25].

A parte de la disfunción de las EC, se ha comprobado que la LDLox es capaz de causar daños en la matriz extracelular induciendo la secreción de heparinasa, una enzima encargada de degradar la matriz extracelular [15].

La acumulación de lípidos activa las EC, que inducen la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria y la molécula 1 de adhesión celular vascular (VCAM-1, del inglés Vascular cell adhesion protein 1) y distintas quimiocinas que estimulan la migración e infiltración de más monocitos que se diferenciarán a macrófagos [9]. Las células espumosas derivadas de EC también tienen la expresión de VCAM-1 aumentada [15]. Esta acumulación de células espumosas produce unas estructuras llamadas estrías grasas (Figura 4) [9].



Figura 4: Imagen de estría grasa. Modificado de Wang and Butany, 2017 [27].

1.1.2.2. Crecimiento de la placa

Conforme va aumentando el número de células espumosas apoptóticas en la zona de la lesión, cada vez es más difícil retirar los restos celulares de forma efectiva. Cuando los macrófagos vecinos no consiguen retirar todos los restos celulares, éstos comienzan a acumularse originando un núcleo necrótico (figura 5) [9, 10, 12, 22, 26].

El engrosamiento de la pared arterial hace que parte del tejido empiece a sufrir una carestía de nutrientes. Esto provoca que se generen nuevos vasos sanguíneos dentro de la lesión. Moulton et. al. [28] demostraron que existe una asociación entre los ateromas avanzados y la neovascularización en un modelo de ratones (ApoE^{-/-}). Vieron la importancia de la mediación de las EC en esta vascularización, y cómo la inhibición de éstas hacía disminuir la neovascularización y por consiguiente, el crecimiento de la placa [28].

A través de estos capilares se generan microhemorragias dentro de la placa aterosclerótica, llevando directamente eritrocitos a la zona de lesión [9, 29]. Ya sea a través de hemólisis o de su fagocitosis por macrófagos, los eritrocitos acaban liberando hemoglobina, originando acúmulos de hierro en la lesión y aumentando el núcleo necrótico. Dentro de los macrófagos, la Hemoxigenasa-1 (HMOX1) cataboliza el grupo hemo de la hemoglobina liberando átomos de hierro que son almacenados en ferritinas dentro de vesículas fagocíticas [29]. La rápida retirada del hierro liberado de la hemoglobina y el grupo hemo son de vital importancia debido a su carácter proinflamatorio y prooxidante [29]. La hemoglobina libre también agrava la situación, retirando el NO [30]. Ya en 1981, Sullivan planteó la correlación entre los niveles de hierro y la enfermedad cardíaca [31].

Por otro lado, niveles demasiado altos de Fe pueden acabar desencadenando ferroptosis, un tipo de muerte celular programada relacionada con altos niveles de ROS provocados por altos niveles de Fe. Para intentar eliminar las proteínas o mitocondrias dañadas por ROS, las células pueden recurrir a la autofagia. En este proceso las partes dañadas son asimiladas por vesículas que se unen a los lisosomas para su degradación. Cuando los daños son generalizados se puede llegar a producir una autofagia excesiva que acabe en muerte celular autofágica [32].

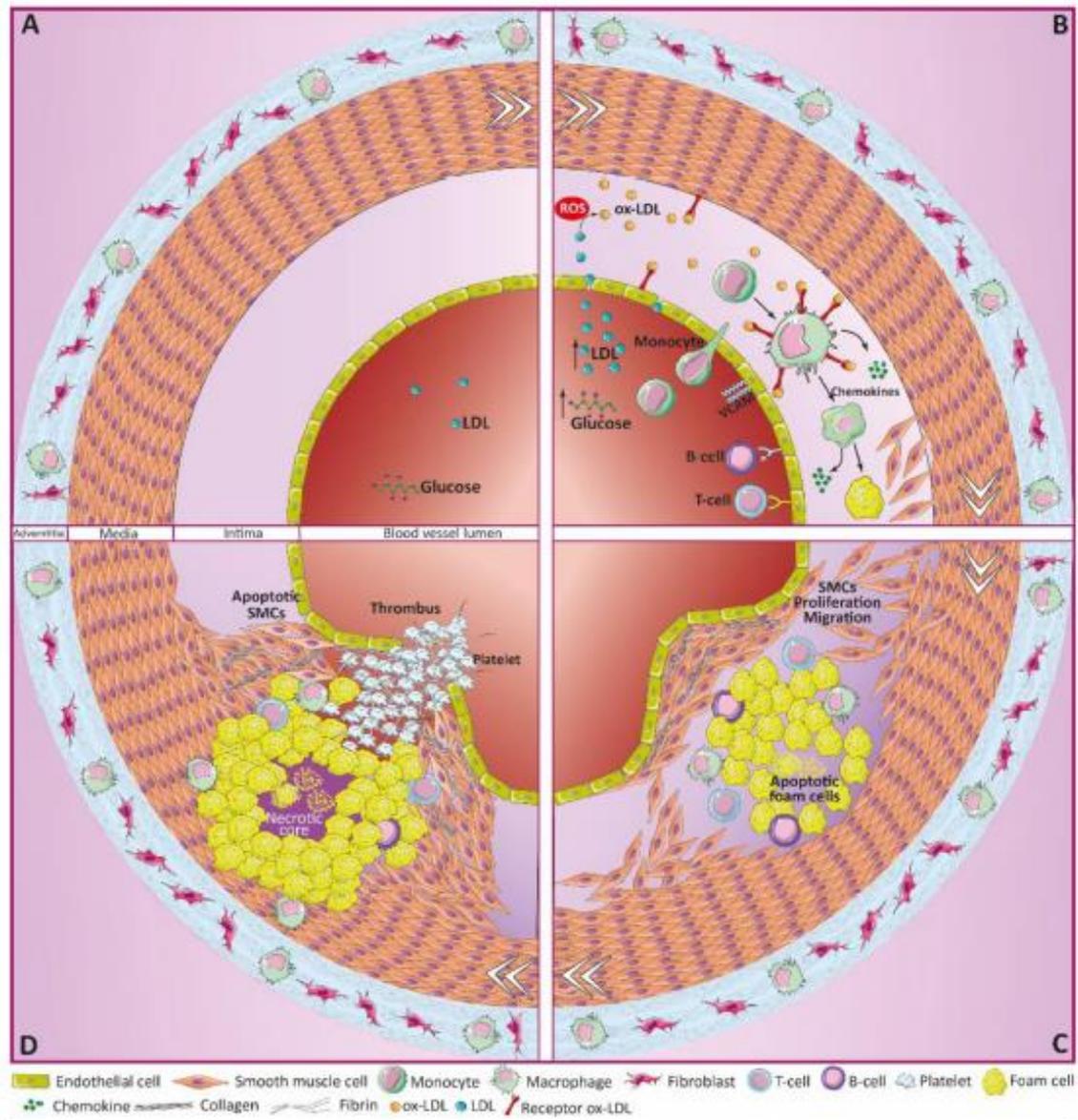


Figura 5. Progresión de la aterosclerosis. A) Diferentes factores como la hiperglucemia u oxidative estrés, promueven la iniciación de la aterosclerosis. B) los monocitos/macrófagos fagocitan LDLox, formándose células espumosas y favoreciendo el reclutamiento de linfocitos T y B. C) La formación de estrías grasas, así como la proliferación y migración de células musculares lisas (SMCs) genera complejas estructuras conocidas como placas de ateroma. Las placas de ateroma pueden bloquear parcialmente el interior de los vasos, reduciendo el flujo sanguíneo y el suministro de nutrientes a los tejidos. D) La rotura de la placa activa eventos trombóticos. Figura obtenida de Alonso-Piñeiro et. al. [33].

La aterosclerosis sigue progresando gracias al crecimiento de las SMCs, la producción de colágeno, fibronectina, elastina y metaloproteinasas de matriz (MMP). Estas últimas son liberadas por los macrófagos y estimulan la producción de citoquinas proinflamatorias que desestabilizan la placa [9]. Por su parte, las VSMC migran a la neoíntima, promueven la formación de matriz extracelular y forman una capa fibrosa que cubre la lesión [10].

En condiciones normales, los macrófagos establecen un equilibrio entre la absorción de lipoproteínas y la esterificación del colesterol mediante la hidrólisis de estos esteres a ácidos grasos libres y colesterol. En condiciones ateroscleróticas las citoquinas proinflamatorias producidas por los altos niveles de LDLox tienen como resultado la expresión de proteínas como el receptor Lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor-1 (LOX-1), que llevan a la acumulación intracelular del colesterol y la formación de las células espumosas. Además la LOX-1 inducida por aterosclerosis promueve la permeabilidad endotelial al LDLox, lo que conlleva mayor producción de células espumosas [9].

En el proceso aterosclerótico también participan otras células del sistema inmune adaptativo, como las células T (que representan el 10 % de todas las células en placas humanas) y las células B [9]. Como puede verse en la figura 6, los linfocitos T se diferencian en distintos subtipos: TH1, TH2 y Treg con distintas actividades en relación con la aterosclerosis. Así las TH2 y las Treg tienen un efecto antiaterosclerótico mediante la producción de citoquinas antiinflamatorias como la interleucina-10 (IL-10) (las primeras) y Factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) las segundas, capaz de promover la síntesis de colágeno como el que recubre los núcleos necróticos y estabiliza la lesión. En el caso de los linfocitos TH1, éstos ejercen un papel proaterosclerótico a través de IL-17 y la citoquina Interferón gamma (IFN γ) que reduce la síntesis de colágeno por las VSMC, provocando un aumento de la colagenasa e inhibe TGF- β [9, 13].

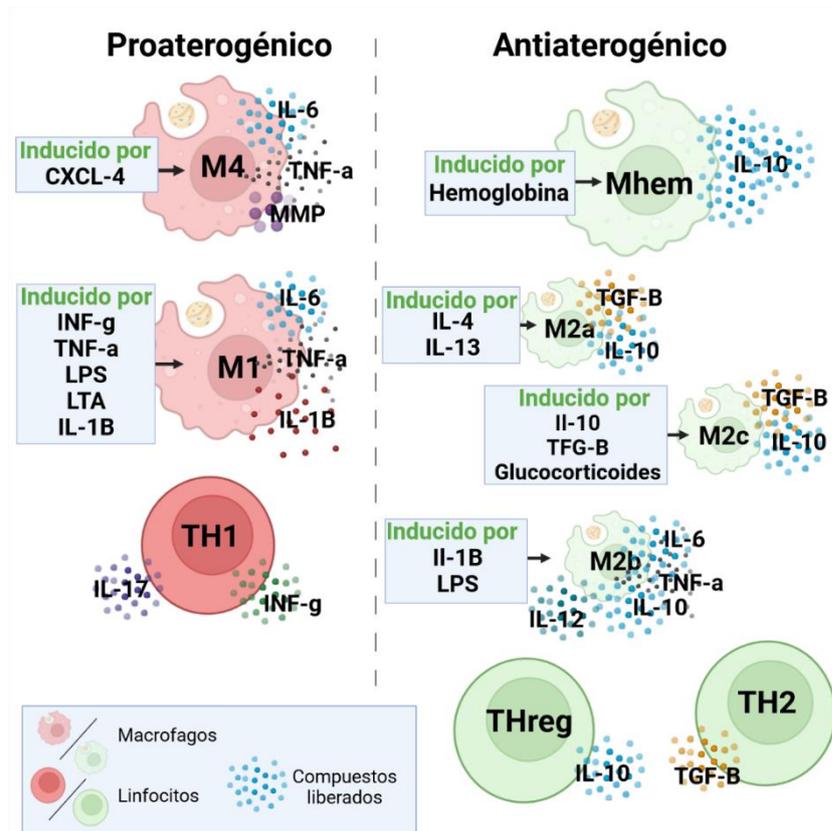


Figura 6. Esquema de polarización de los macrófagos y linfocitos T detectados en placas ateroscleróticas humanas [9, 13, 15, 29, 34].

Los macrófagos también se diferencian en subtipos en función del ambiente (Figura 6). Se han detectado macrófagos M1 en humanos, en el núcleo lipídico de la placa aterosclerótica. Éstos se activan por $\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, productos microbianos como lipopolisacárido (LPS) o el ácido lipoteicoico (LTA) [15, 29, 34]. Presentan una fuerte respuesta proinflamatoria debido a la importante producción de citoquinas proinflamatorias que desencadenan, así como una baja expresión de HMOX1, y una alta expresión de ferritina, y poca capacidad para exportar y recircular el hierro. Por esto último, se piensa que pueden actuar como “retenedores del hierro”. Además, la liberación de las citoquinas antes mencionadas, pueden contribuir a la activación de EC y células musculares espumosas y un incremento del estrés oxidativo por la producción de ROS y especies reactivas de nitrógeno (RNS) [29].

El daño producido en los vasos sanguíneos conduce a la liberación de eritrocitos y metaloproteínas que acaban siendo fagocitados por los macrófagos. El grupo hemo de estas metaloproteínas promueve la diferenciación a macrófagos M_{Hb} o M_{hem}, que entre otros muchos factores expresa el factor de transcripción de activación dependiente del hemo 1 (ATF1)

que induce la expresión de la HMOX1. Otro subtipo son los macrófagos M4, incapaces de fagocitar hemoglobina y con HMOX1 subregulada, tienen un efecto aterogénico. Contribuyen a la inestabilidad de la placa y limitan la generación de los macrófagos Mhem [9, 29].

Por otro lado, los macrófagos M2 presentan actividad antiinflamatoria. Estos a su vez, están subdivididos en 3 categorías M2a, M2b, y M2c. Los primeros se activan por IL-4 (liberada por linfocitos Th2) e IL-13, e inhiben la liberación de citoquinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1, IL6 o INF- γ . M2b por su parte, se activan por LPS y LTA, y por inmunocomplejos. Secretan IL-10, que, a su vez, puede provocar la diferenciación a macrófagos M2c, junto con TGF- β y glucocorticoides. M2c también pueden liberar IL-10 e inhibir otras citoquinas proinflamatorias [15, 31]. Este subtipo de macrófagos, los M2, tiene una capacidad mejorada de fagocitosis, remodelación tisular y producción de MMPs. Al contrario que M1, los macrófagos M2 expresan altos niveles de HMOX1 y una baja expresión de ferritina. Esto, sugiere que estos macrófagos tienen un fenotipo de liberación de hierro con una mayor absorción, reciclaje y exportación de hierro y una baja retención del mismo. Aparecen principalmente en estados tempranos de la lesión aterosclerótica, alrededor del núcleo lipídico. Los macrófagos M2 son menos susceptibles a convertirse en células espumosas y cuentan con una actividad fagocítica mejorada. Por todo ello actúan como protectores de la lesión aterosclerótica [29].

En condiciones normales, existe un equilibrio entre los macrófagos proinflamatorios (M1, M4) y los antiinflamatorios (M2, Mhe), pero la LDL polariza este equilibrio hacia la producción de macrófagos proinflamatorios, mediante el aumento de TNF α e IL-6. Este efecto polarizador se ve aumentado con la LDLox, que promueve el cambio de fenotipo de macrófagos de M2 a M1 [9].

1.1.2.3. Calcificación de la placa

Otro tipo celular implicado en el proceso aterosclerótico son las VSMC. En condiciones basales son el tipo celular predominante en la pared de los vasos. Tienen un bajo poder proliferativo y una alta contractibilidad, que les permite contraer y dilatar los vasos para regular la presión y el flujo sanguíneo. Al no ser células totalmente diferenciadas, pueden sufrir bajo ciertos estímulos, un cambio a subtipos “sintéticos” que pierden la contractibilidad e incrementan su movilidad y su ratio de proliferación. Bajo condiciones patológicas, pueden diferenciarse a células similares a osteoblastos, originando la aparición de la calcificación (Figura

7) [29]. La calcificación arterial comienza a producirse en la tercera década de vida. Pueden formarse depósitos de hidroxapatita (fosfato de calcio cristalino) tanto en la túnica media como en la neoíntima (tejido formado de nuevo sobre la íntima, tras una lesión). A su vez los depósitos de calcificación pueden ser depósitos discretos cuando son zonas de mineralización puntual o condro-óseos cuando presentan estructuras de tipo óseo (son menos frecuentes que los discretos) [35].

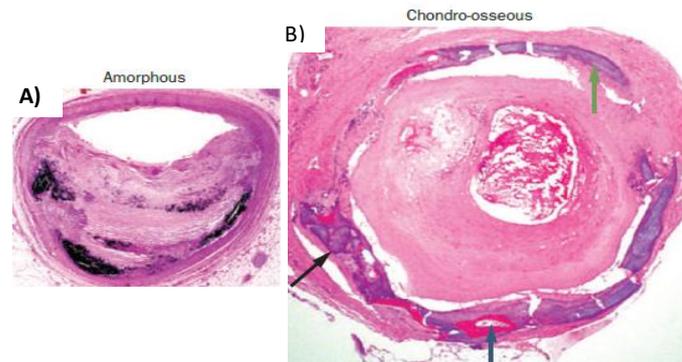


Figura 7. A) Placa aterosclerótica con depósitos de calcificación amorfos (hidroxapatita) teñidos de negro con el método Von Kossa. B) Placa aterosclerótica con depósitos de calcificación en distintos estados. La flecha verde indica un depósito amorfo de calcificación. La flecha negra señala una zona de transición entre ambos estados. La flecha azul señala un espacio medular dentro de tejido óseo. Modificado de Sage et. al. 2010 [35].

1.1.2.4. Estados avanzados y rotura de placa

El crecimiento de la placa de ateroma acaba limitando el flujo sanguíneo. En estados avanzados puede desembocar en isquemia, o formar trombos que interrumpan el flujo sanguíneo (Figura 5) [10].

De manera simplificada, podemos decir que en las etapas finales de la aterosclerosis, nos encontraremos con dos tipos de placas distintas, tal y como puede verse en la figura 8 [12]:

-Placas estables: Tienen unas cubiertas fibrosas mayores y por el contrario, menores acumulaciones de lípidos [12]. Este tipo de placas tienen una mayor presencia de fosfolípidos y triglicéridos [25].

-Placas inestables o vulnerables: tienen una cubierta fibrosa fina y grandes núcleos lipídicos. La capa fibrosa que recubre la placa puede romperse, exponiendo el interior de ésta a la sangre [13].

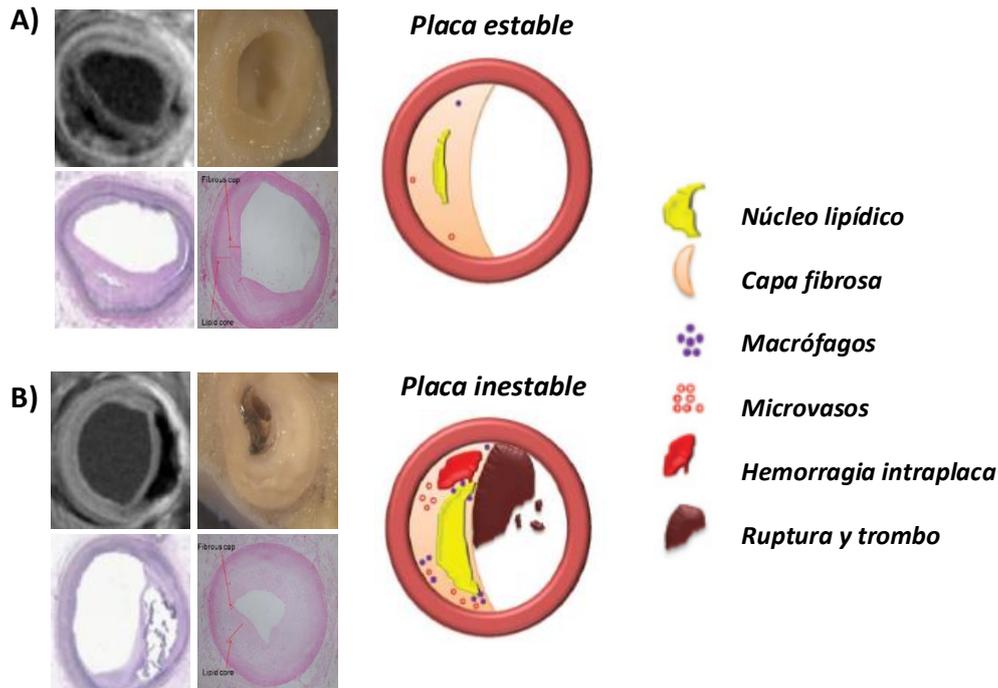


Figura 8. Placas estables y placas inestables o vulnerables. Se puede ver que las placas estables (A) tienen una capa fibrosa sobre la zona de lesión mucho mayor que las inestables o vulnerables (B). Modificados de Mandal et. al. 2018, Fan et. al. 2014 y Lammeren et. al. 2011 [36-38].

Se ha comprobado que las placas inestables son más ricas en colesterol libre o ésteres de colesterol [25]. Los elementos coagulantes acaban formando un trombo, que puede ocluir el vaso dando lugar a un accidente cerebrovascular agudo o síndromes coronarios agudos. Si el trombo no es oclusivo, existe la posibilidad de que se reabsorba, migren VSMC y creen más matriz extracelular. Esto oculta la lesión, pero aumenta el tamaño de la placa ocluyendo aún más la luz de la arteria [13].

Existe otro mecanismo alternativo para la formación de trombos en placas con una capa fibrosa poco estable, pero con una matriz extracelular abundante. Se conoce como erosión de la placa. Lamentablemente los mecanismos de erosión no son tan conocidos como en el caso de la ruptura de la placa [13].

El bloqueo de la luz arterial como resultado del proceso aterosclerótico puede derivar en [13]:

- Accidentes cerebrovasculares isquémicos y ataques cerebrales isquémicos transitorios, cuando el área afectada es el cerebro. Dependiendo del tiempo que se bloquea el suministro de sangre, sus efectos pueden ser transitorios o permanentes.

-Síndromes coronarios agudos: Este bloqueo afecta a las arterias que irrigan el corazón. Cuando el bloqueo no es total, causa dolor precordial, conocido como angina de pecho. En casos de bloqueo más graves estamos ante infartos de miocardio.

-Aneurismas, principalmente los que se forman en la aorta abdominal. Son ensanchamientos de la arteria aorta, que pueden desencadenar en ruptura.

-Cuando se produce en las arterias periféricas que irrigan las extremidades, puede provocar isquemia de miembros inferiores causando claudicación intermitente (dolor en las piernas que desaparece en reposo) y dando lugar a necrosis tisular y ulceraciones, haciendo necesaria la amputación de parte del miembro necrosado.

-En arterias renales, puede causar estenosis dificultando la función renal.

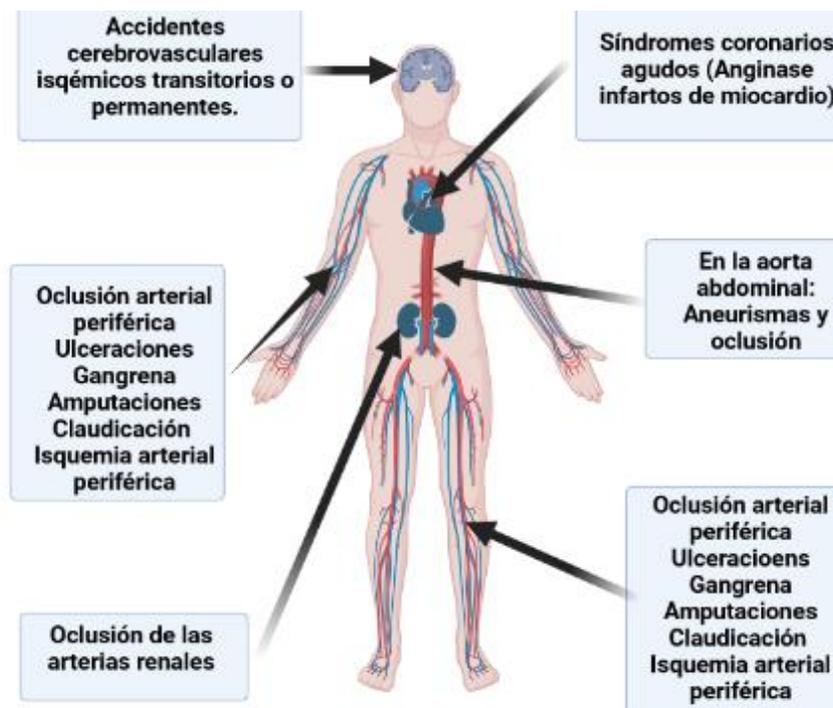


Figura 9. Efectos de la aterosclerosis [13].

1.2. Estrés oxidativo

Durante el transcurso del funcionamiento normal de la célula, se producen una gran cantidad de sustancias de desecho. Entre todas ellas, existen un grupo de moléculas muy reactivas con un electrón desapareado o susceptible de producirlo. Genéricamente se conocen como ROS (Figura 10), e incluyen el singlete de oxígeno ($^1\text{O}_2$), el oxígeno molecular (O_2), el radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), ion peróxido (O_2^{2-}), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroxilo ($\text{OH}\cdot$), e hidroperóxidos ($\text{ROO}\cdot$). También podemos encontrar una serie de compuestos generados a partir de los radicales óxido nítrico y superóxido, denominados RNS. Algunos de estos elementos regulan y mantienen funciones biológicas normales, por lo que es vital mantener su concentración en niveles basales [39].

Dentro de las fuentes endógenas de ROS, citadas anteriormente, se encuentra la respiración celular (el 90% de las ROS endógenas se producen por esta vía), la NADPH oxidasa (NOS), la xantina oxidasa (XO) o el citocromo P450. [32, 39, 40]. El hierro libre también es un gran generador de ROS, ya sea en estado reducido (Fe^{2+}) mediante la reacción de Fenton, o en estado oxidado (Fe^{3+}), mediante su previa reducción con la reacción de Haber-Weis [32]. También existen fuentes externas o exógenas de ROS/RNS, tanto físicas (ej. distintos tipos de radiaciones ionizantes), como químicas, como las sustancias liberadas con el tabaco, fármacos, etc. [39, 40].

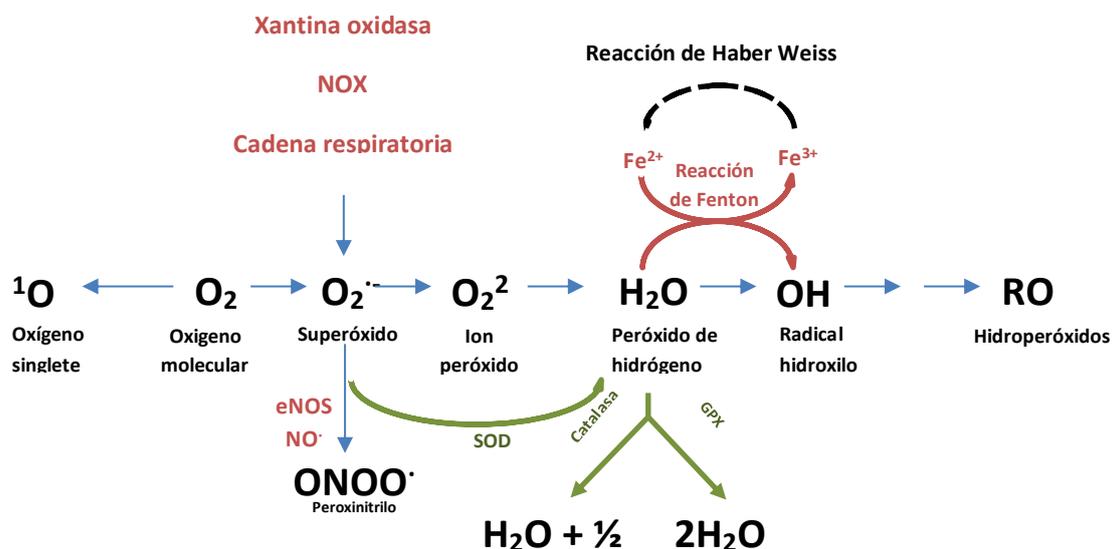


Figura 10. Generación de los distintos ROS/RNS.

En condiciones basales, los daños generados por ROS pueden ser reparados o eliminados por degradación. Sin embargo, cuando el equilibrio entre generación y eliminación de especies reactivas empieza a desajustarse por la presencia de un exceso de ROS, los mecanismos de subsanación dejan de ser efectivos y empieza a producirse daño oxidativo. Las rutas metabólicas en las que están involucradas se desregulan, los lípidos comienzan a generar aldehídos y cetonas reactivas que aumentan los daños generados, se producen alteraciones en los ácidos nucleicos y las proteínas sufren carboxilaciones, nitraciones etc. Todo esto configura el antes mencionado estrés oxidativo [39], que desemboca en muerte celular.

Como el propio nombre indica, el problema de las ROS es su reactividad, reaccionando con ARN, ADN, proteínas y lípidos (Tabla 2).

ROS y proteínas:

Las ROS reaccionan con los residuos de cisteína de las proteínas, formando ácido sulfénico (-SOH), que puede reaccionar con otros grupos sulfénicos próximos para generar puentes disulfuro. Si este puente se genera entre dos cisteínas dentro de la misma proteína, altera su conformación. Si por el contrario lo conforman proteínas distintas dará lugar a un dímero [41, 42]. El ácido sulfénico también puede reaccionar con nitrógenos próximos para generar sulfenamidas o seguir oxidándose a ácido sulfínico (-SO₂H) o sulfónico (-SO₃H) [42].

ROS y ácidos nucleicos

Las ROS pueden causar diversos daños en el material genético de forma directa, ya sea modificando bases específicas (convierte G en 8-oxo-dG en el caso de ROS y G en 8-nitro-dG en el caso de RNS), o causando transversiones de GC a TA [39].

Del mismo modo, las ROS pueden afectar a la estabilidad del ARNm interfiriendo en distintas rutas metabólicas que acaban con la generación de proteínas como HuR que estabiliza los mRNA. HuR se une a los extremos 3'-UTR del ARNm a secuencias ricas en elementos AU de ciertos ARNm, aumentando su estabilidad y participando en su salida del núcleo [39].

ROS y lípidos:

Las ROS reaccionan con lípidos mediante reacciones de peroxidación lipídica. Estos están controlados enzimáticamente por las lipooxigenasas. Estos productos tienen actividad biológica, necesaria para el correcto funcionamiento de la célula. A su vez, los ácidos grasos poliinsaturados, que forman parte de las membranas plasmáticas, reaccionan con mucha

facilidad con las ROS para dar intermedios radicalarios, que pueden seguir reaccionando (reacción en cadena de peroxidación lipídica) [32].

La peroxidación lipídica juega un papel importante en los distintos tipos de muerte celular. Por lo tanto, un exceso de peroxidación lipídica acabará induciendo apoptosis celular.

Tabla 2. Efectos causados en los distintos tipos de moléculas y su subsanación [41, 42].

Oxidación	Efecto	Reparación
Lípido	Peroxidación lipídica	Autofagia
Proteína	-Formación de puentes disulfuro dentro de la proteína alterando su conformación y entre otras proteínas formando dímeros -Alteración de los grupos tioles	Se degrada en el proteosoma
Ácido nucleico	-Modificaciones en bases específicas: ROS: 8-oxo-dG RNS:8-nitro-dG -Transversiones GC→TA	-Reparación por escisión de la base -Reparación por escisión de nucleótido -Reparación de discordancias

1.2.1. Sistemas de defensa ROS

La célula posee diversos métodos para intentar reducir los niveles altos de ROS. Estos métodos pueden ser enzimáticos o no enzimáticos. Entre los primeros tenemos a la catalasa (CAT) que degrada el H_2O_2 en H_2O y $\frac{1}{2} O_2$; la enzima superóxido dismutasa (SOD) que convierte el O_2^- en oxígeno y H_2O_2 ; la enzima glutatión peroxidasa (GPX) que retira H_2O_2 convirtiéndolo en H_2O y glutatión disulfuro (GSSG); y las tiorredoxinas (Trx), que reducen otras proteínas gracias a la reacción tiol/disulfuro. Entre los métodos no enzimáticos tenemos diversas sustancias antioxidantes. Uno de estos procesos no enzimáticos es el ciclo de oxidación-reducción de la biliverdina-bilirrubina. La biliverdina se obtiene por degradación enzimática del grupo hemo de la hemoglobina, gracias a la HMOX1. La ruta de señalización de HMOX1 comienza con la translocación de ciertas proteínas citosólicas al núcleo, como son el factor nuclear derivado de eritroide 2 similar al 2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, NRF2) o el factor de transcripción de choque térmico (Heat shock factor 1, HSF1)[10, 33, 43-45].

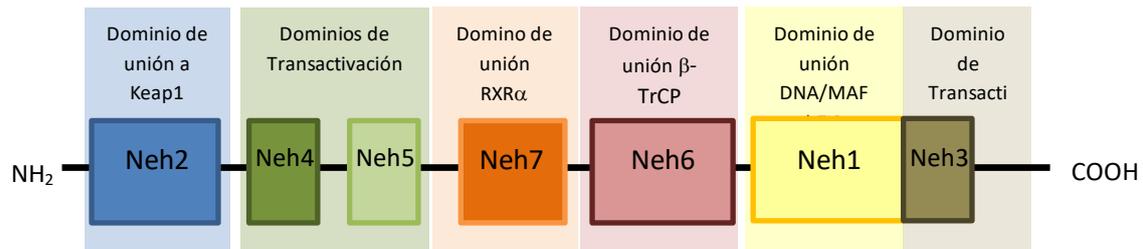


Figura 12. Dominios de NRF2[52] [53].

En condiciones basales, NRF2 se encuentra constitutivamente expresado en el citosol, unido a la proteína KEAP1 mediante su dominio Neh2, formando una macromolécula con KEAP1 (Figura 11). En esta macromolécula KEAP1, a su vez, se encuentra poliubiquitinado por la ligasa E3 gracias a la proteína Cul3, una molécula adaptadora de KEAP1. NRF2 está continuamente sintetizándose, y este complejo de NRF2 con KEAP1 hace que Nrf2 sea continuamente degradado por el proteasoma [54]. NRF2 es un elemento de respuesta rápida a situaciones de estrés celular. Esto es debido a que cuando el dímero se separa, debido a una situación de estrés, NRF2 queda libre. De esta forma, la célula cuenta con una gran cantidad de NRF2 disponible que se transloca al núcleo para inducir la expresión de proteínas antioxidantes en grandes cantidades.

En condiciones patológicas, y en respuesta a señales de estrés oxidativo o electrofílico, los grupos sulfhidrilo de las cisteínas reactivas de KEAP1 se ven modificados. Esto provoca que la unión KEAP1-NRF2 sea más lábil. Se estima que KEAP1 tiene hasta 27 residuos de cisteína implicados en su unión con NRF2 [55]. De esta forma NRF2 queda libre y se transloca al núcleo. Allí se une a unas pequeñas proteínas llamadas fibrosarcoma musculoaponeurótico (Small musculoaponeurotic fibrosarcoma sMAF), a través de su dominio NeH1, lo que posibilita unión de NRF2 a los elementos de respuesta antioxidante (ARE) del ADN [56]. NRF2 transactiva enzimas protectoras celulares dependientes de ARE (Figura 11), como la ya mencionada HMOX1, SOD, la glutamato-cisteína ligasa (GCL), NAD(P)H quinina oxidoreductasa 1 (NQO1), la catalasa y las dos subunidades de la g-glutamilcisteína ligasa catalítica y modificadora (GCLC y GCLM) [39, 44, 54, 56].

Además de las ROS, existen otros estímulos que pueden afectar la traslocación de NRF2 al núcleo y su activación, como quinasas y microARN (tabla 3):

Tabla 3. Lista de quinasas y microARN implicados en la activación/inhibición de NRF2. Modificada de Alonso-Piñeiro et al, 2021 [33].

Quinasas			
Protein quinasas	Identificado en	Efecto	Referencia
GSK-3 β	HEK293T	Inhibición de NRF2	[57] Rada et. al., 2011
	HepG2	Inhibición de NRF2	[58] Salazar et. al., 2006
FYN	HepG2	Inhibición de NRF2 vía GSK-3 β	[59] Jain et. al., 2007
P38 MAP quinasa	Timocitos y 293T; HepG2	Activación/Inhibición de NRF2/HMOX1	[60] Thornton et. al., 2008 [61] Shen et. al., 2004 [62] Elbirt et. al., 1998
PI3k/Akt	293T	Activación de NRF2 vía inhibición de GSK-3 β	[58] Salazar M. et. al., 2006
PKC	HepG2	Activación NRF2	[63] Huang et. al., 2002
JNK	HepG2	Activación NRF2	[61] Shen et. al., 2004
ERK	HepG2	Activación NRF2 vía inhibición GSK-3b	[61] Shen et. al., 2004 [62] Elbirt et. al., 1998
PERK	Fibroblastos embrionarios de ratón	Activación NRF2	[64] Cullinan et. al., 2003
AMPK	HepG2, HEK293	Activación NRF2	[65] Joo et. al., 2016
MicroARN			
miARN	Identificado en	Efecto	Referencias
mi-R28	Líneas celulares de cáncer de pecho	Inhibición NRF2	[66] Yang et. al., 2011
miR-34a	Hepatocitos y cardiomiocitos	Inhibición NRF2	[67] Huang et. al., 2014 [68] Wang et. al., 2019
miR-132; miR-200c	Línea celular tubular proximal renal	Inhibición de NRF2	[69] Stachurska et. al., 2012
miR-144	Líneas celulares neuronales y k562	Inhibe NRF2	[70] Zhou et. al., 2017
miR-153, miR-27a, miR-142-p	Líneas celulares neuronales	Inhibe NRF2	[71] Narashimhan et. al., 2012
miR-200a	OB-6	Incrementa los niveles de NRF2	[72] Zhao et. al., 2017
miR-140-5p	HK2	Incrementa los niveles de NRF2	[73] Liao al., 2017
miR-873-5p	mRTECs	Incrementa la expresión de NRF2 y HMOX1	[74] Wang et. al., 2019

HSF1

Otro de los factores de transcripción que promueven la síntesis de HMOX1 es HSF1. Esta proteína está constituida por 5 dominios. Dos de estos dominios forman cremalleras de leucina (al igual que pasaba con NRF2), que configuran la unión al ADN. En condiciones basales HSF1 se encuentra mayoritariamente en el citosol (Figura 11). Bajo condiciones de estrés oxidativo, se

transloca al núcleo donde sufre diferentes modificaciones como acetilaciones en residuos de lisina, fosforilaciones y sumoilaciones (adicción de pequeñas proteínas (Small Ubiquitin-related MOdifier)) quedando finalmente como un trímero estabilizado por puentes disulfuro. En general, se ha observado que en células HSF1-/-, la expresión de HMOX1 está aumentada [75]. HSF1 también promueve la expresión de proteínas del choque térmico, de hecho cabe señalar que se han descrito altos niveles de proteínas de choque térmico en las células espumosas procedentes de EC [15].

HMOX1

La translocación de NRF2 al núcleo en respuesta a diversos factores de estrés oxidativo provoca que se sinteticen diversas enzimas antioxidantes (Figura 11). Entre ellas la HMOX1, una enzima de 32 kDa codificada por el gen *hmx1*. Su importancia viene apoyada por el hecho de que se encuentra altamente conservada [29, 76]. HMOX1 se localiza en la superficie del retículo endoplasmático, anclada por una región hidrofóbica en su extremo C terminal y orientada hacia el citosol. Su centro catalítico consiste en un “bolsillo de unión a hemo” y un residuo imidazol de una histidina que se une al hierro [29]. De esta forma cataliza la descomposición del grupo hemo en biliverdina, CO y Fe²⁺ (Figura 11) [29, 76-79].

Se han descrito 3 isoformas de hemo oxigenasa: HMOX1, HMOX2 y HMOX3. De ellas la única que está constitutivamente expresada en los tejidos es la HMOX2. HMOX3 es poco conocida, pero se sabe que se sintetiza a partir de HMOX2. Por último, pero no por ello menos importante, cabe señalar que HMOX1 que se encuentra en muy bajas concentraciones en la mayoría de tejidos, pero que es altamente inducible [79].

HMOX1 y aterosclerosis:

HMOX1 se activa como respuesta a la acción de factores de transcripción como HSF1, la proteína activadora 1 (AP-1), NFκB, NRF2 o el factor de transcripción homólogo a BTB y CNC 1 (BACH1) [80, 81]. Estímulos como calor, irradiación UV, ciertos lipopolisacáridos, factores de crecimiento, procesos inflamatorios, la presencia del grupo hemo libre, estrés oxidativo, hipoxia, isquemia o carcinogénesis provocan la activación de HMOX1 [10, 81]. También existen evidencias de que HMOX1 puede estar regulada por microARN tanto directamente como a través de sus factores de transcripción, y a su vez parece que también puede regular la expresión de microARN [10].

La HMOX1 se encarga de degradar fundamentalmente el grupo hemo b (aunque también puede reaccionar con otros tipos de hemo, como el c, por el b tiene una mayor afinidad)

de algunas metaloproteínas, originando como productos de su reacción, en cantidades equimolares: Biliverdina IXa, que posteriormente será convertida a bilirrubina IXa por una enzima NADPH dependiente llamada biliverdina reductasa (BLVR), Fe^{2+} y CO (Figura 13) [10, 29]. Los tres productos obtenidos de la descomposición catalítica del grupo hemo por la HMOX1 afectan de forma directa o indirecta a la evolución de la aterosclerosis.

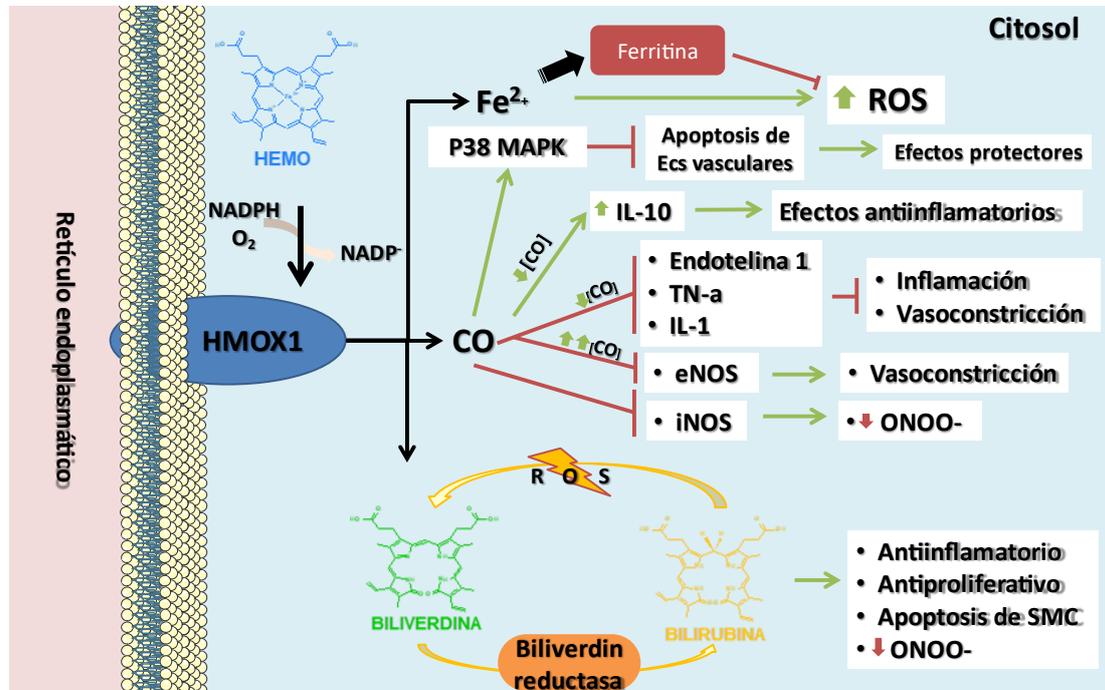


Figura 13. Productos antioxidantes de la HMOX1 derivados de la degradación de hemo. La HMOX1 cataboliza la degradación de hemo en cantidades equimolares de monóxido de carbono (CO), Fe^{2+} y biliverdina. La Biliverdina se convierte en bilirrubina por la biliverdina reductasa (BVR). HMOX1 también induce la producción de ferritina, reduciendo los niveles de Fe^{2+} que podrían generar ROS a través de la reacción de Fenton. Adaptación de Alonso-Piñeiro et al 2021 [33].

La reacción que cataliza comienza con la formación de un complejo entre el hierro del grupo hemo en estado férrico y la HMOX1 (Fe-HMOX1) y su reducción con un electrón proveniente de un NADPH. A continuación, un oxígeno molecular se une al hierro formando un intermedio oxiferroso, que acepta otro electrón de un NADPH y forma un intermedio hidropéroxido férrico. El siguiente paso es la eliminación de un grupo CO proveniente del puente de carbono α formando un complejo verde-hemo-ferri-biliverdina IXa. Por último la ferri-biliverdina se reduce, liberando el átomo de hierro y la biliverdina IXa [10]. Se estima que el 90% del hierro plasmático es reciclado mediante la fagocitosis por los macrófagos. Sólo el 10 % restante proviene de la alimentación [82]. Los dos únicos casos recogidos en la bibliografía de deficiencia de HMOX1 en humanos, podrían apoyar esta idea. Los pacientes presentaban, entre

otros rasgos, lesiones vasculares, inflamación generalizada, anemia y deposición de hierro en los tejidos [10].

Las isoformas HMOX1 y HMOX2 están implicadas en la homeostasis, principalmente a través de la liberación del CO [10]. Estudios en ratones sugieren que la HMOX1 afecta al tono vascular gracias a su actividad antioxidante. Parece ser que mantiene a la guanilato ciclasa GC en un estado “más reducido”, por lo que se vuelve menos sensible a NO [10]. A altas concentraciones (mM), el CO inhibe la actividad de la eNOS, por lo que disminuye la cantidad de NO disponible causando vasoconstricción. Por el contrario, a concentraciones del rango de nM, aumenta la relajación, inhibiendo enzimas encargadas de la vasoconstricción como la Endotelina-1. De esta forma vemos que HMOX1 está implicada en la presión arterial [10, 83]. CO también posee actividad antiinflamatoria, disminuyendo la producción de citoquinas e interleucinas inflamatorias a bajas concentraciones (como TNF- α e IL-1 β), o aumentando la síntesis de citoquinas antiinflamatorias (IL-10) a altas concentraciones [10, 83]. También se ha visto que el CO inhibe la apoptosis en EC, mediante la activación de la enzima MAPK p38, protegiendo el endotelio [84].

Por otro lado, el átomo de hierro liberado es citotóxico, ya que mediante la reacción de Fenton provoca la producción de ROS (figura 10). Por ello es de vital importancia retirar el hierro que se libera cuando HMOX1 degrada al grupo hemo [77, 85]. La liberación del hierro producido por la HMOX1 induce la expresión de ferritina, la proteína encargada de retirar el hierro que se va liberando. Ferritina es un complejo formado por 24 subunidades de cadenas ligeras (FLC) y pesadas (FHC), que funciona como un almacén de Fe, que oxida a Fe³⁺ gracias a su actividad ferroxidasa. De esta forma no sólo se retira el hierro del medio, sino que se “neutraliza” su capacidad para generar más ROS [29].

El último compuesto liberado por la acción de HMOX1 es la biliverdina, verdadero componente antioxidante. Una vez liberada, la BLVR la reduce a bilirrubina que reacciona con las ROS oxidándose de nuevo a biliverdina y retirando las especies reactivas del medio (figura 12) [78, 79]. Existen dos tipos de BLVR, la BLVR-A predominante en adultos y que produce bilirrubina IX α , y la BLVR-B predominante en fetos y productora de bilirrubina IX β [86]. Se ha podido comprobar que existe una relación inversa entre los niveles de bilirrubina sérica y la aterosclerosis [87].

La acción de la HMOX1 es muy importante en la inflamación vascular, ya que en estas condiciones se produce hemólisis y la posible degradación de las proteínas que contienen hemo, liberándolo. En el plasma, la hemoglobina libre forma complejos con la haptoglobina y el hemo

libre con hemopexina, que las retiran del medio a través del hígado, eliminando su toxicidad. Pero cuando la apoptosis es demasiado alta, estas enzimas no son capaces de realizar su función citoprotectora, con lo que se activa la expresión de HMOX1 [10]. Finalmente, cabe señalar que HMOX1 también está implicado en la estabilización de las placas ateroscleróticas, propiciando placas más estables [88]. Numerosos estudios han demostrado la relación entre la disminución de HMOX1, y el aumento del daño endotelial y empeoramiento de la aterosclerosis [88-91].

GCL

NRF2 participa en la modulación del glutatión reducido (GSH), mediante el control de la expresión de la enzima g-glutamylcisteína ligasa (GCL) (Figura 10). GCL está constituida por dos subunidades, la subunidad catalítica, GCLC, y la subunidad modificadora, GCLM. Esta enzima cataliza el primer paso (que además es el paso que limita la velocidad de la reacción) de la síntesis del glutatión de la g-glutamylcisteína ligasa [44]. Bajo condiciones de estrés oxidativo, la translocación de NRF2 al núcleo también provoca la síntesis de las dos subunidades de GCL, cuyos genes se encuentran en distintos cromosomas. La subunidad GCLC contiene el sitio activo de la proteína. En este, el grupo amino de la cisteína se une al grupo carboxilo del glutamato en el carbono γ [92].

NQO1

Otra enzima modulada por NRF2 relacionada con el estrés oxidativo es la NAD(P)H quinona oxidoreductasa (NQO). Se han descrito dos isoformas NQO1 y NQO2, y ambas catalizan la reducción de 2 electrones de diversas quinonas a hidroquinonas. De esta forma se consigue detoxificar compuestos tanto endógenos como exógenos. En la figura 14 podemos ver los principales sustratos de NQO1 [93].

• Quinones with antioxidant activities

- Ubiquinones (Co Q) (n=1~10)
- Plastoquinones (n=1~10)
- Phylloquinone (vitamin K₁)
- Pyrroloquinoline quinone

• Quinones with antitumor activities

- Mitomycin C
- Doxorubicin (adriamycin)
- Daunorubicin
- Streptonigrin
- Geldanamycin

• Quinones as reduction substrates & reactive metabolites

- α -Tocopherol (vitamin E)quinone
- β -Lapachone
- Idebenone
- RH1
- EO9 (indolequinone)
- AZQ
- QS-10
- MeDZQ
- Catechol estrogen o-quinones
- Dopamin-derived quinones
- o-Benzoquinones
- p-Benzoquinones
- Quinoneimines
- Naphthoquinones

Figura 14. Principales sustratos de NQO1. Co Q: Coenzima Q; RH1: 2,5-diaziridinil-3-(hidroxilmetil)-6-metil-1,4-benzoquinona; AZQ: diaziquina; QS-10: 6-(9-carboxinonil)-2,3-dimetoxi-5-metil-1,4-benzoquinona; MeDZQ: 2,5-diaziridinil-3,6-dimetil-1,4-benzoquinona. Modificado de Lee et. al., 2021 [93].

1.3. Tratamientos actuales

El ensayo CANTOS ha puesto de manifiesto la importancia de la inflamación en la aterosclerosis, y como puede llegar a ser el centro de las terapias contra la aterosclerosis [9]. Dado que la aterosclerosis es una enfermedad que produce una inflamación crónica y que comienza a producirse en edades muy tempranas [94], el primer arma que tenemos frente a ella es la prevención. Concienciar a la población desde jóvenes de la importancia de seguir hábitos de vida saludables.

1.3.1. Tratamientos farmacológicos

Cuando la enfermedad ya está avanzada es necesario recurrir a tratamientos farmacológicos. Así tenemos por ejemplo los receptores activados por agentes proliferadores de peroxisomas (PPAR por sus siglas en inglés). Estos compuestos inhiben a VCAM-1, con lo que dejan de reclutarse monocitos, disminuyendo la formación de las células espumosas. Además se incrementan los niveles de NO [95]. Otros fármacos muy usados son la estatinas, inhibidores

de 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA) reductasa, una enzima implicada en la síntesis del colesterol [14, 95]. Las estatinas también promueven la inhibición de citoquinas proinflamatorias (INF- γ , IL-2, IL-12 o TNF- α) y la liberación de citoquinas antiinflamatorias (IL-4, IL-5, IL-10 y TFG-B) en ratones, afectando de esta manera la polarización de los macrófagos y de las células T [15, 96]. Se ha visto que el uso de estatinas reduce el tamaño de la placa [14, 95]. Pese a que los tratamientos farmacológicos pueden ser más o menos exitosos en el control de la aterosclerosis, hasta la fecha no hay ningún tratamiento que sea capaz de revertir la progresión de las placas de ateroma y de regenerar el tejido dañado devolviéndolo a un estado similar al de antes de la lesión [97].

La metformina es otro fármaco en estudio por su efecto de protección vascular. Mediante la activación de, entre otras, la ruta de la proteína quinasa activada por 5'-AMP (AMPK) lleva a la inducción de HMOX1. El efecto final es la polarización de los monocitos a macrófagos Mhem y su efecto ateroprotector, con la disminución de las células espumosas [98].

También se está estudiando el potencial de las microvesículas en el uso clínico. De hecho, Kervadec et al, tras usar células progenitoras cardiovasculares derivadas de células madre embrionarias humanas (hESC-Pg) en un modelo animal de insuficiencia cardíaca post infarto, sugirieron que el efecto beneficioso observado podría deberse a las microvesículas. Estos resultados apoyan la idea de que el efecto paracrino de las sustancias secretadas por ciertos tipos celulares pueden recuperar el tejido, en las terapias celulares para este tipo de insuficiencias [99].

El miRNA es otra diana terapéutica cuya potencialidad se está estudiando [15]. En general, existen multitud de células y estados que intervienen en la enfermedad. Como hemos visto con anterioridad, existen diversos miRNA que desencadenan efectos protectores o promotores frente a la aterosclerosis. Si sumamos a esto que aún no hace treinta años desde que se descubrieron los miRNA, es fácil de entender que la mayoría de los estudios que existen estén aún en estado preclínico. No obstante, existen diversos planteamientos terapéuticos, interesantes. Schober et al, estudiaron a miRN126-5p, un miRNA implicado en la proliferación de las CE. Este miRNA se encuentra reprimido en las zonas de flujo turbulento. Tras la administración de una molécula similar el miRN126-5p en ratones *Mir126^{-/-}*, comprobaron que las lesiones disminuían [100]. En la misma línea van los estudios de Loyer et al con el miRN-92a, un inductor de la disfunción endotelial en zonas de bajo esfuerzo cortante. Para disminuir este efecto se usaron antagonistas de miRNA (antagomirs), oligonucleótidos de diseño antagonistas

al miRNA de interés. En la tabla 4 podemos ver los distintos miARN que pueden ser usadas como dianas terapéuticas en aterosclerosis.

Tabla 4. miRNA circulantes generados en la aterosclerosis [22, 101-103].

Célula	Micro ARN	Diana	Función
SMC	miRNA-143	TFG-B	Proliferación/migración
	miRNA-150	XBP1	Homeostasis pared vascular
	miRNA-155	KLF2	Permeabilidad de los vasos
	miRNA-143/145	ACE, ELK1, KLF4/S	Evita la diferenciación a SMC sintéticas
	miRNA-21	DOCK, PDCD4, TPM1	Inhibe la proliferación de SMC
	miRNA-1	KLF4, PIM1	Evita la diferenciación a SMC sintéticas
	miRNA-10a	HDAC4	Evita la diferenciación a SMC sintéticas
	miRNA-126	BCL2, IRS2, FOXO3	Promueve la transformación de contráctil a sintético
	miRNA-22	MECP2, EVI1, HDAC4	Inhibe la proliferación de SMC y promueve la transformación de tipo contráctil al sintético
EC	miRNA-92a	THBS1	Angiogénesis
	miRNA-143/145	KLF5	Proaterosclerótico
	miRNA-34a	SIRT1	Inhiben la angiogénesis
	miRNA-217	SIRT1	Inhiben la angiogénesis
	miRNA-146a	SIRT1	Inhiben la angiogénesis
	miRNA-200c	SIRT1, p66-shc, FOXO1, ZEB1	Induce a apoptosis
	miRNA-126a	VCAM1	Inhiben NF-kb
	miRNA-21	VCAM1	Inhiben NF-kb
	miRNA-19a	Ciclina D	Inhibe proliferación e induce apoptosis
	miRNA-19b	SOCS3	Inhibe la apoptosis
	miRNA-126	SPRED1, VCAM1, DIK1	Infiltración de macrófagos y neovascularización
	miRNA-210, miRNA-216	HIF1A, Ephrin A3	Infiltración de macrófagos
	miRNA-214	PTEN	Neovascularización
	miRNA-155	NOS3	Función diastólica de los vasos
	miRNA-222	ICAM-1	Media la homeostasis vascular
	miRNA-10a	BTRC, MAP3K7, IRAK4	Inhibe genes proinflamatorios

Macrófagos	miRNA-150	Desconocido	Diferenciación
	miRNA-155	NF-kB	Formación de células espumosas
	miRNA-223	Pknox1	Activación de los macrófagos
	miRNA-21	ABCG1, MKK3	Inhiben síntesis de citoquinas proinflamatorias y promueve la salida del colesterol de la célula
	miRNA-33	FOXO3, TFEB, ABCB1, HADH b, CROT	Inhibe la fagocitosis y la asimilación del colesterol y su oxidación
	miRNA-302	ABCB1	Exportación del colesterol
	miRNA-146a	-	Reducen la migración de los macrófagos inhibiendo la quimiotaxis
	miRNA-128 miRNA-18 miRNA-365 miRNA-503	-	Reducen la migración de los macrófagos inhibiendo la quimiotaxis

Un último enfoque en el que se está trabajando es influir en las distintas citoquinas que participan en la aterosclerosis. Siguiendo este enfoque, McCarthy et al, estudiaron los efectos del ácido linoleico conjugado en ratones ApoE^{-/-}, viendo que se incrementaban los niveles de IL-10, polarizando los macrófagos al fenotipo ateroprotector [104]. El efecto final que se apreció era una regresión en la lesión aterosclerótica.

1.3.2. Cirugía

En los casos más graves la cirugía es el último recurso. En la actualidad existen dos tipos de estrategias para abordar la estenosis (oclusión) arterial: la colocación de endoprótesis y la endarterectomía. La colocación de la endoprótesis consiste en colocar un tubo (stent) en la zona ocluida para abrirla y evitar que se vuelva a cerrar. Por su parte la endarterectomía consiste en abrir la arteria y eliminar la placa aterosclerótica. La opción del stent es más recomendada en casos sintomáticos y en pacientes menores de 70 años [105]. En pacientes con estenosis carotídea, ambas opciones son igual de eficaces para prevenir los AC una vez pasado el postoperatorio (aunque las endoprótesis durante el preparatorio de la cirugía y el post operatorio (perioperatorio), presentan un mayor riesgo de AC, mientras que la endarterectomía presenta mayores riesgos de infarto de miocardio perioperatorio) [106, 107]. Remover la placa y la colocación de un stent es un primer paso. Pero esto no elimina la zona afectada y pueden volver a sufrir reestenosis volviéndose a cerrar el vaso. Se estima que hasta el 22 % de los

pacientes sometidos a endarterectomía pueden volver a sufrir estenosis moderada o alta (de más del 50%), y el porcentaje aumenta hasta el 33% cuando a los pacientes se les introduce un stent [108, 109].

Para el caso de las arterias carotideas, la revascularización es la última opción. En este caso se realiza un “puente” con venas sanas del paciente desde la aorta hasta la zona afectada sorteando el bloqueo (bypass). Por diversos motivos, no todos los pacientes pueden someterse a estas intervenciones. Se estima que más de la mitad de los pacientes presentan distintas comorbilidades que impiden la cirugía [110].

Por todo ello se hace necesario buscar terapias alternativas a las existentes. Terapias que no solo permitan frenar el avance de la enfermedad, sino también remitirla al estado inicial. En este sentido la terapia celular es un buen candidato.

1.3.3. Terapias dirigidas a reducir el estrés oxidativo. Modulación de los niveles de HMOX1

Como hemos visto con anterioridad, el estrés oxidativo tiene un gran peso en el inicio y el desarrollo de la aterosclerosis. ROS y RNS son las responsables de causar este estrés. Por lo tanto, disminuir su concentración a niveles basales es fundamental para poder frenar y revertir la aterosclerosis. Teniendo en cuenta las propiedades antioxidantes y antiaterogénicas del HMOX1 y la ruta NRF2/KEAP1, diversos investigadores han centrado su atención en la posibilidad de potenciar los niveles de estas enzimas como estrategia prometedora para frenar o combatir el proceso aterosclerótico [111, 112]. De nuevo este enfoque también se plantea desde distintos puntos de vista. Existen planteamientos basados en la farmacoterapia con arginina o hemo-arginato [10]. La administración de estos compuestos inducen a HMOX1, lo que provoca entre otros efectos la disminución de la producción de VCAM1, manteniendo la producción de eNOS [113]. Otros inductores usados son los derivados o análogos del grupo hemo como la hemina, que aumentaban la concentración de HMOX1, aunque en ensayos clínicos han demostrado poca efectividad, ya que a los pocos días se dejaba de sobreexpresar HMOX1 [114]. La protoporfirina de cobalto, un precursor del grupo hemo en el que se ha sustituido el hierro por cobalto, también ha sido usada pero con resultados no muy buenos, debido a la gran cantidad de reacciones adversas [112]. En esta línea, también son habituales los activadores o inductores de NRF2, como la canagliflozina o la melatonina [115, 116]. También son usadas sustancias como el ácido fumárico, que reaccionan con los tioles de las

cisteínas de KEAP1 que se unen a NRF2. De esta manera estas moléculas consiguen activar el NRF2 y que se transloque al núcleo, favoreciendo la expresión de enzimas antioxidantes [117].

Otros investigadores han optado por el uso de productos naturales antioxidantes como la curcumina, el resveratrol, la quercitina o el ácido lipoico [118, 119]. En el caso de la curcumina induce la expresión de HMOX1 mediante la activación de NRF2. Polifenoles y sus derivados como el resveratrol y el piceatannol o el gelato de epigallocatequina han demostrado aumentar la expresión de HMOX1 a través de la ruta del NRF2. Aunque estos tratamientos se han demostrado efectivos, posibles efectos adversos (la curcumina a dosis altas ha mostrado un efecto mutagénico) o sus bajas biodisponibilidades, como en el caso del resveratrol, hacen necesarios estudios más exhaustivos y el uso de posibles análogos sintéticos [112, 119, 120].

Por otro lado, el uso de terapias inductoras de HMOX1/NRF2 debe ser estudiado muy en profundidad, ya que existe la posibilidad de un comportamiento proaterogénico debido al aumento de la expresión de NRF2. Este efecto a priori paradójico, puede estar relacionado con los macrófagos y los neutrófilos. Se barajan varios posibles mecanismos para explicar esto, desde la polarización de los macrófagos a fenotipos proaterogénicos inducidos por NRF2 a una mayor migración de monocitos a los vasos [77].

El enfoque genético también se ha sido tratado por muchos autores. En modelos animales se han demostrado que la administración del gen *hmx1* consigue reducir la lesión, pudiendo sobreexpresar HMOX1 a largo plazo [121-123]. Sabaawy et. al. usó vectores retrovirales para introducir el gen de *hmx1* en ratas hipertensas SHR, obteniendo la sobreexpresión de HMOX1 y una disminución de la hipertensión [121]. Mediante el mismo mecanismo en células madre mesenquimales Pejman Hamedi-Asl et al lograron que dichas células mostrasen mejor resistencia al estrés oxidativo [122].

1.3.4. Terapia celular angiogénica

Una nueva aproximación se está abordando en la actualidad. Se basa en promover el proceso de angiogénesis, esto es, la inducción a la formación de nuevos vasos (angiogénesis) y el crecimiento de capilares y arterias colaterales a la zona de lesión a partir de vasos preexistentes (arteriogénesis) [124]. Puede ser una gran ayuda sobre todo a aquellos pacientes que habiendo sido intervenidos sufren reestenosis, o aquellos que no pueden ser intervenidos.

Este abordaje puede hacerse de distintas formas, ya sea suministrando distintos factores de crecimiento como el VGEF, mediante terapia génica o mediante terapia celular [97, 125].

Uno de los tipos celulares más empleadas en la terapia angiogénica son las células endoteliales progenitoras (EPC) [2]. Las EPC son células mononucleares progenitoras aisladas por primera vez de sangre periférica por Asahara et al en 1997 [126]. Son células con capacidad de diferenciarse a células endoteliales y de formar nuevos vasos [127]. Existe bastante confusión a la hora de definir de forma exacta que es una EPC y los tipos que hay. En función del protocolo usado para el cultivo de EPCs, podemos tener 3 poblaciones distintas. Al 5º día de cultivar la fracción de células mononucleares de sangre periférica (Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC por sus siglas en inglés) en medio específico de EC, se obtienen EC adheridas a la superficie de cultivo y en suspensión. La fracción adherente al 7º día de cultivo, acaban originando células angiogénicas circulantes (CAC). Entre el 7º y el 21º día maduran a EC formadoras de colonias (ECFC). Por su parte, si se cultivan las células no adherentes de 4 a 5 días, madurarán a unidades formadoras de colonias EPC (CFU-EPC), comúnmente denominadas tardías [128]. Hay autores que sostienen que las CAC se generan a partir de las condiciones de cultivo, pero que no existen como tales en el torrente sanguíneo, por lo que se ha propuesto el nombre de células angiogénicas mieloides (MAC). Así la definición correcta de MAC sería “células mononucleares de sangre periférica cultivadas en condiciones de cultivo de células endoteliales, que se caracterizan por un inmunofenotipo representado como positivo para CD45, CD14, CD31 y negativo para CD146, CD133 y Tie2 [127]. Las CFU y las CAC tienen poca capacidad proliferativa y no son capaces de formar estructuras *in vitro*. De estas dos, sólo las CFU son capaces de formar colonias. Las ECFC por su parte, si son capaces de formar estructuras *in vitro* (capilares). No son hematopoyéticas y tienen una alta capacidad proliferativa [129]. El papel de las EPC en la angiogénesis está relacionado con su capacidad paracrina. Son reclutados en la zona de la lesión, donde liberan metaloproteasas que descomponen la membrana basal y liberan distintos compuestos quimioatrayentes que reclutan EC a la zona, configurando un nuevo vaso [130].

Tabla 5. Características de los distintos tipos de EPCs. Basile et. al. 2014 [129, 131].

	CFU	CAC	ECFC
Marcadores	CD34 ^{+/-}	CD34 ^{+/-}	CD34 ^{+/-}
	Cd133 ⁺	Cd133 ⁺	Cd133 ⁻
	VEGFR2 ⁺	VEGFR2 ⁺	VEGFR2 ⁺
	CD45 ^{+/-}	CD45 ^{+/-}	CD45 ⁻
	CD146 ^{+/-}	CD146 ^{+/-}	CD146 ⁺
	CD115 ⁺	CD115 ⁺	CD115 ⁻
	CD31 ⁺	CD31 ⁺	CD31 ⁺
	ALDH ^{bright}	ALDH ^{bright}	ALDH ^{bright}
	acLDL ^{uptake}	acLDL ^{uptake}	acLDL ^{uptake}
Forma colonias	Sí	No	Sí
Hematopoyesis	Sí	Sí	No
Capacidad de proliferación	Baja	Baja	Alta
Capaz de formar estructuras	No	No	Sí
Capacidad secretora	No	Sí	No
Capacidad vasculogénica	No	No	Sí

La endotelización es una terapia que se está estudiando en la actualidad. Consiste en crecer distintos tipos de células sobre los dispositivos que van a ser implantados como los stent. EPC y las MSC son las más prometedoras que se están usando. Esta tecnología aún cuenta con algunos inconvenientes como que las superficies que se usan no facilitan que las células se queden adheridas y proliferen o que son muy susceptibles a las contaminaciones; aparte de que con la edad el número y funcionalidad de las EPC disminuye [128, 129].

Se están estudiando diferentes métodos para tratar las superficies y que las células cumplan su función, así como los tipos de células o mezclas de ellas que pueden dar un mejor

resultado como las EC tardías o las células madre mesenquimales (MSC) o la mezcla de ambas [129].

Otros autores plantean el uso de los secretomas de EPC sometidas a hipoxia como posibles terapias. Felice et. al. [132], comprobaron que la liberación controlada de los secretomas de EPC, mediante el uso de nanopartículas, aumentaba significativamente la formación de capilares. Resultados similares obtuvieron Chen et al, usando hidrogeles como vehículo para la liberación controlada del secretoma [133].

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

Resultados previos del grupo de investigación señalaron que la incubación *ex vivo* de EPCs de donantes sanos con los secretomas de arterias carotídeas ateroscleróticas promueve cambios de expresión proteica relacionados con la activación de estas células [134]. En concreto, se observó un aumento de la movilidad y proliferación celular, así como cambios proteómicos relacionados.

En base a estos resultados preliminares, en el presente trabajo de investigación se planteó que la incubación de células EPCs aisladas de individuos sanos con el secretoma de factores ateroscleróticos podría afectar los niveles de expresión de HMOX1, así como otros factores relacionados con la vía de señalización de HMOX1. Más aún, se planteó que los niveles de expresión de HMOX1 y otras proteínas relacionadas podría variar en EPCs en forma dosis-tiempo dependiente, esto es, en función del tiempo de incubación, así como de la concentración de secretoma aterosclerótico administrada. Entender en qué condiciones se estimula la expresión de ésta y otras proteínas antioxidantes relacionadas permitiría modular a dichas células para potenciar su papel regenerativo y antiaterosclerótico.

De acuerdo con esto, se plantearon los siguientes objetivos:

O1. Analizar los cambios de expresión génica de HMOX1 en condiciones basales (EPC control) y tras la incubación de las EPC con factores ateroscleróticos (EPC+AP) o en presencia del secretoma de arterias no ateroscleróticas (EPC+MA).

O2. Estudiar la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) de distintos genes relacionados con la expresión de HMOX1: Nrf2, NQO1, GCLM, GCLS, HSF1, KEAP1, implicados en las rutas de expresión de HMOX1 en EPCs en respuesta a los factores ateroscleróticos en distintas condiciones y tiempos.

O3. Estudiar los cambios en la expresión de proteínas que codifican dichos genes, mediante western-blot.

O4. Comparar los datos genómicos y proteicos

O5. Verificar la posible translocación de Nrf2 o HSF1 al núcleo en condiciones ateroscleróticas mediante western-blot y/o inmunocitoquímica.

O6. Analizar los cambios de expresión génica (mediante RT-qPCR) y/o proteica (western-blot) de proteínas que se encuentran por debajo en la vía de la HMOX1: Ferritina, biliverdin-reductasa.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Obtención de las muestras biológicas

Este estudio fue englobado dentro del proyecto “Validación de Biomarcadores y Terapia celular alternativa en Aterosclerosis basada en la modulación de EPC y células T reguladoras”, financiado por el Plan Estatal de I+Di 2013-2016 (ISCIII PI16-00784) y la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía-FEDER (PI0026-2017) y aprobado por el comité ético de Cádiz. Para la obtención de todas las muestras biológicas se siguieron las directrices de la Declaración de Helsinki. A su vez, los donantes fueron informados de los objetivos del proyecto, y permitieron el uso de sus muestras tras la firma del correspondiente consentimiento informado.

3.1.1. Obtención de los sobrenadantes arteriales

3.1.1.1. Placas ateroscleróticas

Las muestras de placas ateroscleróticas se obtuvieron mediante endarterectomía carotídea en el Hospital Universitario Puerta del Mar de Cádiz y el Hospital Virgen del Rocío de Sevilla. La región no trombosada se cortó con un bisturí estéril en fragmentos de aproximadamente 0,3-0,4 cm de longitud y 200 mg. Tal y como se puede ver en la figura 15, los tejidos se lavaron varias veces con tampón salino de fosfato (NaCl 137 mmol/L, KCl 2n7 mmol/L, Na₂HPO₄ 10 mmol/L y KH₂PO₄ 1,8 mmol/L) (PBS 1x)(Phosphate Buffered Saline (PBS) de Biowest, Ref: MS008J100F), con objeto de eliminar los restos de sangre. A continuación, los tejidos se lavaron en un medio libre de proteínas, en concreto se utilizó RPMI-1640 (Biowest Ref: MS00UX1004) con penicilina/estreptomicina (P/S) 1X (Gibco Ref:15140-122). Para ello, cada muestra se incubó en placas de 12 pocillos, con 1.5 ml de RPMC-1640, a 37 °C y 5% CO₂, descartando el medio tras una hora y repitiendo este paso 4-5 veces más para asegurar un lavado óptimo. Por último, se descartó el medio y se incubaron las piezas de tejido en el mismo medio 72 horas a 37 °C y 5% CO₂. Pasado este tiempo, el sobrenadante se recogió en tubos de

1,5 ml y se cuantificó la cantidad de proteína mediante espectrofotometría, a 555 nm con reactivo de Bradford (VWR, Ref.: E530-1I), siguiendo protocolos convencionales. Para la cuantificación se construyó una curva patrón a partir de una disolución madre 1,4 ng/ μ l de albúmina de suero bovino (BSA) en RPMI-1640. Por último, los secretomas se almacenaron a -80 °C hasta su posterior uso [134].

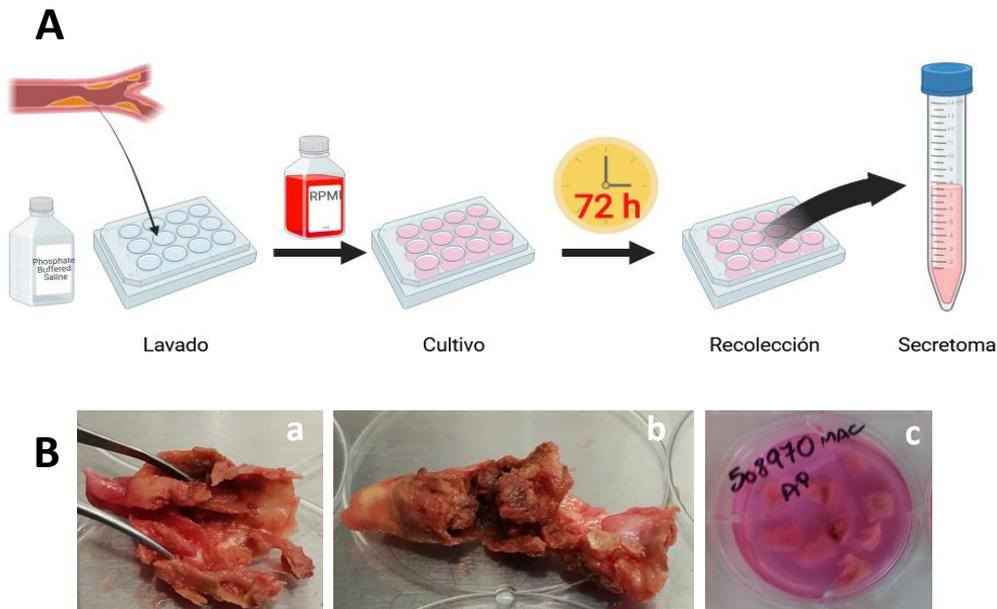


Figura 15. A) Flujo de trabajo seguido para la obtención de secretomas ateroscleróticos. B) Imágenes correspondientes a ejemplos de fragmentos de arterias carotídeas complicadas con placa de ateroma, trombosadas, empleadas para la obtención de los secretomas (a, b) y fragmentos de arteria carotídea en RPMI después de la incubación de 72 h.

3.1.1.2. Arterias mamarias

Las arterias mamarias no ateroscleróticas, se obtuvieron a partir de pacientes sometidos a una cirugía de reemplazo de válvulas cardíacas [134], en colaboración con la Unidad de Angiología y Cirugía Vascul ar del Hospital Virgen Macarena, Sevilla.

El protocolo seguido para la obtención de los sobrenadantes de las arterias mamarias fue el mismo que se ha descrito anteriormente para las arterias carotídeas [134].

3.1.2. Obtención de las EPC

Las EPC, se aislaron a partir de bolsas de sangre de donantes sanos mediante un gradiente de densidad con medio de separación de Linfocitos ((Lymphocytes Separation Media de Capricorn Scientific, Ref: LSM-A), aislamiento de la fracción PBMCs y cultivo selectivo de esta fracción celular en un medio específico para EC. En este caso se siguió el protocolo descrito en Vega et al [134]. Las bolsas de donantes (“buffy coats”) se obtuvieron a través del Biobanco del Sistema Andaluz de Salud.

Para la obtención de la fracción PBMC (Figuras 16 y 17), la sangre se adicionó lentamente sobre el medio de separación de linfocitos (Lymphocytes Separation Media de Capricorn Scientific, Ref: LSM-A), previamente añadido (13 ml) al tubo de 50 ml, evitando que se mezclen. Tras esto, se centrifugaron los tubos a 1400 g, 12 minutos a 4 °C, con la opción de desconectar el freno activada, para evitar que se mezclen las distintas fracciones durante el frenado.

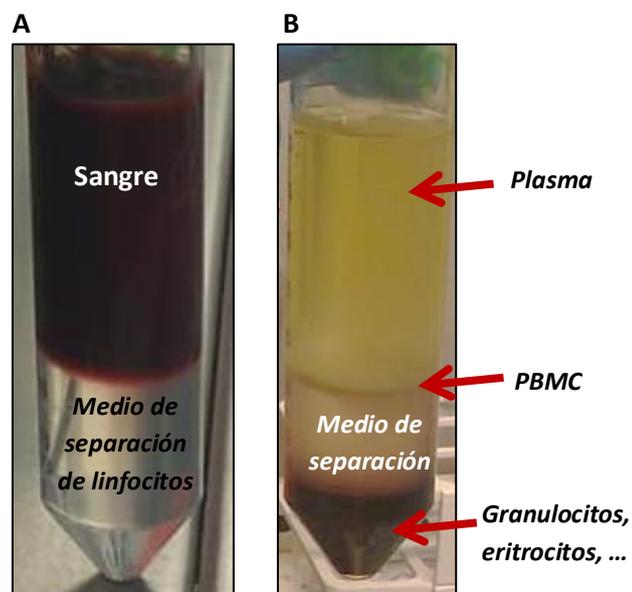


Figura 16. Aislamiento de EPCs a partir de sangre periférica mediante gradiente de densidad. A) Mezcla de medio de separación de linfocitos y sangre previa a la centrifugación. B) Fracciones obtenidas tras la centrifugación, entre ellas la fracción intermedia que consiste en el halo de PBMCs.

La fracción correspondiente a las PBMC se recogió y se lavó dos veces con PBS 1X, centrifugando cada vez a 400 g, 10 minutos, 4 °C, sin freno. En un segundo lavado, sin retirar el PBS, se contaron las células con una cámara Newbauer, y se resuspendieron en medio específico para el crecimiento de EC EBM-2 (LONZA, CC-3156), suplementado con factores de crecimiento específicos (LONZA, Ref: CC-4176), suero bovino fetal (FBS) al 5% y penicilina/estreptomicina (Gibco Ref:15140-122). Por último, las células se sembraron en placas de 12 pocillos (106 PBMC/pocillo), previamente tratadas con fibronectina (Panreac A8350,0005) a una

concentración de 1 mg/cm^2 , y se incubaron durante 7 días a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y $5\% \text{ CO}_2$. Al cuarto día de cultivo, se realiza un cambio de medio, para eliminar las células no adherentes y renovar los factores de crecimiento, tal como se describió en Vega FM et al [134].

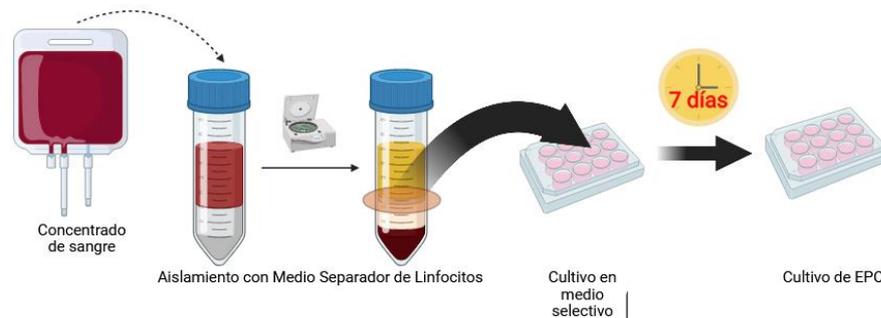


Figura 17. Flujo de trabajo para la obtención de las EPC estimuladas con secretomas.

3.1.3. Caracterización de las EPC

Para confirmar la identidad de las EPCs, se analizaron varios marcadores específicos mediante citometría de flujo, como se describe en Beltrán-Camacho 2020 [135]. El instrumento usado para ello fue un CytoFLEX (Beckman Coulter, USA). Las EPC en cultivo se recogieron al séptimo día de haber sido aisladas del buffy, para lo cual se tripsinizaron y lavaron con PBS 1X (1 ml), se centrifugaron a 400 g , 10 min , $4 \text{ }^\circ\text{C}$, recogiendo el pellet celular, que se resuspendió en 1 ml de PBS 1X. Tras ello, $100 \text{ } \mu\text{l}$ de esta disolución celular se incubaron con los anticuerpos específicos para los marcadores (tabla 6): CD14, CD31, CD34, CD37, CD45, CD90, CD105, CD133, CD146 y CD 309, durante 60 minutos a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ y en oscuridad. Como control negativo, se usó un control isotipo de anticuerpo de IgG1 (Becton Dickinson 345816). Los datos obtenidos se procesaron con el programa CytExpert 1.0 (Beckman Coulter) (Figura 18).

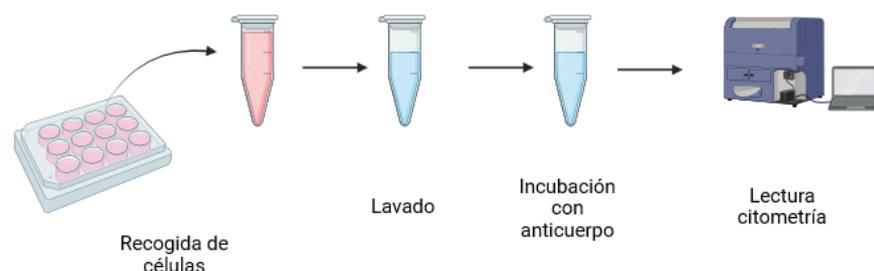


Figura 18. Flujo de trabajo para el ensayo de citometría.

La tabla 6 incluye un listado de anticuerpos empleados en la caracterización celular.

Tabla 6. Anticuerpos empleados para la caracterización de EPCs, mediante citometría de flujo:

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial	Referencia
CD14-FITC	1:25	Biologend	367115
CD31-FITC	1:25	Biologend	303103
CD34-APC	1:25	Biologend	343607
CD45-PBlue	1:25	Biologend	368539
CD73-FITC	1:25	Biologend	344015
CD90-PE	1:25	Biologend	328109
CD105-FITC	1:25	Biologend	323203
CD133-PE	1:25	Miltenyi Biotec	130-098-826
CD146-PE	1:25	Biologend	361005

3.1.4. Incubación de EPCs con secretomas arteriales ateroscleróticos y no ateroscleróticos

Al séptimo día del aislamiento de las EPC y su cultivo en placas de 12 pocillos, éstas se incubaron con los sobrenadantes obtenidos de las arterias carotídeas ateroscleróticas y de las arterias mamarias no ateroscleróticas recogidas previamente (3 pocillos por condición), siguiendo el protocolo descrito en Vega et al [134]. Se retiró el medio, y se añadió una disolución de secretoma en medio EGM-2. Se añadieron 50 µg de secretoma por pocillo en un volumen final de 750 µl de medio EGM-2, correspondiente a una concentración de 66 ng/µl. Los controles solamente se incubaron con 750 µl de medio EGM-2. Las células se incubaron a 37 °C y 5% CO₂, durante 24 horas. Pasado este tiempo, se retiró el medió, se lavaron las células con PBS 1x y se despegaron de las placas usando tripsina 1x (Trypsin-EDTA 10x de Biowest, Ref: MS00TG100Q).

Las células se recolectaron en un tubo de 1,5 ml, y se centrifugaron a 400 g 5 minutos a 4 °C. Por último, se descartó el sobrenadante y las células se almacenaron a -80 °C (Figura 19).

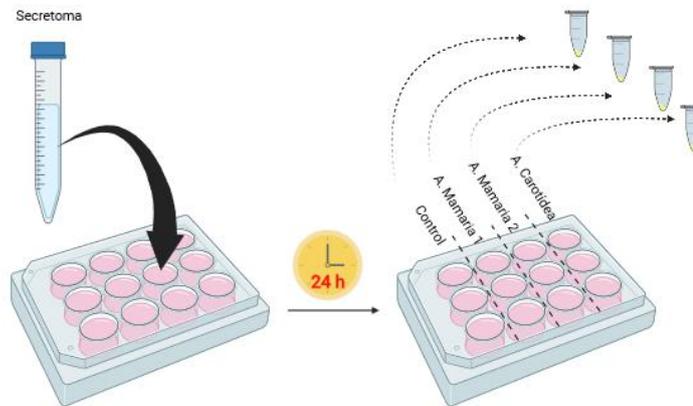


Figura 19. Flujo de trabajo para la obtención de EC estimuladas con secretomas arteriales.

3.1.5. Incubación de las EPCs con secretomas ateroscleróticos a distintas concentraciones y distintos tiempos

Para analizar el efecto de los secretomas ateroscleróticos a distintas concentraciones y distintos tiempos, se procedió nuevamente como se describe en Vega et al [134] pero modificando las condiciones de cultivo. Para ello, a día 7 tras el aislamiento celular, se retiró el medio de cultivo EBM-2, y a continuación se añadió el medio EBM-2 con la cantidad de secretoma correspondiente a concentraciones de 66,67 ng/μl, 133,34 ng/μl y 200 ng/μl, incubando las EPCs con las distintas concentraciones durante 30 min, 4 h y 24 h a 37 °C y 5% CO₂. En este caso se emplearon 4 pocillos por condición, para tener cantidad suficiente de células, que se recogieron luego en un mismo tubo de 1.5 ml.

Una vez pasado este tiempo, se retiró el medio a las células, se lavaron con PBS 1x y se despegaron de las placas de cultivo usando tripsina (Trypsin-EDTA 10x de Biowest, Ref: MS00TG100Q). Las EPC se recogieron en tubos de 1,5 ml y se centrifugaron a 400 g durante 10 minutos. Por último, se descartó el sobrenadante y el sedimento de células o bien se congeló a -80 °C, o bien se usó en el momento, tal y como se puede ver en la figura 20.

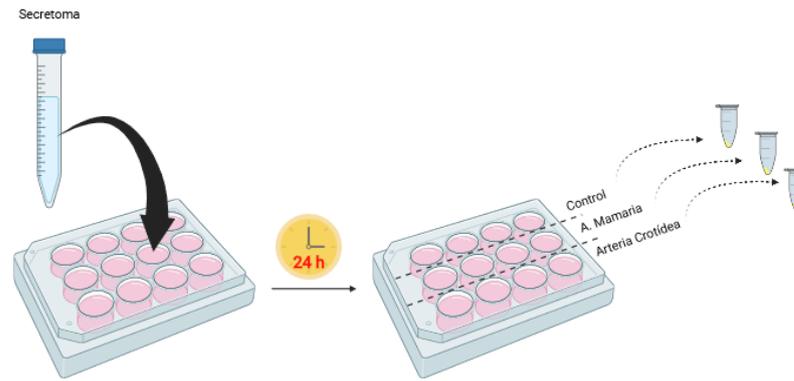


Figura 20. Nuevo flujo de trabajo para la obtención de EC estimuladas con secretomas arteriales.

3.2. Análisis de expresión génica

Para la obtención de los datos de expresión génica, se usaron los sedimentos de células obtenidos de la centrifugación de las EPC estimuladas con los secretomas (Figura 21). A éstos se les realizó la extracción de ARNm y purificación de ARN, una retro-transcripción a ADN (c-DNA) y por último la reacción de qPCR.

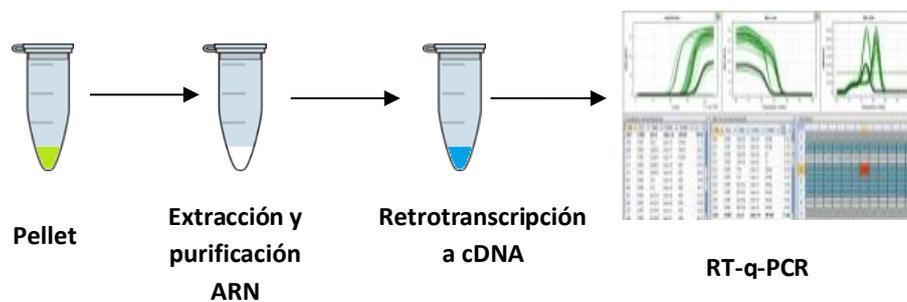


Figura 21. Esquema del flujo de trabajo para la obtención de los datos de expresión génica.

3.2.1. Extracción y purificación del ARN total

Para la extracción del ARN total se usó el kit de Zymo Research: Direct-zol RNA Microprep Kits (Ref: R2050). Este está basado en una mejora descrita por Chomczynski et al en 1987 del método del tiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo desarrollado por Cox et al 1968 [136].

En primer lugar, se resuspendió el pellet de células en el reactivo TRIsure de Meridian Bioscience® (Ref: BIO-38032). En este paso se consiguió la lisis de la célula, así como la eliminación de las ADNasa y ARNasa. La mezcla se pasó a una columna, donde quedó retenido el ARN. Tras varios pasos de limpieza y un tratamiento con DNasa I (Dnase I (1500 U) de Zymo Reseach, Ref: E1011-A), el ARN se recolectó en un tubo de 1,5 ml en 25 µl de agua. Todo el material usado debe ser libre de ARNasa/ADNasa.

Por último, el ARN recolectado se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm/ 280 nm con un lector de microplacas multimodo BioTek Synergy MX (BioTek Instruments, Inc). Mediante la absorbancia a 260 nm, se obtuvo la concentración del ADN. Por su parte, la absorbancia a 280 nm nos sirvió para conocer la pureza del ARN obtenido, mediante el ratio A280/A260 [137]. Según los criterios usados por el Banco Nacional de ADN Carlos III para la pureza del ARN, un ratio por debajo de 1.7 indica una contaminación con compuestos aromáticos; entre 1,7 y 2.0 indica una calidad aceptable y entre 2.0 y 2.2 la pureza es óptima [138].

3.2.2. Retrotranscripción del ARN a ADN

Para la extracción del ARN se usó el kit qScript cDNA Synthesis Kit de QuantaBio (Ref:95047-025). Este kit es un sistema bicomponente que trae por un lado una mezcla de retrotranscriptasa de síntesis conocida como MMLV (Moloney murine leukemia virus) y una proteína inhibidora de ribonucleasas. Por otro lado, trae una mezcla de cebadores aleatorios (normalmente hexámeros) y oligo dT, que se unirá a la cola de poliA del ARN. Todas las retrotranscripciones se normalizaron frente a una cantidad concreta de ARN de partida. En el presente trabajo, la concentración final de ADN que se usó en las qPCR estaba calculada para 0,25 ng/µl de ARN de partida. Una vez tomado el volumen de ARN necesario, se completó hasta 15 µl con agua libre de nucleasas; se adicionó 1 µl de enzima y 4 µl de la disolución tampón con los nucleótidos. Se siguió el protocolo estándar recomendado por el kit:

- Un ciclo de 22 °C 5 minutos.
- Un ciclo de 42 °C 30 minutos.
- Un ciclo de 85 °C 5 minutos

Las muestras se usaron en el momento, o se congelaron a -80 °C.

3.2.3. PCR cuantitativa o a tiempo real (RT-qPCR)

3.2.3.1. Diseño de cebadores

Antes de la realización de los análisis de RT-qPCR, fue imprescindible optimizar la reacción. Para ello se diseñaron *in silico* los cebadores que se usarían en los ensayos de expresión génica. Por último, hubo que testarlos en el laboratorio y calcular su eficiencia, para comprobar su optimización.

Para el diseño de los cebadores se siguieron dos estrategias distintas: Búsqueda en bibliografía y diseño bioinformático empleando el programa Oligo-explorer.

En ambos casos los cebadores fueron probados *In silico* para verificar que se ajustaban a las necesidades del proyecto.

Búsqueda bibliográfica:

Se consultó bibliografía, para los diversos genes humanos con los que se ha trabajado, con la ayuda de la base de datos de Pubmed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

En la tabla 7, se recogen los cebadores usados recopilados de la bibliografía.

Tabla 7. Lista de cebadores usados en el presente trabajo, recopilados de la bibliografía.

Gen	Secuencia	Pb	Tm	Amplificación	Bibliografía
BLVR-A.2 Fw	CCACTTTGGAAGAGCGAAAGG	21	61	180	[139]
BLVR-A.2 Rv	GACCCAGACTTGAAATGGAAGCT	23	63		
BLVR-B.2 Fw	GACCTCAGTCCCACGACAGT	20	63	110	[139]
BLVR-B.2 Rv	GTCCACACCATGAGCCTTCA	20	60		
FHC.1 Fw	CATCAACCGCCAGATCAAC	19	57	379	[140]
FHC.1 Rv	GATGGCTTTCACCTGCTCAT	20	58		
GADPH Fw	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	19	59	225	[141]
GADPH Rv	GAAGATGGTGATGGGATTTTC	20	56		
NRF2 Fw	CGGTATGCAACAGGACATTG	20	58	280	[142]
NRF2 Rv	ACTGGTTGGGGTCTTCTGTG	20	60		

Diseño de cebadores in silico:

Para el diseño *In silico* de los cebadores, el primer paso fue la obtención de la secuencia del gen de interés. De nuevo se recurrió a las bases de datos, en esta ocasión se buscaron las secuencias en la base de datos Nucleotide, recurso de acceso libre online del NCBI. En el caso del presente proyecto, todo el ADN que se obtuvo, fue por retrotranscripción de ARN. Por lo tanto, fue importante tener en cuenta que las secuencias elegidas, fueran obtenidas por retrotranscripción de ARNm. De lo contrario, al realizar el diseño del cebador podríamos estar trabajando, sin saberlo, sobre los intrones del gen. Es decir, sobre una parte del gen que no está presente en el ARNm.



Figura 22. Diseño de los cebadores, realizado con el programa Oligo Explorer v 1.5. En esta figura se representa como ejemplo el diseño de cebadores para HSF1. La secuencia en negro se corresponde con la secuencia de nucleótidos del gen. La secuencia en rojo, se corresponde con la secuencia de nucleótidos del cebador directo, mientras que la azul es la del cebador indirecto. Más arriba, en cada posición correspondiente a un nucleótido, vemos dos puntos que se corresponden con la temperatura de fusión que tendría el cebador que tendría su extremo 3' en esa posición y con el tamaño indicado (azul para el directo, y rojo para el indirecto). En la esquina inferior derecha tenemos un recuadro con las características del cebador.

Una vez obtenida la secuencia del gen, ésta se volcó en el programa Oligo Explorer v. 1.5. En la figura 22 podemos ver el programa con la secuencia de HSF1. Como se ve en la Figura 22, el programa permite diseñar los dos cebadores a la vez, viendo cómo interactúan entre ellos, y teniendo en cuenta la Tm.

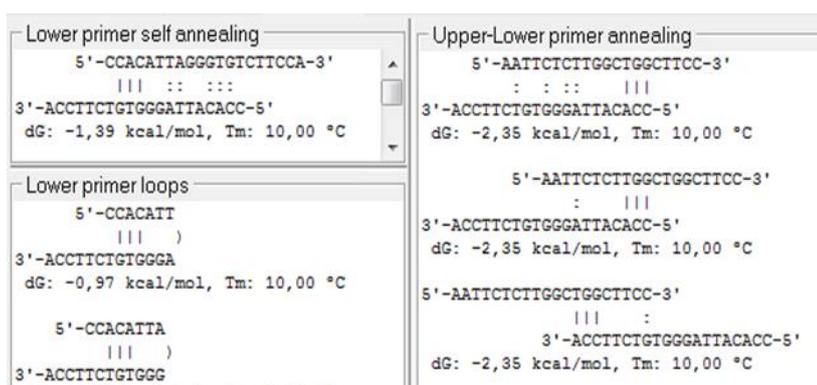


Figura 23. Ejemplo de un cebador con los tres tipos de uniones inespecíficas: auto anillamiento, arriba a la izquierda; lazos abajo a la izquierda; y a la derecha, el anillamiento entre la molécula directa e inversa. Imagen tomada del programa Oligoexplorer.

Es importante que tanto los cebadores, como el amplicón formado, tuvieran unas características fisicoquímicas muy concretas para el óptimo funcionamiento de la reacción [143]:

- Ambos cebadores debían tener una temperatura de fusión lo más próxima entre ellos.
- En lo posible, no debían tener uniones inespecíficas (Figura 23): auto anillamientos ((self-anneling) una de las moléculas de la pareja de cebadores tiene una región que es complementaria a sí misma, de tal forma que en lugar de unirse al ADN se unen entre ellas formando dímeros), ni lazos ((loops) la región 5' de un cebador es complementaria a la 3', provocando que el cebador reaccione consigo mismo), ni presentar anillamiento cruzado entre el cebador directo e inverso. Si los hay, debían de tener una energía libre de Gibbs lo más alta posible, para que su formación fuera lo menos espontánea posible. Estas uniones "inespecíficas" de los cebadores, hacen que su disponibilidad baje, por lo que la eficiencia de la reacción de qPCR disminuye.
- El tamaño de los cebadores debía de estar preferiblemente entre 18-22 pb.
- La temperatura de fusión de los cebadores debía de estar en el rango de utilización de la polimerasa. En nuestro caso 55-65 °C. Para facilitar el procedimiento experimental, en este trabajo, se intentó que todos los cebadores tuviesen una temperatura de fusión en torno a 60 °C.
- El amplicón, preferiblemente, debía de estar comprendido entre 100-200 pb.
- El % de GC debía de ser similar en ambos cebadores, para estar seguros de que tienen una temperatura de fusión similar.
- El % de GC en el extremo 5' debía ser lo más bajo posible, ya que producen horquillas con DG mayores.

Una vez elegidos unos candidatos que se ajustaban lo más posible a estos criterios, se recurrió al programa Oligo Analyzer v1.5 para verificar dichas propiedades, tal y como podemos ver en la figura 24, para el caso de HMOX1.

Por último, se confirmó que el tanto los cebadores directos como inversos en cuestión tuviesen una alta afinidad por la secuencia de estudio de humanos. Para ello usó la herramienta bioinformática Primer-Basic Local Alignment Search Tool (Primer-BLAST). Este programa, de acceso libre, compara las secuencias de estudio con todas las posibles secuencias que tiene

almacenadas en su base de datos, generando una ventana con todas las posibles coincidencias ordenadas de mayor a menor prioridad (Figura 25).

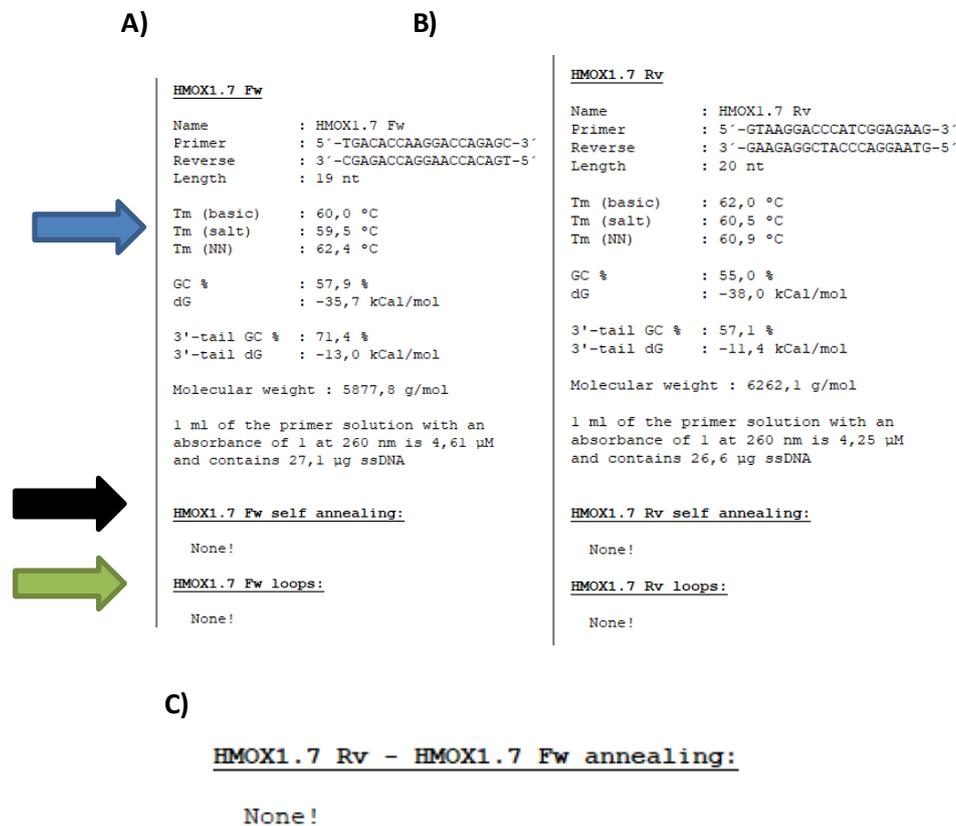


Figura 24. A) Informe obtenido con el programa Oligo Analyzer v. 1.5 para el cebador directo de la HMOX1. La flecha azul señala las temperaturas de fusión (Tm). La Tm (basic) es una aproximación en la que solo tiene en cuenta las bases nitrogenadas, la Tm (salt) tiene en cuenta parámetros del nucleótido en disolución salina, y la Tm (NN) (Next Neighbour), que tiene en cuenta las interacciones entre moléculas de cebador adyacentes [144]. B) Informe obtenido del programa Oligo Analyzer v. 1.5 para el alineamiento de la secuencia directa de la HOMX1. La flecha negra señala el autoanillamiento, mientras que la flecha verde señala los lazos. C) Informe obtenido del programa Oligo Analyzer v. 1.5 para uniones secundarias en el alineamiento de las secuencias directa e inversa de la HOMX1.

Detailed primer reports

Primer pair 1						
	Sequence (5'->3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TGACACCAAGGACCAGAGC	19	59.25	57.89	3.00	2.00
Reverse primer	GTAAGGACCCATCGGAGAAG	20	57.11	55.00	4.00	1.00

Products on target templates

>NM_002133.3 Homo sapiens heme oxygenase 1 (HMOX1), mRNA

```

product length = 150
Forward primer 1 TGACACCAAGGACCAGAGC 19
Template       747 ..... 765
Reverse primer 1 GTAAGGACCCATCGGAGAAG 20
Template       896 ..... 877

```

>NM_017877.4 Homo sapiens solute carrier family 35 member F6 (SLC35F6), mRNA

```

product length = 1126
Forward primer 1 TGACACCAAGGACCAGAGC 19
Template       912 C.T.....A.T.... 930
Forward primer 1 TGACACCAAGGACCAGAGC 19
Template       2037 ..A.....C..... 2019

```

Figura 25. Registros de Blast primer design para los cebadores elegidos para la HMOX1. Como se puede ver, el primer registro es el único que es específico, el segundo, presenta ya varios cambios en sus bases nitrogenadas.

3.2.3.2. Dilución de los cebadores.

Las diluciones de los cebadores se realizaron siguiendo las especificaciones de la casa comercial (Metabion International AG). Los cebadores fueron suministrados por la casa comercial liofilizados. El primer paso para realizar la dilución fue centrifugar los tubos, para asegurarnos que todo el polvo se encontrase en la base del mismo. A continuación, se hizo una disolución stock, diluyendo los cebadores liofilizados en un volumen determinado de agua libre de nucleasas, hasta una concentración de 100 mM. Es importante señalar que la concentración de trabajo fue un décimo de la dilución stock. Es decir que un volumen de esta disolución madre fue diluida en 9 volúmenes de agua libre de nucleasas, quedando a una disolución final de trabajo de 10 mM.

3.2.3.3. Cálculo de las eficiencias de los cebadores:

Para medir cómo de eficientes eran las reacciones de la RT-qPCR con nuestros cebadores, se recurrió a la fórmula [145]:

$$\%Eficacia = \left[\left(10^{\frac{-1}{s}} \right) - 1 \right] \cdot 100$$

Donde la *s* es la pendiente de la recta. Ésta, se calculó mediante una recta de diluciones estándar de una muestra control, y con el programa Excel 2010. Inicialmente se partió de diluciones seriadas 1:10 de una muestra control. Partiendo de una concentración inicial de 25

ng/μl. Debido a que la última concentración fue demasiado pequeña, y la disolución de partida fue demasiado alta, para solucionarlo se recurrió a realizar las curvas de calibrado con diluciones 1:5. Así se obtuvieron más puntos para la recta ((5, 1, 0.2, 0.04, 0.008) ng/μl).

A la hora de representar los datos, dado que el crecimiento de la qPCR es exponencial, se representó el número de ciclos a partir del cual se distingue la fluorescencia de la señal del ruido de fondo (Ct), frente a log de la concentración. De esta forma nos aseguramos que la gráfica fuese de tipo lineal (Figura 26).

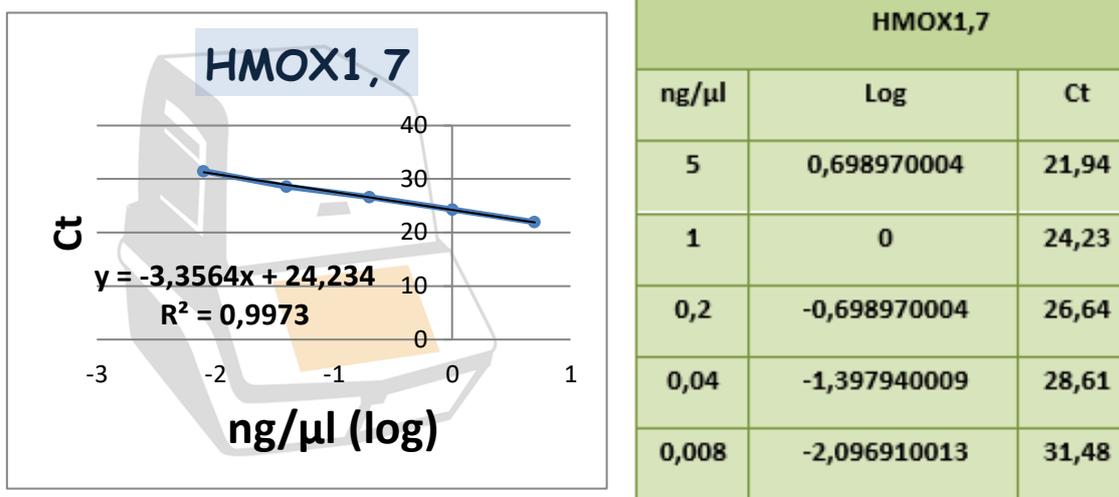


Figura 26. Tabla de valores obtenida para la eficiencia de la HMOX1, y representación gráfica de los valores de la tabla.

3.2.3.2. Ensayos de qPCR

Una vez optimizados los cebadores, se procedió a realizar las qPCR. En placas blancas de 96 pocillos Hard-Shell® 96-Well PCR Plates de Bio-Rad Laboratories (HSP9655), se cargaron por pocillo 0,5 μl de cada cebador, 5 μl de la mezcla de reacción (PerfeCTa SYBR® Green FastMix de QuantaBio (95072-012)) y 4 μl de muestra. Cada muestra se realizó por triplicado. A continuación, se centrifugaron las placas para que todo el volumen esté en el fondo del pocillo. Por último, se realizó la qPCR en el termociclador CFX Connect de Bio-Rad Laboratories, siguiendo el siguiente protocolo:

- Un paso de 95 °C durante 30 segundos.

-44 ciclos de 95 °C durante 5 segundos y 60 °C durante 60 segundos. Al final de cada ciclo se realizó la medición de la fluorescencia.

-Para la curva de melting, una vez finalizados los ciclos, se calentó a 95 °C 10 segundos.

-Se redujo la temperatura a 65 °C y se aumentó a razón de 0,5 °C cada 5 segundos hasta alcanzar los 95 °C. Cada 5 segundos se midió la fluorescencia.

3.3. Análisis de expresión proteica

3.3.1. Fraccionamiento

Como se comentó con anterioridad en la introducción, la ruta de señalización de la HMOX1 comienza con la translocación de ciertas proteínas citosólicas al núcleo para promover la síntesis de esta. Para comprobar cómo se ve influenciada dicha ruta tras el estímulo de los sobrenadantes, se hizo necesario poder analizar por separado las proteínas citosólicas de las nucleares. De esta forma se pretendía comprobar cuál de ellas se translocaba del citosol al núcleo y cuando. Para ello se recurrió a técnicas de fraccionamiento celular por centrifugación diferencial.

Desarrolladas por primera vez por A. Claude [140], existen infinidad de protocolos de fraccionamiento celular. En el presente trabajo se optó por una modificación del protocolo descrito en Dimauro et al [146]. Una vez obtenido el sedimento de células, tal y como se ha descrito anteriormente en el apartado 2.1.3. Como se ve en la figura 27, el sedimento con células se resuspendió en 500 µl de tampón de lisis (10 mM TRIS pH 8, 2 mM MgCl₂, 0.5% Tritón, 0.3 M sacarosa e inhibidores de proteasas) y se dejó actuar en hielo durante 10 minutos. El tampón de lisis realiza una lisis suave de la célula facilitando la ruptura de la membrana celular, pero estabilizando la nuclear para evitar su ruptura. Una vez finalizada la incubación, se centrifugó la disolución a 3500 g durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante obtenido, se correspondía con la fracción citosólica, mientras que el sedimento se correspondía con los núcleos celulares. El sedimento con los núcleos, se lavó con 500 µl de tampón de lisis sin tritón, se centrifugó inmediatamente a 3500 g 10 minutos a 4 °C, se retiró el sobrenadante y el sedimento se lisó con tampón de Laemmli y se desnaturalizó a 95 °C durante 5 minutos y se almacenó a -20 °C. El sobrenadante con la fracción citosólica, se trasvasó a un tubo nuevo donde se dejó precipitando las proteínas hasta el día siguiente en acetona a -20 °C. Pasado este tiempo, se centrifugó a

17000 g 20 minutos a 4 °C, se retiró la acetona sobrenadante y el sedimento obtenido se resuspendió en 20 µl de tampón de Laemmli (50 mM Tris pH 6.8, 10% v/v glicerol, 2% w/v SDS, 0.1% w/v azul de bromofenol). Se desnaturalizó a 95 °C durante 5 minutos y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

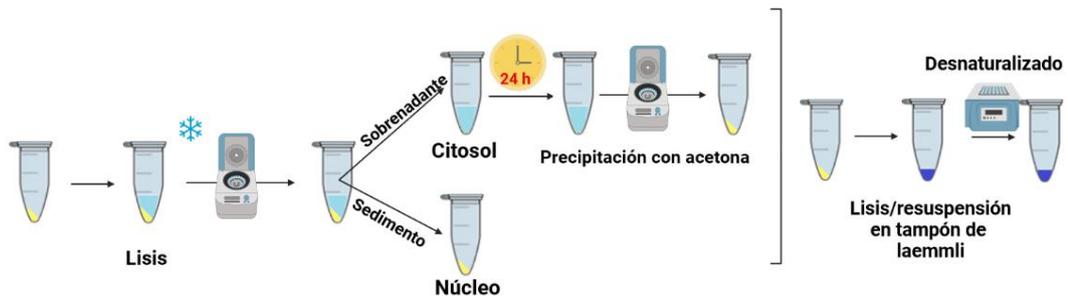


Figura 27. Esquema de trabajo para el fraccionamiento de proteínas.

3.3.2. Western Blot

Para el estudio de la expresión proteica, se usó la técnica de Western Blot. En dicha técnica las proteínas se separaron por pesos moleculares mediante una electroforesis SDS-PAGE en geles de acrilamida. Posteriormente se transfieren a una membrana de PVDF y por último se realizó el inmunoensayo propiamente dicho.

3.3.2.1. Electroforesis en geles de acrilamida

Para la electroforesis se usaron geles de fabricación propia, al 12 % de acrilamida. Se siguió un protocolo estándar y se usó como marcador de pesos moleculares el NZYColour Protein Marker II (MB09002) de Bio-Rad Laboratories.

3.3.2.2. Transferencia a una membrana de PVDF y bloqueo

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se equilibró en solución de transferencia (20 ml de metanol, 20 ml de tampón de transferencia Trans-Blot Turbo 5x Transfer Buffer (1704272) de Bio-Rar y 60 ml de agua ultrapura) durante 10 minutos. Las membranas, antes del equilibrado, fueron activadas con metanol brevemente y lavadas con agua.

La transferencia se realizó en un equipo Trans Blot Turbo Transfer System de Bio-Rad Laboratories, mediante un protocolo estándar de 30 minutos a 1.0 A y 25 V. Una vez terminada la transferencia, las membranas se bloquearon en leche desgrasada al 5% en una solución salina de Tris con un 0,1% de Tween 20 (TBST) durante al menos una hora y en agitación.

3.3.2.3. Inmunoensayo.

Una vez bloqueadas, las membranas fueron incubadas con anticuerpos primarios de HSF1, NRF2, HMOX1, FHC, Lamina A/C (como control nuclear) y B-Tubulina (como control citosólico). Los anticuerpos usados y las concentraciones y tiempos de incubación se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Anticuerpos usados en los ensayos de Western Blot.

Anticuerpos	Referencia	Concentración	Tiempo de incubación
B-Tubulin	Thermofisher MA5-16308	1:1000	1 h
FHC	Thermofisher PA5-27500	1:2000	Toda la noche
HMOX1	Thermofisher MA1-112	1:500	Toda la noche
HSF1	Thermofisher PA5-12181	1:1000	Toda la noche
Lamin A/C	Affinity DF6052	1:1000	Toda la noche
NRF2	ENZO ADI-KAP-TF125	1:1000	Toda la noche
Goat-Antimouse	Invitrogen 62-6520	1:4000	45 minutos
Goat-Antirabbit	NovusBio NB7160	1:4000	45 minutos

Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas en agitación, cada 5 minutos con TBS. 4 veces en total. Se incubaron con el anticuerpo secundario durante 45 minutos en agitación, y por último se lavaron otras cuatro veces con TBST en agitación, cada 5 minutos.

Para el paso final de revelado, se optó por usar el kit de Bio-Rad Laboratories: Clarity™ Western ECL Substrate (1705060). Compuesto por una solución de luminol y otra de H₂O₂, y un equipo ChemiDoc™ Touch imaging System de Bio-Rad Laboratories.

3.4. Análisis de los niveles de ROS

Para el análisis de las ROS, se usó el kit “ROS Detection Assay Kit (DCFDA/H₂DCFDA) de CANVAX (CA0093). En la figura 28 podemos ver el esquema seguido para la detección de las ROS. Este kit recurre a una sonda llamada H₂DCFDA (Diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína), que al ser asimiladas por las células es descompuesta en H₂DCF y grupos acetato por la acción de esterasas intracelulares. El H₂DCF interacciona con las ROS, oxidándose a DCF (2',7'-diclorofluoresceína), que es un compuesto altamente fluorescente [147]. De esta manera, la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad de ROS presentes en el interior celular.

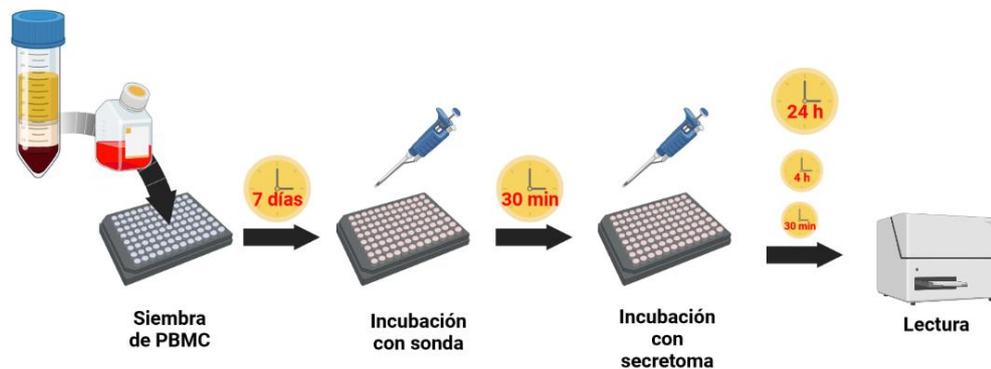


Figura 28. Esquema de los ensayos de ROS.

3.4.1. Cultivo celular para el ensayo ROS

Para minimizar la fluorescencia de fondo, las PBMC obtenidas de los buffy de sangre, se cultivaron en placas negras de fondo transparente de 96 pocillos (Corning Incorporated costar[®] (Ref 3603) (Figura 28). Se sembraron 200.000 PBMC por pocillo en placas previamente tratadas con fibronectina (Panreac A8350,0005). A los 4 días se les cambió el medio, y al 7^º día se realizó el ensayo de ROS.

3.4.2. Ensayo de ROS

El H2DCFDA fue suministrado liofilizado, por lo que fue reconstituido en 500 μ l de DMSO, quedando en una disolución de stock de 20 mM, que fue alicuotada y almacenada a -20 $^{\circ}$ C.

Antes de realizar el ensayo, se diluyó la sonda a la concentración de trabajo (2,5 μ M) en 100 μ l de tampón de ensayo diluido a 1x en agua desionizada. Una vez preparada la sonda, se incubó con las células durante 1 hora a 37 $^{\circ}$ C. Pasado este tiempo, se retiró el medio, y se lavó con el tampón de ensayo 1x. A continuación, se incubaron con los secretomas a concentraciones de 0 ng/ μ l (controles); 66,67 ng/ μ l; 133,34 ng/ μ l y 200 ng/ μ l a 37 $^{\circ}$ C durante 30 minutos, 4 horas y 24 horas. Además, cómo el medio de cultivo (Clonetics [®] EBM[®]-2 de LONZA (CC-3156)) tenía como indicador rojo de fenol, y este emite a 530 nm (al igual que la sonda), se introdujeron varios pocillos únicamente con medio para poder sustraer la señal que produjese el mismo a la obtenida en los cultivos de células.

La fluorescencia de las placas de cultivo se ha leyó en un lector de microplacas multimodo BioTek Synergy MX, con una longitud de onda de absorción de 485 nm y de emisión de 530 nm.

3.5. Análisis estadístico

3.5.1. RT-qPCR: Normalización de los resultados y análisis estadístico

Debido al tamaño muestral y a la cantidad de cebadores usados, se hizo necesaria una forma de poder comparar los datos de cada ensayo. Como base normalizadora se usó el gen GAPDH [148]. También se hizo necesario normalizar dentro de cada ensayo todas las muestras a un control. Para los cálculos de la expresión relativa se usó el método DDCT [149], con el y el programa Excel 2010. Una vez se obtuvieron los datos de expresión relativa, se empleó el programa Graphpad PRISM 9, para el estudio estadístico. A continuación, se estudió la normalidad de los mismos, mediante los test estadísticos Shapiro-Wik y D'Agostino. Por último y debido a que los datos no seguían una distribución normal, se recurrió a un análisis de varianzas ANOVA y a un test de Kruskal-Wallis para el estudio de las diferencias significativas.

Los resultados obtenidos se calcularon con la media SEM y un nivel de significancia $p < 0,05$.

3.5.2. Western Blot: Análisis estadístico

Para el tratamiento de las imágenes adquiridas en el equipo ChemiDoc, se usó el programa de imagen Image Lab 6.0 de Bio-Rad Laboratories. Con él, se consiguió obtener los datos de fluorescencia. Los datos de cada fracción fueron normalizados respecto a su control de carga con el programa Excel 2010 (B-Tubulina para el citosol y Lamina A/C para el núcleo). Por último, a los datos ya normalizados se les sometió a test de normalidad (D'Agostino y Wik) y a un test ANOVA y fueron comparados entre sí mediante un test de Kruskal –Walis con el programa estadístico GraphPad Prism 9. Los resultados mostrados se calcularon con la media SEM y un nivel de significancia $p < 0,05$.

3.5.3. Ensayo de ROS

Los datos de fluorescencia adquiridos, fueron normalizados respecto al control con el programa Excel 2010. Para el tratamiento estadístico, se recurrió como otras veces al programa GraphPad Prim 9, usando un análisis de varianzas ANOVA de dos colas.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterización de las EPC

Las EPCs tienen un aspecto redondeado al principio del cultivo, pero al cabo de los siete días empiezan a adquirir un aspecto alargado más típico de célula endotelial (Figura 29 A).

Mediante inmunocitoquímica se confirmó que estas células son positivas tanto para el marcaje con la lectina UEA1 como para la incorporación de ac-LDL, ambos marcadores asociados a estas células [150].

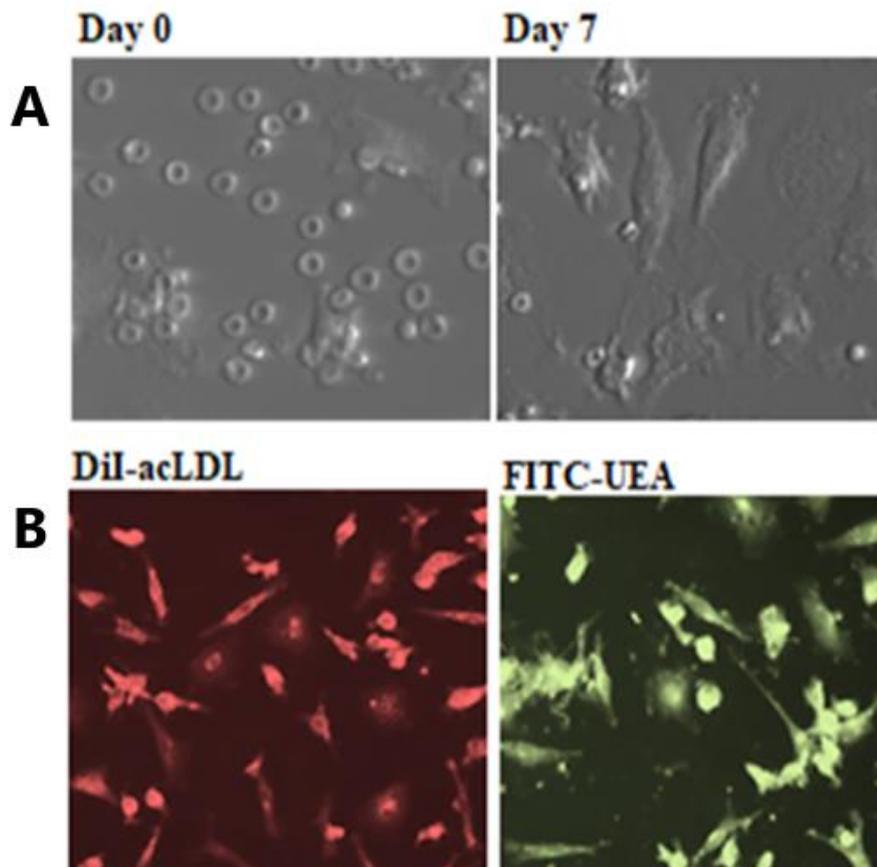


Figura 29. Caracterización de las EPCs. A) Las células EPCs tienen aspecto redondeado los primeros días tras el aislamiento, adoptando una forma más alargada a los 7 días de cultivo. C) Las células EPCs también se caracterizan por incorporar ac-LDL y son positivas para UEA-1. Imagen tomada de Vega et. al. 2017 [134].

Finalmente, se llevó a cabo la caracterización de las EPC tempranas (eEPCs) mediante citometría de flujo, confirmando que estas células son positivas a día 7 para CD14, CD34, CD31, CD45, CD133, CD73, CD309, y negativas para CD90, CD146 (Figura 30).

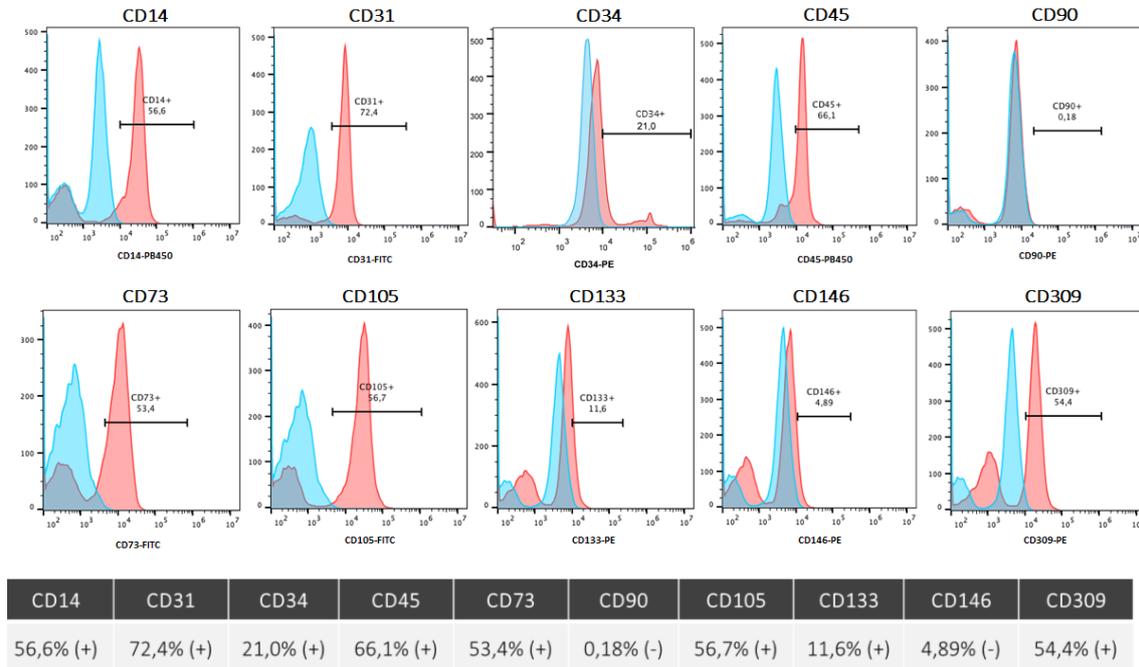


Figura 30. Caracterización de las EPCs por citometría de flujo. Las células EPC tempranas resultaron positivas para los marcadores CD14, CD34, CD31, CD45, CD73, CD105, CD133, CD309, y negativas para CD90 y baja expresión de CD146.

4.2. Cambios de expresión génica en EPCs en respuesta al tratamiento con sobrenadantes ateroscleróticos

En un trabajo previo del grupo de investigación se observó que la incubación de EPCs de donantes sanos con los secretomas de arterias carótideas ateroscleróticas inducía cambios de expresión proteica relacionadas con una activación de estas células [134]. En concreto, se observó un aumento de la movilidad y proliferación celular, así como cambios proteómicos relacionados. De las 2043 proteínas identificadas, se analizaron los cambios de expresión de 1179 proteínas, comparando los cambios de expresión entre las EPC de donantes sin tratamiento (EPC cont) tomadas como control con las EPC de los pacientes (EPC pat) y EPC estimuladas con los secretomas (EPC +AP). Una de las proteínas que aparecían aumentadas en las EPCs en respuesta a la incubación con el sobrenadante de arterias ateroscleróticas, así como en EPCs de los mismos pacientes ateroscleróticos, fue la proteína HMOX1 (Figura 31).

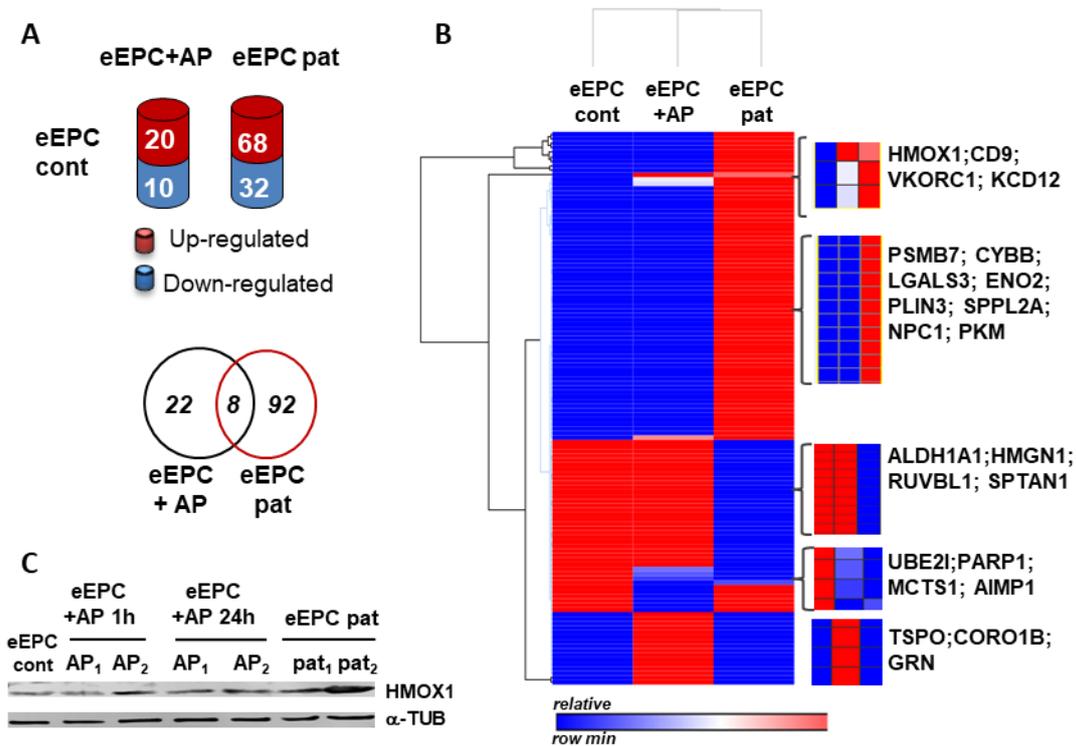


Figura 31. Expresión diferencial de EPCs en respuesta al secretoma de arterias ateroscleróticas. A) Descripción gráfica de los cambios observados, y diagrama de Venn con las proteínas comunes y exclusivas observadas entre EPCs tratadas con secretomas ateroscleróticos (eEPC+AP) y EPCs de los pacientes ateroscleróticos (eEPC pat). B) Cluster hierárquico con los patrones de expresión diferencial vistos en los tres grupos de muestras analizadas (incluyendo las EPC control, sin tratar). C) Resultado obtenido en el western-blot para la HMOX1 en dos pacientes ateroscleróticos distintos y las EPCs tratadas con secretomas ateroscleróticos (EPC+AP). Figura modificada de Vega FM et al [134].

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió analizar más en detalle el efecto de los secretomas ateroscleróticos sobre las EPCs en proteínas como la HMOX1 y otras relacionadas. En primer lugar, se analizaron los cambios de expresión génica de la HMOX1 y otras proteínas asociadas a la ruta de expresión de la HMOX1.

4.2.1. Pasos previos al análisis de expresión génica. Selección de cebadores y eficiencia

En primer lugar, se diseñaron los cebadores y se analizaron las eficiencias de la reacción con cada uno de ellos. La tabla 9 recoge los cebadores diseñados *in silico*. Los datos de eficiencia obtenidos para los cebadores usados se muestran en la tabla 10. A la vista de los resultados obtenidos se decidió usar como concentración de trabajo 0,25 ng/μl.

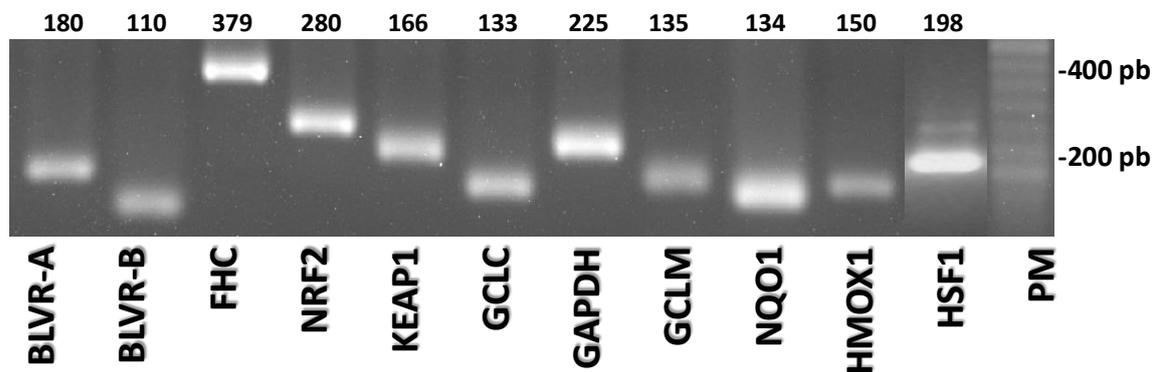
Tabla 9. Lista de cebadores diseñados *in silico* usados en el presente trabajo.

Cebador	Secuencia	Pb	Tm	Posición	Amplicón (pb)	Gen
GCLC.3 Fw	GGGCGATGAGGTGGAATAC	19	59	207	133	NM_001498.4
GCLC.3 Rv	GGGTAGGATGGTTTGGGTTT	20	58	339		
GCLM.5 Fw	CCTTGGAGCATTTACAGCCT	20	58	652	135	NM_002061.4
GCLM.5 Rv	TTACCTGTGCCCACTGATAC	20	58	786		
HMOX1.7 Fw	TGACACCAAGGACCAGAGC	19	59	776	150	NM_002133.2
HMOX1.7 Rv	GTAAGGACCCATCGGAGAAG	20	60	925		
HSF1.14 Fw	CTGGGGGTGAAGAGAAAGAT	20	58	795	198	NM_005526.3
HSF1.14 Rv	TGTCGGAGATGATGGGTC	18	60	993		
KEAP1.10 Fw	CTCAAAGAAGTCCAAAGCG	20	56	2208	166	NM_012289.3
KEAP1.10 Rv	CCTCCCAGGTATCCAAGAAT	20	58	2413		
NQO1 Fw	GGGATCCACGGGGACATGAATG	22	66	485	134	NM_000903.2
NQO1 Rb	ATTTGAATTCGGGCGTCTGCTG	22	62	618		

Tabla 10: Lista de eficiencias de los distintos cebadores usados en el presente trabajo.

Pareja de cebadores	Eficiencia	R ²
HMOX1.7	98,58%	0,9973
BLVR-A.2	101,31	0,9934
BLVR-B.2	103,04	0,9894
FHC.1	96,45	0,9974
HSF1.14	108,53	0,9873
NRF2	93,56	0,9986
NQO1	92,14	0,9971
GCLC.3	106,82	0,9939
GCLM.5	103,01	0,9992
KEAP1.10	103,31	0,8901

Para comprobar si los amplicones tenían el tamaño predicho *in silico*, se recuperaron las muestras de una placa de RT-qPCR una vez acabado el experimento. Las muestras de ADN se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % en TAE. Los resultados se recogen en la figura 32.

**Figura 32.** Gel de agarosa donde se comprueba el tamaño de los amplicones. El tamaño de los amplicones esta expresado en pares de bases (pb).

4.2.2. Pasos previos al análisis de expresión génica. Concentración de RNA

Como paso previo al análisis por RT-qPCR se extrajo el RNA de las distintas muestras analizadas, y se cuantificó, obteniendo los resultados de concentración y ratio 260/280 que se muestran en las tablas 11 y 12. La tabla 11 recopila las muestras usadas para los ensayos en los que se comparan los secretomas de las arterias mamarias con los de las placas.

Tabla 11: Concentración y pureza de ARN obtenido de las muestras correspondientes a EPC basales, incubadas en medio EBM-2 basal (C); EPCs incubadas con el secretoma de arterias mamarias no ateroscleróticas (M); EPCs incubadas con los secretomas de arterias carótídeas ateroscleróticas (AP).

Muestras	Concentración ng/ μ l	A260/280
C21	56,92	1,979
C22	25,8	1,886
C23	22,64	1,785
C24	5,12	1,882
M50	14,76	1,747
M51	17,88	1,832
M54	32,28	1,801
M62	53,96	1,975
M63	57,88	1,958
AP57	76,2	1,989
AP292	36,52	1,763
AP317	21,56	1,717
AP389	19,64	1,766
AP461	44,04	1,908
AP467	53,56	2,001

Tabla 12. Concentración y pureza de ARN obtenidos de EPCs sanas tras la incubación con secretomas ateroscleróticos a distintos tiempos de incubación (30 minutos, 4 y 24 horas) y a distintas concentraciones (66,7 ng/ μ l, 133,34 ng/ μ l y 200 ng/ μ l), comparado con EPCs en condiciones basales (Control).

Tiempos	Muestra	EPC control		EPC + AP66,67		EPC+AP133,34		EPC+ AP200	
		ng/ μ l	260/280	ng/ μ l	260/280	ng/ μ l	260/280	ng/ μ l	260/280
30 min	AP354	18,8	1,747	24,3	1,704	21,26	1,807	53,42	1,666
	AP422	21,6	1,685	32,6	1,817	31,36	1,674	40,32	1,74
	AP212	151,6	1,824	65,6	1,881	18,6	1,809	285,8	1,994
	AP300	74,9	1,875	36,3	1,741	31	1,895	161,8	1,494
	AP179	29,5	1,862	290	1,937	34,6	1,742	19,5	1,91
	AP381	64,4	1,793	142,8	1,823	29,5	1,817	32,2	1,698
4 h	AP88	28,56	1,884	29,2	2,056	27,84	1,917	19,28	1,759
	AP167	31	1,942	28	2,044	28,12	1,937	26,64	1,959
	AP247	122,04	1,975	11,6	2,043	101,1	1,994	36,64	1,877
	AP129	124,08	1,951	66	1,96	78,08	1,917	37,04	1,823
	AP92	32,8	1,745	38,08	2,026	40,8	2,024	29,12	1,876
24 h	AP88	41,68	1,923	28	1,81	28,32	2,088	32,8	1,939
	AP167	35,28	1,885	29,88	1,991	23	1,873	28,92	1,898
	AP247	22,64	1,911	88,84	1,95	104,52	1,966	85,24	1,936
	AP129	59,52	1,992	85,2	1,929	66,48	1,919	38	1,855

4.2.3. Evaluación de los cambios de expresión génica en EPCs en respuesta a secretomas ateroscleróticos y arterias mamarias no ateroscleróticas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos a nivel proteómico, se analizaron en primer lugar los cambios de expresión génica de varios genes asociados a HMOX1 en EPCs sanas tras la incubación con secretomas de arterias carotídeas ateroscleróticas (AP), en comparación con EPCs incubadas con el secretoma de arterias mamarias (M), empleadas inicialmente como controles arteriales no ateroscleróticos. En ambos casos las EPCs se incubaron con los sobrenadantes en proporción 1:2 (sobrenadantes arterial:medio EBM-2) durante 24 horas. Los resultados se muestran en la figura 33.

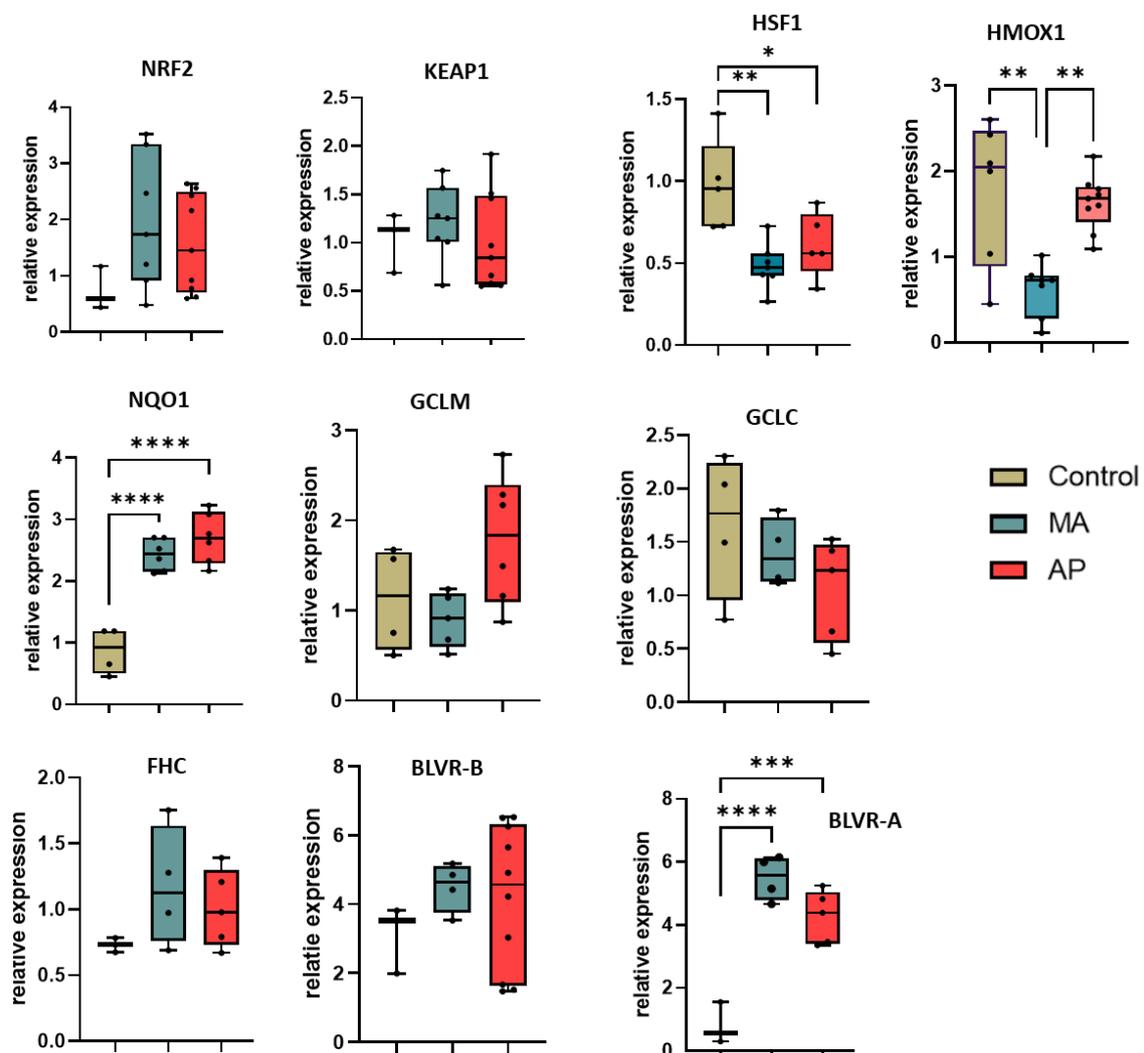


Figura 33. Cambios de expresión génica en EPCs tras la incubación con secretomas ateroscleróticos (AP) en comparación con EPCs incubadas con arterias mamarias no ateroscleróticas (M). En la gráfica están representados los datos mediante diagramas de cajas donde se puede ver la mediana, el valor mínimo y el valor máximo calculado, además de los datos individuales obtenidos en cada medida ($n \geq 3$). *p-value <0.05; **p-value <0.01; ***p-value >0.001.

De acuerdo con estos resultados, se puede observar cómo la incubación de EPCs con los factores ateroscleróticos (AP) promueve cambios de expresión en la mayoría de los genes analizados, en mayor o menor medida. Del mismo modo, la incubación con los factores secretados por arterias mamarias no ateroscleróticas (M) también provocó cambios de expresión en los genes de interés.

Varios genes vieron aumentada su expresión en EPCs tanto en respuesta al sobrenadante aterosclerótico como tras la incubación con los secretomas de arterias mamarias. Es el caso de NQO1 y BLVRA, cuya expresión aumentó de manera significativa (p -values < 0.001) en las EPCs en respuesta a los sobredantes arteriales AP y M. Por otro lado, NRF2 y Ferritina (FHC) también presentaron la misma tendencia, observándose un incremento claro de estos genes, a pesar de que los datos no fueron estadísticamente significativos. Por último, tanto KEAP1 como BLVB-B parecían igualmente aumentar su expresión en EPCs en respuesta a los secretomas arteriales, aunque la tendencia no era tan clara como en los genes descritos antes.

Por su parte, la expresión de HMOX1 y HSF1 disminuyó de manera significativa en EPCs incubadas con los secretomas de arterias mamarias (p -value < 0.01 respecto al control) y también, aunque en menor medida, en respuesta al tratamiento con secretomas ateroscleróticos. De hecho, esta disminución fue solo significativa para HSF1 (p -value < 0.05 respecto al control). En el caso de HMOX1, la disminución fue mayor en respuesta al sobrenadante de mamarias, existiendo diferencias significativas respecto a las EPCs tratadas con los secretomas ateroscleróticos (p -value < 0.01) que presentaban valores similares de HMOX1 con respecto a las EPC control. Finalmente, GLCM parecía disminuir su expresión en respuesta a los sobrenadantes mamarios mientras que aumentó en EPCs tratadas con sobrenadantes ateroscleróticos, mientras que para GLCL la expresión disminuyó en respuesta a ambos secretomas. Ninguno de estos dos genes presentó valores estadísticamente significativos.

4.2.4. Evaluación de los cambios de expresión génica en EPCs en respuesta a secretomas ateroscleróticos a distintas concentraciones y tiempos

A continuación, se analizaron los cambios de expresión en las EPCs en respuesta a distintas concentraciones de secretomas ateroscleróticos y a distintos tiempos, con objeto de determinar si dichos cambios eran dependientes de la dosis y/o del tiempo de incubación. Partiendo de la concentración empleada anteriormente (en la comparativa con los secretomas

mamarios) las células se trataron además, con el doble (133,34 ng/ μ l (EPC-133,34)) y el triple (200 ng/ μ l (EPC-200)) de proteína de los secretomas elegidos. Además se analizó la respuesta de las EPCs frente al tratamiento con estos secretomas a tiempos cortos (30 min, 4 horas) y se mantuvo al incubación de 24 horas (tiempos largos). Los resultados obtenidos bajo todas estas condiciones se muestran resumidos en la figura 34. Se puede observar que existe una respuesta dosis-tiempo dependiente.

En primer lugar, los niveles de HSF1 disminuyeron a los 30 minutos de tratamiento con los secretomas ateroscleróticos, siendo dicha disminución significativa con la concentración más alta, a 200 ng/ μ l. Este mismo patrón se observó a las 24 horas, a pesar de que a las 4 horas de tratamiento los niveles de HSF1 parecieron aumentar (no de forma significativa) en las EPCs tratadas respecto a las EPC control. NRF2 por su parte apenas mostró cambios a los 30 minutos de incubación pero sí presentó una disminución significativa tras 4 horas de tratamiento con cualquiera de las concentraciones de secretoma aterosclerótico. Si bien los cambios no fueron estadísticamente significativos, esto podría deberse al bajo número de muestras que se pudieron emplear en este análisis.

La expresión de KEAP1 aumentó notablemente en las EPCs tras 30 minutos de incubación con la concentración mas baja del secretoma aterosclerótico (66,67 ng/ μ l) pero disminuyó con la concentración más alta, de 200 ng/ μ l. Por otro lado, no se observaron apenas cambios en la expresión de KEAP1 ni a 4 horas ni a 24 horas de tratamiento de las EPCs con ninguna de las concentraciones empleadas.

Por último, en lo que se refiere a HMOX1, se pudo observar una mayor expresión de este gen en las EPCs tratadas con la 66,67 ng/ μ l (la concentración más baja) de secretoma aterosclerótico, tanto tras los 30 minutos como tras 4 horas de incubación, llegando a ser significativo dicho aumento a la media hora de incubación (p-value <0.05). Por el contrario, los niveles de HMOX1 disminuyeron, aunque no significativamente, en las células tratadas con la concentración más alta, 200 ng/ μ l, en los tres tiempos analizados. De hecho, a las 24 horas, la expresión de HMOX1 disminuyó de manera generalizada en respuesta al secretoma aterosclerótico, independientemente de la concentración, respecto a las EPC control.

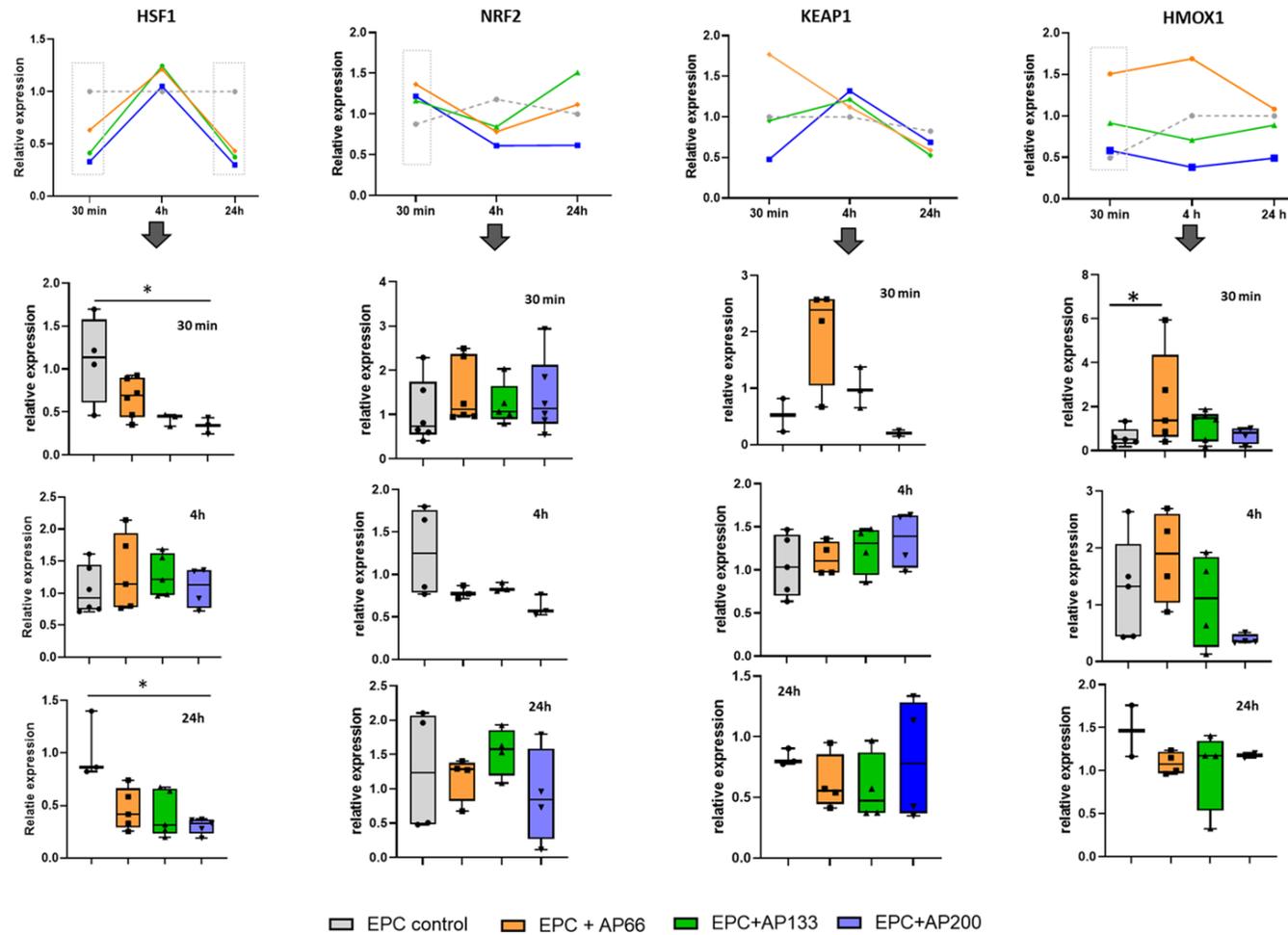


Figura 34. Cambios de expresión de los genes NRF2, HSF1, KEAP1 y HMOX1 en EPCs tras la incubación con secretomas ateroscleróticos a distintos tiempos y distintas concentraciones. En la gráfica están representados los datos mediante diagramas de cajas donde se puede ver la mediana, el valor mínimo y el valor máximo calculado, además de los datos individuales obtenidos en cada medida ($n \geq 3$). *p-value <0.05; **p-value <0.01; ***p-value >0.001.

En lo que se refiere a genes relacionados con la expresión de HMOX1 (Figura 35), el gen NQO1 presentó resultados variables según las condiciones analizadas. Así, en respuesta a 200 ng/ μ l de secretomas ateroscleróticos, la expresión de NQO1 disminuyó en las EPCs a tiempos tempranos, 30 minutos y 4 horas, y por el contrario aumentó de manera significativa (p -value <0.05) con esta misma concentración tras 24 horas de incubación. Por su parte, los niveles de NQO1 apenas variaron en respuesta a las concentraciones intermedias, 66,67 ng/ μ l y 133,34 ng/ μ l.

En el caso de Ferritina (FHC), esta proteína no presentó cambios significativos de expresión, aunque sí pudo apreciarse una disminución general de los niveles de FHC a las 24 horas con respecto a los tiempos tempranos (30 min y 4 h) y respecto al control. Finalmente, tanto la Biliverdin reductasa A (BLVRA) como BLVRB vieron alterada su expresión a partir de las 4 horas de incubación de las EPCs. BLVRA disminuyó a las 4 horas en respuesta a las tres concentraciones de secretoma aterosclerótico, siendo esta disminución significativa en respuesta al tratamiento de mayor concentración (200 ng/ μ l). BLVRB por su parte también presentó una disminución de su expresión, aunque estos cambios no fueron estadísticamente significativos. Por último, mientras que la BLVRA experimentó una recuperación de los niveles de expresión a las 24 horas, sobre todo en respuesta al tratamiento con 200 ng/ μ l, BLVRB disminuyó aun mas sus niveles, sobre todo en respuesta a la concentración más alta (p -value <0.05).

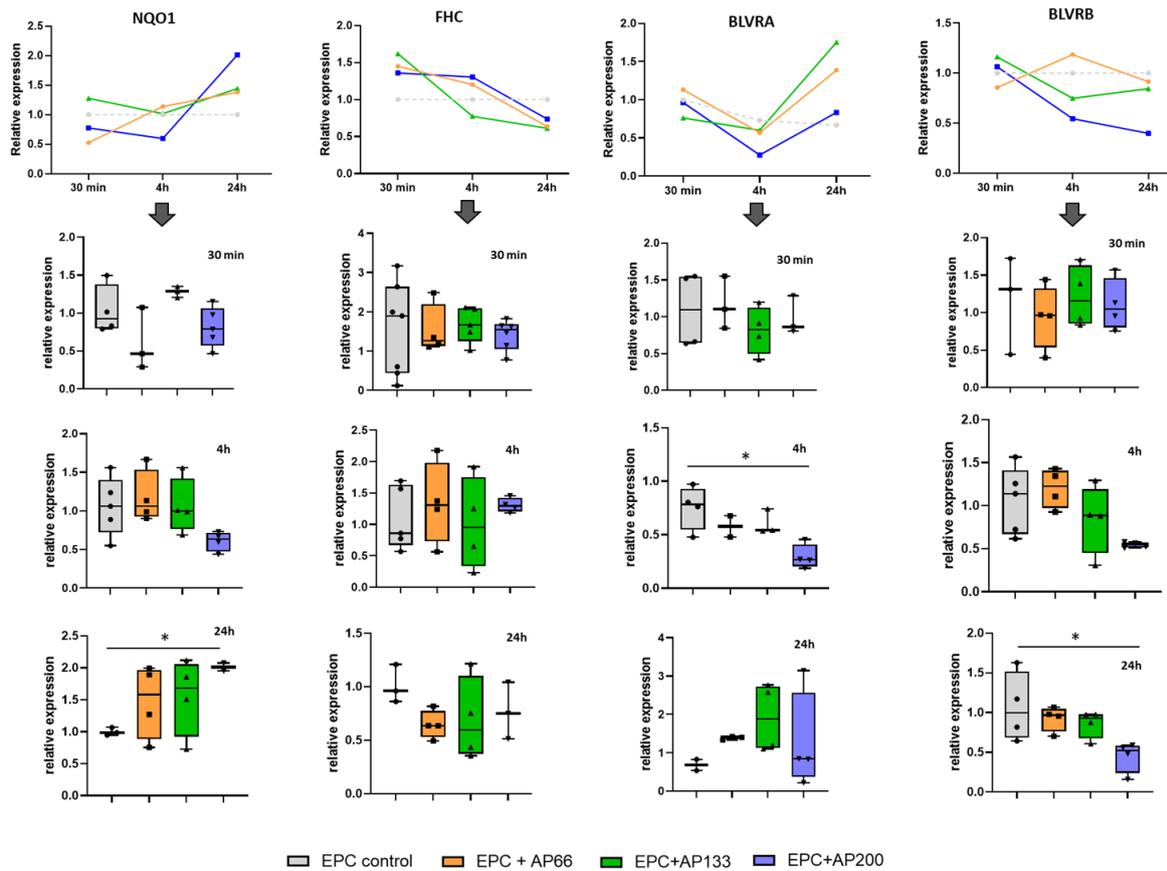


Figura 35. Cambios de expresión de los genes NQO1, FHC, BLVRA y BLVRB en EPCs tras la incubación con secretomas ateroscleróticos a distintos tiempos y distintas concentraciones. En la gráfica están representados los datos mediante diagramas de cajas donde se puede ver la mediana, el valor mínimo y el valor máximo calculado, además de los datos individuales obtenidos en cada medida ($n \geq 3$). *p-value <0.05; **p-value<0.01; ***p-value>0.001.

Por último en los casos de GCLM y GCLC, no se encontraron cambios significativos de expresión en ninguno de los dos casos (Figura 36). Aunque en GCLC, si se aprecia una disminución de la expresión a 4 horas y un aumento posterior a tiempos altos. Por el contrario, parece haber una disminución de la expresión de GCLM en tiempos largos con respecto al control. Esta diferencia es más acentuada para las EPC+AP66,67.

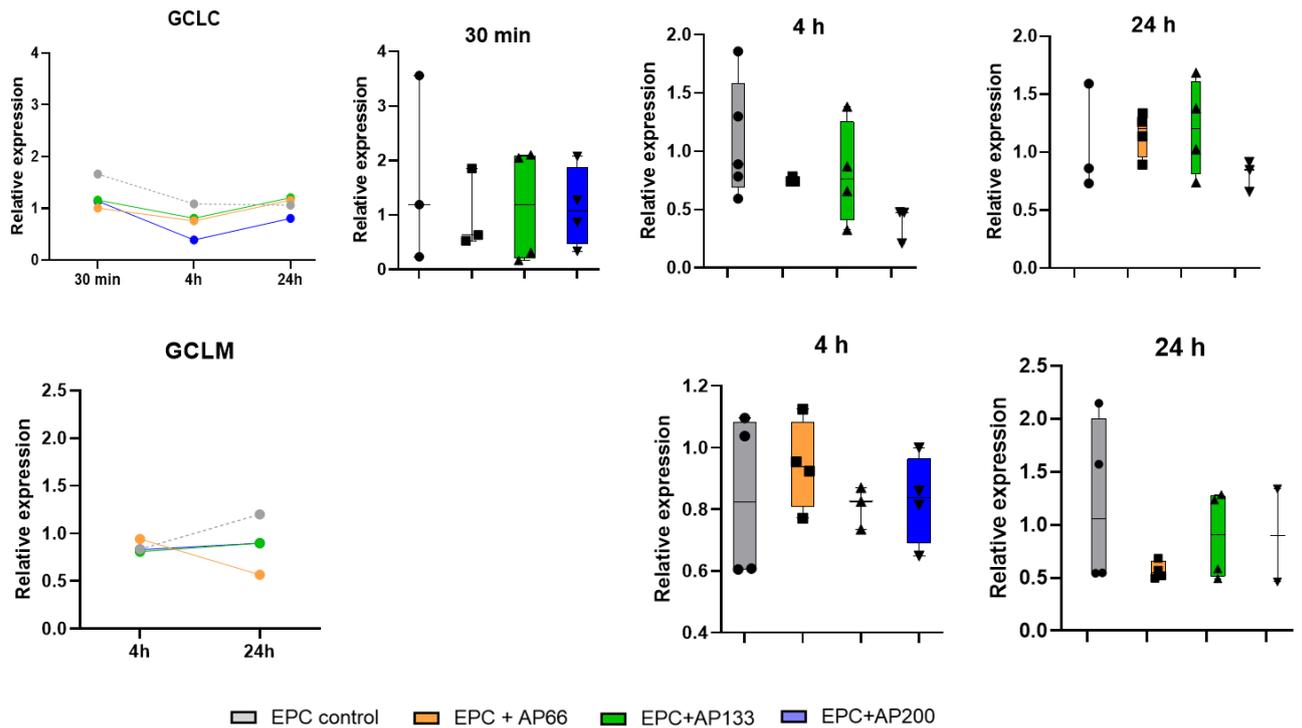


Figura 36. Cambios de expresión de los genes GCLC y GCLM en EPCs tras la incubación con secretomas ateroscleróticos a distintos tiempos y distintas concentraciones. En la gráfica están representados los datos mediante diagramas de cajas donde se puede ver la mediana, el valor mínimo y el valor máximo calculado, además de los datos individuales obtenidos en cada medida ($n \geq 3$). *p-value <0.05; **p-value<0.01; ***p-value>0.001.

4.3. Evaluación de los cambios de expresión proteica en EPCs en respuesta a secretomas ateroscleróticos a distintas concentraciones y tiempos

De todos los genes estudiados, nos centramos en analizar los cambios a nivel proteico para las proteínas NRF2, HSF1, HMOX1 y FHC. Para ello se analizaron mediante western blot los cambios de expresión de proteína total en las EPCs tras incubarlas con los sobrenadantes ateroscleróticos en las tres concentraciones de interés (66,67 ng/ μ l, 133, 34 ng/ μ l y 200 ng/ μ l), en los tiempos antes mencionados (30 min, 4 y 24h). La figura 37 muestra los resultados del western-blot para uno de los ensayos realizados.

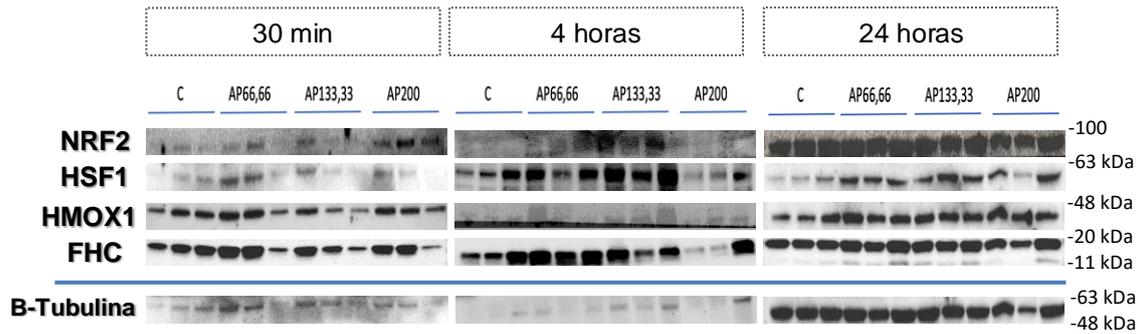


Figura 37. Análisis de los cambios de expresión proteica en EPCs tratadas con sobrenadantes ateroscleróticos a distintos tiempos y concentraciones. Las imágenes corresponden al western-blot obtenido en uno de los ensayos realizados con las EPCs tras la incubación con secretomas ateroscleróticos a concentración 66,67 ng/ μ l, 133,34 ng/ μ l y 200 ng/ μ l, a los 30 minutos, 4 y 24 horas. Cada condición está formada por 3 secretomas de AP distintos.

Tras repetir varias veces este ensayo ($n \geq 4$) y cuantificar los cambios de expresión en todos ellos, se realizó un análisis estadístico de los cambios, que quedan representados en la figura 38. Según esto, la expresión de NRF2 se vio alterada fundamentalmente a tiempos tempranos, en EPCs expuestas a los secretomas ateroscleróticos a 30 minutos y 4 horas, principalmente en respuesta a la concentración más alta de estos secretomas (200 ng/ μ l), aumentando la expresión de manera significativa a 30 minutos (p -value < 0.01) con dicha concentración. Por su parte, a las 24 horas apenas se observaron cambios en los niveles de expresión de NRF2.

En el caso de HSF1, la incubación de las EPCs con los secretomas ateroscleróticos provocó cambios en los niveles de expresión de esta proteína fundamentalmente a los 30 minutos de incubación, disminuyendo en respuesta de las concentraciones más altas (133,34 y 200 ng/ μ l), siendo significativa dicha disminución en respuesta al tratamiento más concentrado (p -value < 0.05).

De acuerdo con los datos del western-blot, los niveles de HMOX1 disminuyeron, aunque no de manera significativa a los 30 minutos en las EPCs en respuesta al tratamiento con 133,34 ng/ μ l de secretoma aterosclerótico y apenas varió en el resto de condiciones. Únicamente se observó un aumento significativo de HMOX1 tras 24 horas de incubación de las EPCs con el secretoma más concentrado (200 ng/ μ l), con respecto a las EPC control.

Finalmente, para la Ferritina (FHC) apenas se observaron cambios de expresión, salvo un ligero descenso, no significativo, de los niveles de FHC en EPCs a los 30 minutos tras la incubación con 133,34 ng/ μ l, como también se describió anteriormente para HMOX1.

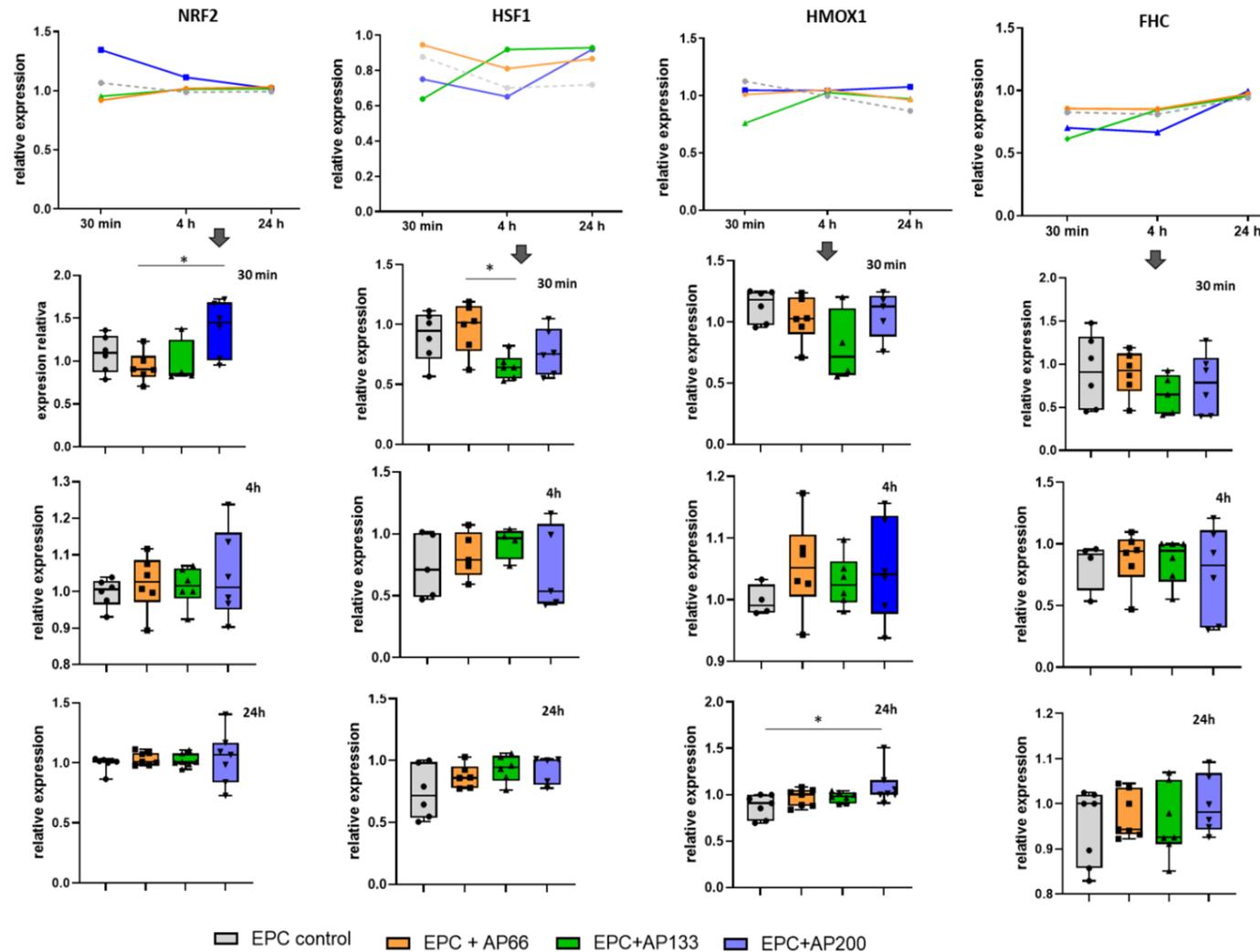


Figura 38. Cambios de expresión a nivel proteico de HSF1, NRF2, HMOX1 y BLVRB en EPCs tras la incubación con secretomas ateroscleróticos a distintos tiempos y distintas concentraciones. En la gráfica están representados los datos mediante diagramas de cajas donde se puede ver la mediana, el valor mínimo y el valor máximo calculado, además de los datos individuales obtenidos en cada medida ($n \geq 3$). *p-value <0.05; **p-value<0.01; ***p-value>0.001.

4.4. Estudio de la translocación de proteínas citosólicas al núcleo como respuesta de las EPCs al tratamiento con secretomas ateroscleróticos a distintas concentraciones y tiempos

Como ya se mencionó en apartados anteriores, la ruta de la HMOX1 comienza con la translocación de NRF2 y HSF1 al núcleo. Por ello se decidió evaluar si la incubación de EPCs con el secretoma de arterias ateroscleróticas podría inducir la translocación de estas proteínas del citosol al núcleo, lo que sería representativo de la activación de estas rutas. La figura 39 incluye un ejemplo de los resultados del análisis realizado por western-blot tras el fraccionamiento celular llevado a cabo.

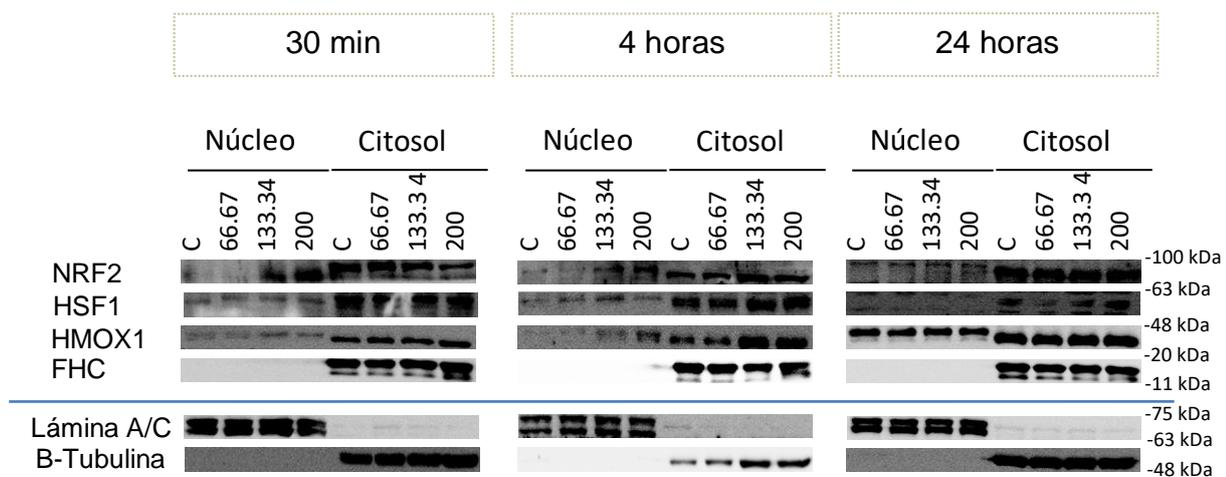


Figura 39. Imágenes obtenidas para los Western-Blot cuyas E PC han sido fraccionadas.

Los resultados recogidos en la figura 39 nos muestran que a 30 minutos hay una traslocación de NRF2 a concentraciones de secretomas medias y altas. De forma apenas perceptible HSF1 sigue el mismo comportamiento. También hay una parte de HMOX1 en el núcleo con las 3 condiciones probadas, mientras que toda la FHC se encuentra en el citosol. A 4 horas la traslocación de HSF1 y NRF2 ya se ve de forma más clara, siendo de nuevo mayor en las EPC-133,34 y EPC-200. HMOX1 también se encuentra a 4 horas en el núcleo, aunque en menor proporción que en el citosol. FHC a 4 horas permanece íntegramente en el citosol. Por último, a 24 horas volvemos a tener a NRF2, HSF1 y HMOX1 en el citosol y en menor medida translocados en el núcleo. Y al igual que en los otros tiempos de incubación, a 24 horas FHC está íntegramente en el citosol.

Hay que tener en cuenta la existencia de las modificaciones postraduccionales que afectan a las proteínas que las sufren. Por ejemplo, NRF2, necesita ser fosforilado en el extremos N-terminal

para ser liberado de KEAP1 [151, 152]. Para ser transportada al núcleo necesita ser fosforilada en la Tyr576 [152]. La transcripción de otras proteínas en el sitio ARE por NRF2 se ve facilitada por la fosforilación en la serina (Ser550) [153], acetilaciones en diversas lisinas del sitio Neh3 [154] así como la formación de un dímero con la proteína sMAF [152, 155]. Estas modificaciones pueden ser las responsables de que en el núcleo las proteínas estudiadas tengan pesos moleculares distintos al citosólico tal y como se puede observar en la figura 39.

4.5. Ensayo de ROS

Por último, se realizó un ensayo para determinar cómo varían los niveles de ROS en las EPCs en función del tiempo y de la concentración de secretoma empleada.

En la figura 40 podemos ver como aumenta en las tres condiciones de concentración la cantidad de ROS presentes en el medio. La concentración más baja de secretomas (EPC-66,67) es la que produce una mayor cantidad de ROS en el medio a tiempos cortos y medios (30 minutos y 4 horas). Sin embargo, a tiempos largos, la concentración de ROS aumenta cada vez más despacio. EPC-133,34 presenta una menor producción de ROS en todos los tiempos, aunque a partir de 4 horas su concentración aumenta. Por último, EPC-200 que inicialmente presenta un nivel de ROS bajo a tiempos medios, produce diferencias significativas a 24 horas con respecto al control, con un nivel de confianza del 99%.

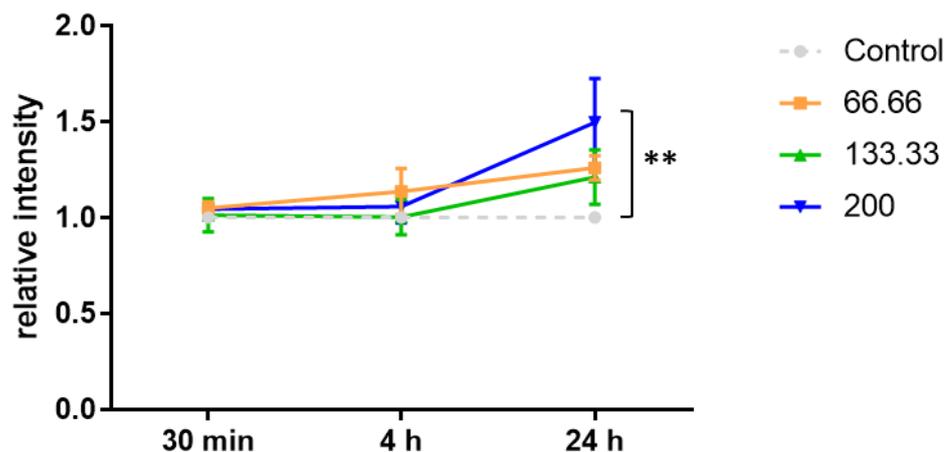


Figura 40. Variación de la concentración de ROS en función del tiempo de la concentración de secretoma usada. Las EPCs se trataron con medio basal (Control), o bien con secretomas ateroscleróticos a 66,67 ng/ μ l, 133,34 ng/ μ l, y 200 ng/ μ l, durante 30 min, 4 y 24 horas.

5. DISCUSIÓN

5.1. Evaluación de los cambios de expresión génica en EPCs en respuesta a secretomas ateroscleróticos y arterias mamarias no ateroscleróticas.

La incubación de las EPCs sanas con secretomas de arterias carotídeas ateroscleróticas (EPC+AP) y/o con arterias mamarias no ateroscleróticas (EPC+MA), promovió cambios en los niveles de expresión génica de los factores relacionados con la HMOX1, comparado con EPCs basales, sin tratamiento alguno.

De acuerdo con los resultados, la expresión de NRF2, FHC, NQO1, BLVR-A y BLVR-B aumentó en las EPCs en respuesta a ambos tipos de secretomas (AP y MA), incluso de manera significativa en el caso de NQO1 y BLVRA, en comparación con las EPCs basales. Por su parte, los niveles de HSF1 disminuyeron significativamente en respuesta a ambos secretomas, mientras que HMOX1 disminuyó significativamente en respuesta a la incubación con los secretomas no ateroscleróticos (EPC+MA) y en menor medida en respuesta a los factores ateroscleróticos (EPC+AP). KEAP1 aumenta su regulación en las EPC incubadas con MA, mientras que disminuye en las EPC+AP.

Finalmente, GCLM y GCLC disminuyeron ambos su expresión en EPCs expuestas a sobrenadantes mamarios no ateroscleróticos, mientras que en respuesta a los secretomas ateroscleróticos GCLM aumentó notablemente su expresión (tanto en comparación con las EPC basales como con respecto al tratamiento con MA), mientras que GCLC disminuyó aun más en respuesta a los secretomas ateroscleróticos (comparado con EPC basal como con EPC+MA). Aunque pueda parecer extraño que ambas subunidades tengan un patrón distinto de expresión génica, debemos recordar que están codificados en genes distintos [92]. La figura 41 contiene un resumen de los cambios observados.

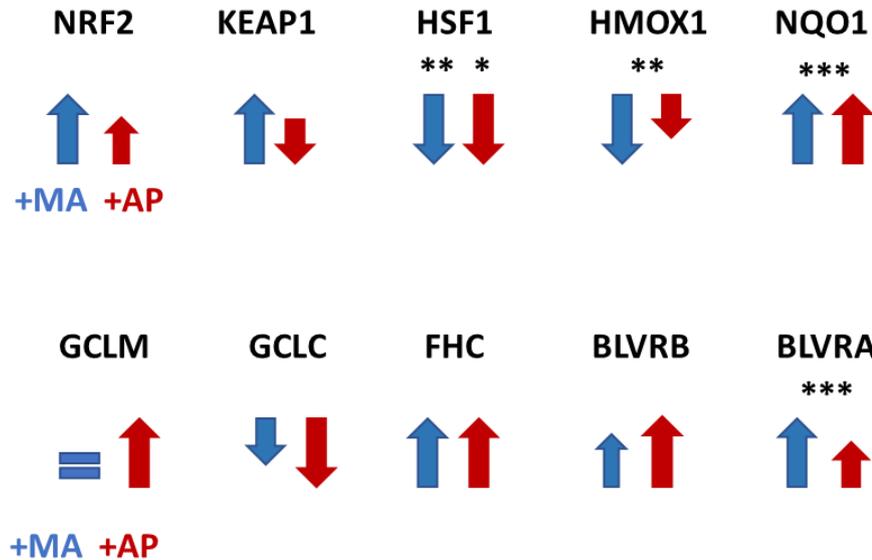


Figura 41. Resumen esquemático de los cambios de expresión, a nivel de mRNA, observado en las EPCs en respuesta a la incubación con el secretoma de arterias mamarias no ateroscleróticas (MA) y arterias carotídeas ateroscleróticas (AP), durante 24 horas.

Las arterias mamarias se emplean generalmente en reemplazo vascular, y destacan fundamentalmente por presentar una protección innata frente a la aterosclerosis, siendo un candidato excepcional para la revascularización [156, 157]. El hecho de que MA tenga una protección especial frente a la aterosclerosis viene de sus propiedades únicas: altos niveles de expresión de eNOS y liberación de NO, VSMC con proliferación y migración limitadas [156, 157]. Diversos estudios han analizado la expresión diferencial de las arterias mamarias comparado con arterias coronarias o carotídeas entre otras [157-165].

En los últimos años, los tejidos arteriales mamarios se han empleado en estudios proteómicos como “controles” no ateroscleróticos, analizando, por ejemplo, el patrón diferencial de secreción de placas ateroscleróticas frente a estos tejidos, inicialmente “sanos” [161, 166-170].

Otros autores como Auguet et. al., estudiaron la expresión de diversas adipo/citoquinas en secretomas provenientes de carótidas complicadas con placas de ateroma comparado con secretomas de arterias mamarias. Una de estas citoquinas era la visfatina, una enzima relacionada con la síntesis de NAD producida por el tejido graso visceral principalmente, aunque también se ha encontrado en monocitos y en neutrófilos. Encontraron diferencias significativas en los niveles de visfatina entre los sobrenadantes de AP y MA (0,1 ng/μl y 0,046 ng/μl respectivamente). Al medir la presencia de visfatina en el suero de estos pacientes, no encontraron diferencias significativas entre los pacientes de AP y

MA, pero si observaron mayores niveles de visfatina en el suero de pacientes MA comparado con los pacientes ateroscleróticos (Figura 42) [160].

Otro ejemplo lo encontramos en Durán et. al. 2007, que estudiaron las proteínas secretadas por arterias ateroscleróticas, usando arterias mamarias como controles no ateroscleróticos, encontrado un patrón diferencial. Teniendo en cuenta estos trabajos, en la presente Tesis se emplearon inicialmente los secretomas arteriales mamarios como “controles” pero, al contrario de lo que se podría esperar, la incubación de las EPCs con los secretomas mamarios no ateroscleróticos (EPC+MA) produjo cambios de expresión en estas células a veces de manera similar a lo observado en respuesta a los factores ateroscleróticos.

Los resultados experimentales obtenidos sugieren que el modelo proporcionado por MA no debería ser usado como control arterial, puesto que estas arterias realmente se obtienen de pacientes con complicaciones cardiovasculares que están influyendo también sobre las células, al menos en el modelo *in vitro* presentado. Futuros experimentos deberían considerar por ejemplo, como control arterial, el empleo de arterias carotídeas (en nuestro caso) de personas jóvenes sin patologías previas, aunque evidentemente son mucho más difíciles de conseguir. Alternativamente, el uso de biopsias de individuos sin patologías cardiovasculares asociadas podría considerarse también.

No obstante, estos resultados también ponen de manifiesto la necesidad de profundizar en el efecto diferencial que presentan los secretomas arteriales, ateroscleróticos o no, ya que podrían ayudar a entender lo que ocurre en las células circulantes en función de la complicación vascular o patología que presenten los pacientes.

Centrándonos en los cambios de expresión de los genes analizados, los niveles de HMOX1 disminuyeron mientras que la expresión de los genes “dependientes” de HMOX1 aumentó notablemente (FHC, BLVR-A y BLVR-B), incluso significativamente para el caso de la BLVR-A (p -value <0.001).

Por su parte, el aumento observado en los niveles de NRF2 podría explicar también el aumento significativo de NQO1 en las EPCs en respuesta a ambos secretomas (AP y MA), pero no así la disminución observada para HMOX1, que estaría en consonancia con lo observado para la HSF1, que también aparecía disminuida su expresión en respuesta a ambos secretomas. En este sentido, diversos estudios han señalado el papel de HSF1 como agente regulador de HMOX1, de manera dependiente de los tiempos de incubación y de la presencia de factores tales como hemo o incluso choque térmico (ambas proteínas son consideradas proteínas de choque térmico HSF1, heat shock factor-1, y HMOX1 sería HSF32) [75, 171]. No obstante, la sobreexpresión de HMOX1 suele estar asociada a una

disminución de los niveles de HSF1 [172], por lo que los cambios asociados tampoco se corresponden con lo visto anteriormente en la literatura.

Alternativamente, la disminución de HMOX1 a nivel de mRNA podría estar asociado a otras vías que no se han analizado en este trabajo de tesis, tales como la supresión de HMOX1 por parte de Bach1, una proteína que forma heterodímeros con una proteína Maf que se une al elemento de unión MARE, asociado a la represión de HMOX1 en células humanas [173].

Aunque se deberían realizar futuros ensayos para validar esta hipótesis, teniendo en cuenta la variabilidad observada en relación con las arterias mamarias también, en la presente tesis nos centramos a continuación en el análisis de los cambios de expresión en respuesta a los factores ateroscleróticos, evaluando los cambios en distintos tiempos y a distintas concentraciones de los factores ateroscleróticos.

5.2. Evaluación de los cambios de expresión en EPCs en respuesta a secretomas ateroscleróticos a distintas concentraciones y tiempos para NRF2, HSF1 y HMOX1.

Comenzando por **NRF2**, a nivel de mRNA se observó un ligero aumento en los niveles de mRNA de este factor de transcripción a los 30 minutos de incubación de las EPCs con los secretomas ateroscleróticos, independientemente de la concentración, mientras que estos niveles disminuyeron a partir de las 4 horas. Finalmente, a las 24 horas los niveles variaron dependiendo de la concentración de secretoma empleado, aunque no fueron cambios significativos.

En lo que se refiere a los niveles de proteína, se observó un aumento en la expresión de NRF2 en las EPCs en respuesta a la concentración mayor (200 ng/ μ l), ya apreciable a los 30 minutos y este aumento se mantuvo a las 4 horas, si bien ya a las 24 horas la tendencia fue variable, igual que se observó a nivel de mRNA.

Al analizar la translocación de NRF2 al núcleo, el aumento observado en los niveles de NRF2 a los 30 minutos de incubación de EPCs con los secretomas arteriales, se vería reflejado con un aumento claro en los niveles de NRF2 a nivel nuclear, a expensas de una disminución de esta proteína en el citosol en respuesta a concentraciones altas de secretomas ateroscleróticos (133,34 y 200 ng/ μ l). Este patrón se repetiría a las 4 horas, apenas observando presencia de NRF2 en el núcleo en respuesta a la concentración más baja de secretoma aterosclerótico, pero sí en respuesta a las concentraciones más elevadas. Esto sería indicativo de una posible activación de NRF2 en las EPCs en respuesta a las concentraciones mayores de factores ateroscleróticos, ya que su translocación al núcleo promovería

la unión a las regiones ARE y expresión de otras genes/proteínas dependientes de NRF2. Finalmente, los niveles de NRF2 en las tres condiciones fueron similares tanto a nivel nuclear como citosólico a las 24 horas.

Podría decirse que los factores ateroscleróticos a concentraciones elevadas inducen en EPCs una traslocación de NRF2 al núcleo en tiempos tempranos (30 minutos – 4 horas). Dicha traslocación sería un reflejo de la activación de NRF2, en los niveles de NRF2 sobre todo en respuesta a la concentración más alta (200 ng/ μ l).

En relación a **HSF1**, los niveles de mRNA disminuyeron en respuesta a los factores independientemente de la concentración de EPCs tras 30 minutos de incubación, aunque dicha disminución fue más significativa en respuesta a la concentración más alta de secretoma aterosclerótico. Esta disminución también se observó a nivel de proteína, fundamentalmente en respuesta a las concentraciones más altas (133,34 y 200 ng/ μ l). A las 4 horas apenas se observaron cambios, ni a nivel de mRNA ni a nivel de proteína para HSF1 en las EPCs en respuesta a los distintos tratamientos. Finalmente, a las 24 horas, los niveles de mRNA de HSF1 disminuyeron de manera similar a 30 minutos, sobre todo en respuesta a la concentración más alta de secretoma aterosclerótico. Dicha disminución no se observó a nivel de proteína para el HSF1, donde a tiempos tardíos a penas se vieron cambios de expresión en los distintos tratamientos analizados.

Con los datos del ensayo de fraccionamiento, no parece que HSF1 sufriese traslocación alguna del núcleo al citosol, o viceversa, en las EPCs en respuesta a las distintas concentraciones de secretoma arterial, si bien los niveles siempre fueron mayores en el citosol, en los 3 tiempos analizados. En este caso no se podría decir que la incubación de EPCs con los secretomas ateroscleróticos indujese translocación de HSF1, pero sí una disminución de los niveles de mRNA y proteína fundamentalmente a los 30 minutos, mientras que a las 24 horas los cambios se dieron sobre todo a nivel de mRNA.

Los resultados observados para **HMOX1** señalaron un aumento en los niveles de mRNA tanto a 30 minutos (p-value < 0.05) como a 4 horas, al incubar sobre todo con la concentración más baja (66.7 ng/ μ l) de secretoma aterosclerótico y en menor medida con la concentración intermedia (133,34 ng/ μ l). Por su parte, los niveles de HMOX1 disminuyeron a las 4 horas con la concentración más alta (200 ng/ μ l) de secretoma aterosclerótico, y dicha disminución fue generalizada en las EPCs a las 24 h de tratamiento, independientemente de la concentración de estudio. Estos resultados no fueron concordantes con los obtenidos a nivel de proteína, donde sí se observó un aumento en la expresión de HMOX1 en las EPCs en respuesta a las distintas concentraciones, aunque no significativo a las 4 horas y sobre todo con 200 ng/ μ l, lo que se repitió también tras 24 horas de incubación. Finalmente,

la presencia de HMOX1 en el núcleo sí pareció aumentar con el tiempo, independientemente de la concentración, aunque a 30 minutos y 4 horas parece observarse mayores niveles de HMOX1 nucleares en EPCs incubadas con las concentraciones mayores (133,34 y 200 ng/μl) de secretoma aterosclerótico. A las 24 horas se observó un aumento generalizado de los niveles de HMOX1 en el núcleo.

Finalmente, también se analizó la concentración de mRNA de KEAP1, observándose un aumento en las EPCs en respuesta a las concentraciones más bajas de secretoma aterosclerótico independientemente del tiempo de exposición, y tan solo en respuesta a los 200 ng/μl se observó variabilidad dependiente del tiempo. En ningún caso estos resultados fueron significativos.

	NRF2	HSF1	HMOX1	KEAP1
30 min	<p>mRNA ↑↑↑ Ligeramente aumento en las 3 condiciones</p> <p>Proteína ↑ Aumento con 200 ng/ml</p> <p>Núcleo ↑ Presencia en 133 y 200 ng/ml</p> <p>Citosol ↓ A 133 y 200 ng/ml</p>	<p>mRNA ↓↓↓* las 3 condiciones</p> <p>Proteína ↓↓↓* ↓</p> <p>Núcleo Presencia en ambos compartimentos, sin cambios aparentes</p>	<p>mRNA ↑↑↑* ↑</p> <p>Proteína ↓↓ Ligeramente descenso a 133 ng/ml</p> <p>Núcleo Presencia en ambos compartimentos, ligero aumento a 133.3 y 200 en ambos</p>	<p>mRNA ↑↑↑ ↓</p>
4 horas	<p>mRNA ↓↓↓ las 3 condiciones</p> <p>Proteína ↑ Aumento con 200 ng/ml</p> <p>Núcleo ↑ Presencia en 133 y 200 ng/ml</p> <p>Citosol ↓ A 133 y 200 ng/ml</p>	<p>mRNA ↑↑↑ Ligeramente aumento a 66 y 133 ng/ml</p> <p>Proteína ↓↓ ↓</p> <p>Núcleo Presencia en ambos compartimentos, sin cambios aparentes</p>	<p>mRNA ↑↑↓ Mayor descenso a 200 ng/ml</p> <p>Proteína ↑↑↑ Ligeramente aumento en las 3 condiciones</p> <p>Núcleo Presencia en ambos compartimentos, ligero aumento a 133.3 y 200 en ambos</p>	<p>mRNA ↑↑↑ Ligeramente aumento en las 3 condiciones</p>
24 h	<p>mRNA ↑↓ las 3 condiciones</p> <p>Proteína ↑↓ Ligeros cambios y variabilidad entre concentraciones</p> <p>Núcleo Presencia en todos, incluso control</p> <p>Citosol</p>	<p>mRNA ↓↓↓* las 3 condiciones</p> <p>Proteína ↑↑↑ Ligeramente aumento en las 3 condiciones</p> <p>Núcleo Presencia en ambos compartimentos, sin cambios aparentes</p>	<p>mRNA ↓↓↓ las 3 condiciones</p> <p>Proteína ↑↑↑* Ligeramente aumento en las 3 condiciones</p> <p>Núcleo Presencia en ambos compartimentos, mayor cantidad que en tiempos cortos</p>	<p>mRNA ↑↑↑</p>

Figura 42. Esquema representativo de los cambios de expresión a nivel de mRNA y a nivel de proteína de los factores NRF2, HSF1, HMOX1 y KEAP1 en las EPCs incubadas con secretomas ateroscleróticos a 66,67, 133.33 y 200 ng/μl respectivamente, durante 30 minutos, 4 y 24 horas.

Teniendo en cuenta fundamentalmente los cambios a nivel de proteína, podría decirse que en respuesta de las concentraciones más altas (133,34 ng/μl y 200 ng/μl) se activa la vía de NRF2, que aumenta sus niveles a 30 minutos, mientras que la expresión de HSF1 se bloquea. Ambas situaciones favorecen la expresión de HMOX1, lo cual empieza a objetivarse a las 4 horas tras la incubación de las

EPCs con los secretomas ateroscleróticos. A las 24 horas probablemente se esté revirtiendo esta vía porque tanto los niveles de NRF2 como de HSF1 disminuyen o aumentan respectivamente, volviendo quizás al estado basal. La figura 43 recoge resumidamente lo planteado aquí.

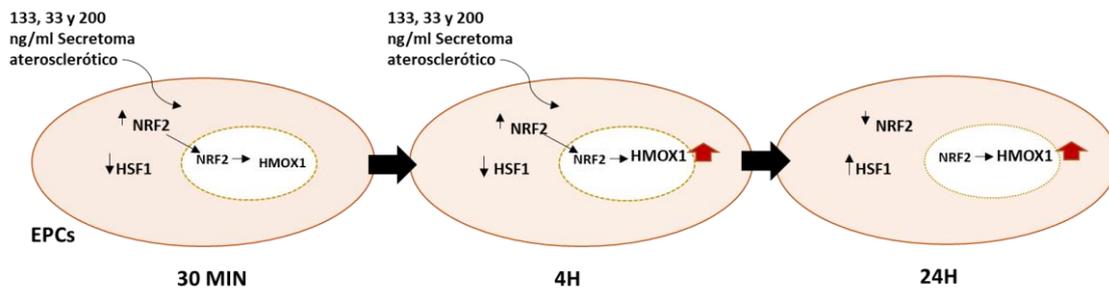


Figura 43. Representación esquemática de los cambios observados en las EPCs a distintos tiempos y distintas concentraciones en los niveles de expresión proteica de NRF2, HSF1 y HMOX1, teniendo en cuenta los cambios de proteína total y los resultados de la traslocación al núcleo de NRF2 y HSF1.

A pesar de que **HMOX1** se encuentra principalmente en el citosol, en el presente trabajo se observó que HMOX1 también está presente en el núcleo de las EPCs incluso en condiciones basales. En este sentido, diferentes estudios bajo condiciones de hipoxia e hiperoxia también detectan HMOX1 nuclear, si bien el papel que pueda desempeñar en este compartimento no se conoce por completo. Se denomina regulación no canónica de HMOX1. Se cree que su función puede ser regular la expresión de otros genes, aunque tampoco se han encontrado las estructuras típicas de unión al ADN, por lo que se considera que esta regulación no la ejerce uniéndose al ADN directamente. EN HMOX1 tampoco se ha encontrado la señal de localización nuclear (NLS), aunque esta señal sólo es imprescindible para la traslocación nuclear de proteínas de más de 40 kDa [174, 175]. Biswas et al, demostraron que, bajo condiciones de estrés oxidativo, aumenta la concentración de HMOX1 nuclear. Parece que HMOX1 nuclear se une a NRF2 regulando su propia expresión, así como la de otros genes como NQO1[176]. El hecho de que HMOX1 en la fracción nuclear, tenga un peso molecular mayor que en el citosol, puede ser debido a modificaciones post-traduccionales que han sido encontradas en HMOX1 como ubiquitinaciones (+8 kDa), fosforilaciones, acetilaciones o palmitoilaciones [177].

5.3. Evaluación de los cambios de expresión en EPCs en respuesta a secretomas ateroscleróticos a distintas concentraciones y tiempos para NQO1, GCLC y GCLM.

En lo referente a otros genes que se expresan también como resultado de la up-regulación de NRF2 junto con HMOX1, tanto NQO1 como GCLC y GCLM, se analizaron solamente los cambios a nivel de mRNA (figura 44).

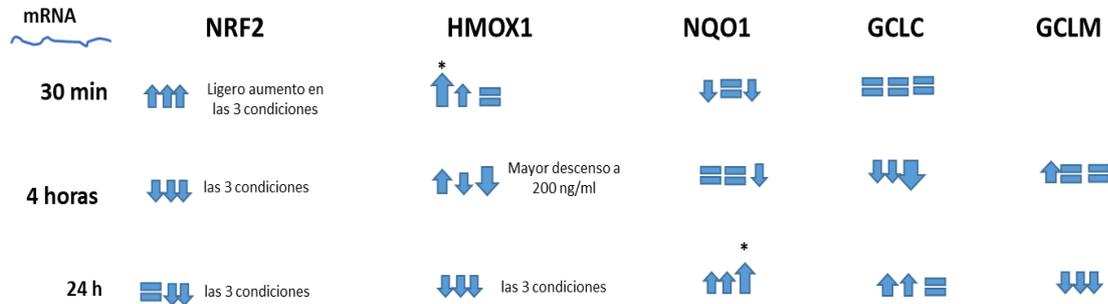


Figura 44. Esquema representativo de los cambios de expresión a nivel de mRNA de los factores NRF2, HMOX1, NQO1, GCLC y GCLM en las EPCs incubadas con secretomas ateroscleróticos a 66,67, 133,34 y 200 ng/μl respectivamente, durante 30 minutos, 4 y 24 horas.

Según estos datos, los niveles de mRNA de NQO1 comenzaron a aumentar a las 24 horas, tras el estímulo generado por los secretomas ateroscleróticos. Esto estaría de acuerdo con los resultados vistos anteriormente (en la comparativa con las arterias mamarias). Por su parte, los niveles de GCLC y GCLM disminuyeron, aunque no significativamente, a las 4 y 24 horas respectivamente en las EPCs en respuesta a los tratamientos, independientemente de la concentración. Quizás el análisis de los cambios de expresión a nivel proteico aportaría un mayor esclarecimiento de lo que pasa con estos genes en las EPCs tras el tratamiento con factores ateroscleróticos, no siendo posible llegar a conclusiones claras dada la variabilidad observada.

5.4. Evaluación de los cambios de expresión en EPCs en respuesta a secretomas ateroscleróticos a distintas concentraciones y tiempos para proteínas dependientes de la expresión de HMOX1: Ferritina (FHC), Biliverdin-reductasa A (BLVR-A) y B (BLVR-B).

Finalmente, también se analizaron los niveles de mRNA de proteínas cuya expresión es dependiente de HMOX1 (figura 45). Es el caso de Ferritina (FHC) y la Biliverdin reductasa A y B (BLVR-A y BLVR-B).

	HMOX1	FHC	BLVRA	BLVRB
30 min	<p>mRNA</p>  <p>Proteína</p>  <p>Ligero descenso a 133 ng/ml</p> <p>Núcleo Citosol</p> <p>Presencia en ambos compartimentos, ligero aumento a 133.3 y 200 en ambos</p>	<p>mRNA</p>  <p>Proteína</p>  <p>Ligero descenso a 133 ng/ml</p> <p>Núcleo Citosol</p> <p>citósólico</p>	<p>mRNA</p>  <p>Proteína</p>  <p>Núcleo Citosol</p>	<p>mRNA</p>  <p>Proteína</p>  <p>Núcleo Citosol</p>
4 horas	<p>mRNA</p>  <p>Mayor descenso a 200 ng/ml</p> <p>Proteína</p>  <p>Ligero aumento en las 3 condiciones</p> <p>Núcleo Citosol</p> <p>Presencia en ambos compartimentos, ligero aumento a 133.3 y 200 en ambos</p>	<p>mRNA</p>  <p>Ligeros cambios en las 3 condiciones</p> <p>Proteína</p>  <p>Ligero descenso a 200 ng/ml</p> <p>Núcleo Citosol</p> <p>citósólico</p>	<p>mRNA</p>  <p>Proteína</p>  <p>Núcleo Citosol</p>	<p>mRNA</p>  <p>Proteína</p>  <p>Núcleo Citosol</p>
24 h	<p>mRNA</p>  <p>las 3 condiciones</p> <p>Proteína</p>  <p>Ligero aumento en las 3 condiciones</p> <p>Núcleo Citosol</p> <p>Presencia en ambos compartimentos, mayor cantidad que en tiempos cortos</p>	<p>mRNA</p>  <p>las 3 condiciones</p> <p>Proteína</p>  <p>Ligero descenso a 200 ng/ml</p> <p>Núcleo Citosol</p> <p>citósólico</p>	<p>mRNA</p>  <p>Proteína</p>  <p>Núcleo Citosol</p>	<p>mRNA</p>  <p>Proteína</p>  <p>Núcleo Citosol</p>

Figura 45. Esquema representativo de los cambios de expresión a nivel de mRNA y proteína de HMOX1, FHC, BLVR-A y BLVR-B en las EPCs incubadas con secretomas ateroscleróticos a 66,67, 133,34 y 200 ng/ μ l respectivamente, durante 30 minutos, 4 y 24 horas.

En el caso de la ferritina, apenas se observaron cambios, ni a nivel de mRNA ni de proteína, en los tiempos cortos de incubación, independientemente de la concentración de secretoma aterosclerótico empleado. A las 24 horas sí se observó una tendencia a la disminución en los niveles de mRNA, al igual de lo que ocurría con la HMOX1 en las EPCs incubadas con las tres concentraciones de secretoma arterial, mientras que a nivel proteico no se observaron cambios significativos en ningún caso. Esta proteína se detectó siempre en el citosol.

Por último, los niveles de mRNA tanto de BLVR-A y BLVR-B disminuyeron a los 30 minutos y las 4 horas en las EPCs independientemente de la concentración empleada, siendo significativa dicha disminución para BLVR-A a las 4 horas y para BLVR-B a las 24 horas en respuesta al tratamiento de estas células con las concentraciones más elevadas de secretoma aterosclerótico (200 ng/ μ l). A las 24 horas, sin embargo, los niveles de BLVR-A aumentaron ligeramente en las EPCs tratadas con las distintas concentraciones ateroscleróticas con respecto a las EPC control, lo cual de nuevo coincidiría con el aumento significativo observado en la comparativa realizada al incubar estas células con los secretomas mamarios y carotídeos. Al igual que lo planteado con la GCLC y NQO1, sería interesante en futuros trabajos analizar los cambios a nivel proteico.

5.5. Ensayo de ROS

Los datos obtenidos experimentalmente en los ensayos de ROS son contradictorios con lo que ha principio se esperaba. Al activar la maquinaria antioxidante de las células, se esperaba que la concentración de ROS disminuya conforme avanza el tiempo. Sin embargo, vemos que ocurre lo contrario, aumenta con el tiempo hasta ser significativo para EPC-200 a 24 horas. En la bibliografía no se ha encontrado ningún resultado similar que pueda ser usado para explicar este comportamiento.

5.6. Limitaciones y perspectivas futuras

En el presente trabajo se han encontrado diversas limitaciones.

En primer lugar, la limitación en la obtención de tejidos arteriales para la obtención de secretomas ateroscleróticos y poder analizar todas las condiciones de interés (concentraciones y tiempos) supuso que en algunos casos el número de muestras (n) fue bajo, limitando la representatividad del estadístico empleado. Con una n mayor se podrían haber conseguido disminuir la dispersión de los datos, como ocurre por ejemplo con los datos de Rt-qPCR de GCLC y GCLM. Con

una n tan pequeña, debemos asumir que la distribución es no paramétrica. El test de Kluskal-Wallis funciona peor en distribuciones normales, con n pequeñas es menos probable que detecte una diferencia real [178].

Por otro lado, debido a la gran cantidad de secretomas que se requiere para realizar cada experimento, fue casi imposible emplear las muestras procedentes de los mismos donantes para realizar los Western Blot y RT-qPCR en paralelo.

La variabilidad observada podría deberse a la variabilidad interindividual, por lo que sería necesario evaluar la procedencia de cada muestra, con pacientes que presentan distintos cuadros clínicos: diabéticos/no diabéticos, fumadores y no fumadores; hipertensos, etc. Por su parte, las EPC se obtuvieron también de buffies de distintos donantes.

No obstante, después de todo lo expuesto, a pesar de que en algunos casos no se observaron resultados estadísticamente significativos, si se vieron tendencias claras, lo que sugiere que el modelo empleado es óptimo y que el aumento de un mayor número de muestras, considerando los parámetros señalados por pacientes permitiría confirmar los resultados observados.

Respecto a los experimentos de ROS, se observó que las células fueron bastante sensibles a este ensayo, probablemente porque la sonda usada necesita ser disuelta en DMSO, que es tóxico para las células. En el caso del ensayo de ROS, el proveedor recomienda usar la sonda a concentraciones de entre 10 y 50 μM . Tras probar distintas concentraciones de trabajo, se optó por usar la concentración final de 2,5 μM . Concentraciones superiores producían la muerte de las células y concentraciones inferiores no producían una señal distinguible del ruido de fondo. Esto podría explicar en parte los resultados de los ensayos de ROS.

Perspectivas futuras

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente, en futuros ensayos sería conveniente por un lado aumentar el número de muestras experimentales, y por otro analizar también los cambios de expresión a nivel proteico para algunos de los genes en los que solo se miraron los cambios a nivel de mRNA. Del mismo modo, también sería óptimo ampliar el estudio de los genes que regulan a HMOX1 como AP1 o Bach1

En estudios futuros se plantea emplear otro tipo de arterias control no ateroscleróticas distintas a las arterias mamarias, ya sea a través de pacientes sometidos a otro tipo de cirugías, o en cadáveres.

En cualquier caso, resulta interesante seguir profundizando en el efecto diferencial que tienen las arterias carotídeas ateroscleróticas respecto a arterias mamarias no ateroscleróticas, puesto que ambos son indicativos de la patología subyacente al paciente del cual se extrajeron estas muestras.

Por último, también sería interesante para completar la visión de conjunto del modelo, estudiar las citoquinas y microARN liberados por las arterias en los secretomas.

6. CONCLUSIONES

Del presente trabajo se derivan las siguientes conclusiones.

-La incubación de EPC sanas con secretomas provenientes de arterias mamarias no ateroscleróticas (MA) y arterias ateroscleróticas (AP), provocan cambios de expresión génica en la ruta de NRF2/HMOX1 a 24 horas, comparado con EPC sin tratamiento.

-La incubación con ambos tipos de secretomas durante 24 horas, promueve la sobre-expresión de NRF2, FHC, NQO1, BLVR-A y BLVR-B, en comparación con las EPCs basales.

-Los niveles de regulación génica de HSF1 disminuyeron significativamente en respuesta a ambos secretomas en EPC a las 24 horas de incubación.

-Los niveles de regulación de HMOX1 disminuyeron significativamente en respuesta a la incubación con los secretomas de MA y AP en EPC tras 24 horas de incubación.

-Las EPC incubadas con secretomas ateroscleróticos muestran cambios diferenciales en la expresión génica de la ruta NRF2/HMOX1 dosis y tiempo dependientes.

-En EPC incubadas con secretomas procedentes de AP, HSF1 parece regular negativamente a HMOX1.

-KEAP1, GCLC y GCLM, muestran comportamientos distintos entre EPC+MA y EPC +AP al estar expuestos a estos secretomas en EPC a los 24 horas de incubación.

-Las MA provenientes de revascularización de pacientes ateroscleróticos no son aptas para ser usadas como control, ya que parece que se ven afectadas por las moléculas liberadas por la lesión aterosclerótica.

-Existe una regulación dosis y tiempo dependientes de los genes de estudio en EPC incubadas con 66,67 ng/ μ l, 133,34 ng/ μ l y 200ng/ μ l de secretomas a 30 min, 4 horas y 24 horas.

-Tras 30 minutos de incubación de las EPC con los secretomas, ya se está produciendo la traslocación de NRF2 al núcleo a altas concentraciones de secretoma, lo que implica un aumento significativo del ARNm de NRF2, así como una disminución de HSF1 a altas concentraciones tanto a nivel proteico como génico.

-Tras 30 minutos de incubación con los secretomas, las EPC ya empiezan a aumentar significativamente la cantidad de mRNA de HMOX1 a bajas concentraciones y de forma decreciente con la concentración. Alcanzando el máximo a las 4 horas.

-HMOX1 se transloca al núcleo desde tiempos cortos, lo que podría indicar una función reguladora no canónica de esta proteína, aunque no lo hace de forma dosis dependiente.

-NQO1 empieza a aumentar sus niveles de expresión génica tras 24 horas de incubación en EPC, siendo significativa en el caso de la mayor, y disminuyendo con forma lo hace la concentración de los secretomas.

-BLVR-A a las 4 horas de incubación con secretomas, disminuye significativamente su regulación génica de forma independiente de HMOX1 a altas concentraciones en EPC.

-BLVR-B tras 4 y 24 horas de incubación con secretomas parece regularse génicamente de forma independiente de HMOX1, siendo significativamente bajo a altas concentraciones a las 24 horas.

7. BIBLIOGRAFIA

Uncategorized References

1. Organization, W.H. *Cardiovascular diseases (CVDs)*. 11 June 2021; Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cardiovascular-diseases-cvds>.
2. Fuyong Du, J.Z., Ren Gong, Xiao Huang, Meghana Pansuria, Anthony Virtue, Xinyuan Li, Hong Wang, and Xiao-Feng Yang, *Endothelial progenitor cells in atherosclerosis*. *Frontiers Bioscience*, 2012. **17**: p. 2327–2349.
3. Institute, N.H.L.a.B., *Coronary Heart Disease*. September 30, 2019.
4. Medlineplus. *Peripheral Arterial Disease* Available from: <https://medlineplus.gov/peripheralarterialdisease.html>.
5. Medlineplus. *Pulmonary embolus*. Available from: <https://medlineplus.gov/ency/article/000132.htm>.
6. Eurostat. *Estadísticas sobre causas de muerte* Junio 2020; Available from: https://ec.europa.eu/eurostat/statistics-explained/index.php?title=Causes_of_death_statistics/es&oldid=505766.
7. Esdadística, I.N.d., *Defunciones según la Causa de Muerte Año 2018*.
8. Elizabeth Wilkins, L.W., Kremlin Wickramasinghe, Prachi Bhatnagar, Mike Rayner, Nick Townsend, Jose Leal, Ramon Luengo-Fernandez and Richéal Burns, *European Cardiovascular Disease Statistics 2017 edition*. European Heart Network AISBL, 2017.
9. Beatriz Herrero-Fernandez, R.G.-B., Beatriz Somovilla-Crespo and Jose Maria Gonzalez-Granado, *Immunobiology of Atherosclerosis: A Complex Net of Interactions*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019. **20(21)**: p. 5293.
10. Anita Ayer, A.Z., Anupam Agarwal, and Roland Stocker, *Heme Oxygenase in cardiovascular health and disease*. *Physiological Reviews*, 2016. **96(4)**: p. 1449–1508.
11. Patricia Marchio, S.G.-O., José M. Vila, Martín Aldasoro, Victor M. Victor, and Maria D. Mauricio *Targeting Early Atherosclerosis: A Focus on Oxidative Stress and Inflammation*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019. **2019**.
12. Peter Libby, J.E.B., Lina Badimon, Göran K. Hansson, John Deanfield, Márcio Sommer Bittencourt, Lale Tokgözoğlu and Eldrin F. Lewis *Atherosclerosis*. *Nature Reviews Disease Primers*, 2019. **5**.
13. Elaine Schwartz, A.M.A.a.O.O.B., *Isolation and characterization of the internal elastic lamina from calf thoracic aorta*. *Experimental and Molecular Pathology*, 1981. **34(3)**: p. 299-306.
14. Ganz, J.D.a.P., *Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis*. *Circulation*, 2004. **109**: p. III-27–III-32.
15. Joselyn Rojas, J.S., María Sofía Martínez, Jim Palmar, Jordan Bautista, Mervin Chávez-Castillo, Alexis Gómez, and Valmore Bermúdez, *Macrophage Heterogeneity and Plasticity: Impact of Macrophage Biomarkers on Atherosclerosis*. *Scientifica*, 2015. **2015**.
16. Hadi A.R., C.S.C., and Jassim Al Suwaidi, *Endothelial Dysfunction: Cardiovascular Risk Factors, Therapy, and Outcome*. *Vascular Health Risk Management*, 2005. **1(3)**.
17. Meei Ling Sheu, F.M.H., Rong Sen Yang, Kuo Fang Chao, Wan Wan Lin, Shoei Yn Lin-Shiau, and Shing-Hwa Liu, *High Glucose Induces Human Endothelial Cell Apoptosis Through a Phosphoinositide 3-Kinase–Regulated Cyclooxygenase-2 Pathway*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2005. **25(3)**: p. 539-545.
18. Chien-Hsing Lee, Y.-S.S., Fone-Ching Hsiao, Feng-Chih Kuo, Chih-Yuan Lin, Chang-Hsun Hsieh, and Yi-Jen Hung, *High glucose induces human endothelial dysfunction through an Axl-dependent mechanism*. *Cardiovascular Diabetology*, 2014. **13**: p. 53.

19. Xueliang Du, K.S.-F.a.P.R., *Generation of reactive oxygen intermediates, activation of NF-kappaB, and induction of apoptosis in human endothelial cells by glucose: role of nitric oxide synthase?*. Free Radical Biology and Medicine, 1999. **27**(7-8): p. 752-63.
20. M. Harada-Shiba, M.K., H. Kamido and K. Shimokado, *Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **273**(16): p. 9681-9687.
21. Walsh, M.S.a.K., *Oxidized LDL Activates Fas-mediated Endothelial Cell Apoptosis*. J. Clin. Investig., 1998. **102**(9): p. 1682-1689.
22. Stephanie Paone, A.A.B., Mark D. Hulett, Ivan K. H. Poon, *Endothelial cell apoptosis and the role of endothelial cell-derived extracellular vesicles in the progression of atherosclerosis*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2019. **76**: p. 1093-1106.
23. M. Harada-Shiba, M.K., H. Kamido and K. Shimokado, *Oxidized low density lipoprotein induces apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells by common and unique mechanisms*. Journal of Biological Chemistry, 1998. **Apr 17;273**(16): p. 9681-7.
24. Walsh, M.S.a.K., *Oxidized LDL Activates Fas-mediated Endothelial Cell Apoptosis*. Journal of Clinical Investigation, 1998. **102**(9): p. 1682-1689.
25. Genovefa Kolovou, V.K.a.S.M., *Lipidomics in vascular health: current perspectives*. Vascular Health and Risk Management, 2015. **11**: p. 333-342.
26. Tabas, I., *Consequences and therapeutic implications of macrophage apoptosis in atherosclerosis the importance of lesion stage and phagocytic efficiency*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005. **25**: p. 2255-2264.
27. Butany, T.W.a.J., *Pathogenesis of atherosclerosis*, D. Histopathology, Editor. 2017.
28. Karen S. Moulton, E.H., Moritz A. Konerding, Evelyn Flynn, Wulf Palinski, and Judah Folkman, *Angiogenesis Inhibitors Endostatin or TNP-470 Reduce Intimal Neovascularization and Plaque Growth in Apolipoprotein E-Deficient Mice*. Circulation, 1999. **99**(13): p. 1726-1732.
29. Francesca Vinchi, M.U.M., Milene C. Da Silva, György Balla, József Balla and Viktória Jeney, *Atherogenesis and iron: from epidemiology to cellular level*. Frontiers in Pharmacology, 2014.
30. Russell P. Rother, L.B., Peter Hillmen and Mark T Gladwin, *The Clinical Sequelae of Intravascular Hemolysis and Extracellular Plasma Hemoglobin A Novel Mechanism of Human Disease*. Journal of the American Medical Association, 2005. **293**(13): p. 1653-1662.
31. Sullivan, J.L., *Iron and the sex difference in heart disease risk*. The Lancet, 1981. **317**(8233): p. 1293-1294.
32. Lian-Jiu Su, J.-H.Z., Hernando Gomez, Raghavan Murugan, Xing Hong, Dongxue Xu, Fan Jiang, and Zhi-Yong Peng, *Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019. **2019**: p. 5080843.
33. Jose Angel Alonso-Piñeiro, A.G.-R., Ismael Sánchez-Gomar, Juan Antonio Moreno and Ma Carmen Durán-Ruiz, *Nrf2 and Heme Oxygenase-1 Involvement in Atherosclerosis Related Oxidative Stress*. Antioxidants, 2021. **10**: p. 1463.
34. Dimitry A. Chistiakov, Y.V.B., and Alexander N. Orekhov, *Changes in transcriptome of macrophages in atherosclerosis*. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2015. **19**(6): p. 1163-1173.
35. Andrew P. Sage, Y.T.a.L.L.D., *Regulatory mechanisms in vascular calcification*. Nature Reviews Cardiology, 2010. **7**(9): p. 528-536.
36. Susama Rani Mandal, A.B., Rezvan Ravanfar Haghighi, Sudhir Arava, Ruma Ray, Priya Jagia, Sanjiv Sharma, Sabyasachi Chatterjee, Millo Tabin, Munish Sharma, Sanjay Sharma and Pratik Kumar, *Non-invasive characterization of coronary artery atherosclerotic plaque using dual energy CT: Explanation in ex-vivo samples*. Physica Medica, 2018. **45**: p. 52-58.
37. Rui Fan, D.T., Chun Yang, Jie Zheng, Richard Bach, Liang Wang, David Muccigrosso, Kristen Billiar, Jian Zhu, Genshan Ma, Akiko Maehara and Gary S Mintz, *Human coronary plaque wall thickness correlated positively with flow shear stress and negatively with plaque wall stress:*

- an IVUS-based fluid-structure interaction multi-patient study* BioMedical Engineering OnLine, 2014. **13**(1): p. 32.
38. Guus W. van Lammeren, F.L.M., Gert Jan De Borst, Dominique P.V de Kleijn, Jean-Paul P.M. de Vries and Gerard Pasterkamp, *Atherosclerotic Plaque Biomarkers: Beyond the Horizon of the Vulnerable Plaque*. Current Cardiology Reviews, 2011. **7**(1): p. 22–27.
39. Yuliya Mikhed, A.G., Ulla G. Knaus and Andreas Daiber, *Redox regulation of genome stability by effects on gene expression, epigenetic pathways and DNA damage/repair*. Redox Biology, 2015. **5**: p. 275-289.
40. Bo Chen , Y.L., Younan Chen and Jingqiu Cheng *The role of Nrf2 in oxidative stress-induced endothelial injuries*. Journal of Endocrinology, 2015. **225**(3): p. R83–R99.
41. Victor Adler, Z.Y., Kenneth D. Tew and Ze'ev Ronai, *Role of redox potential and reactive oxygen species in stress signaling*. Oncogene, 1999. **18**: p. 6104–6111.
42. Paul D. Ray, B.-W.H., and Yoshiaki Tsuji, *Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling*. Cellular signalling, 2012. **24**(5): p. 981–990.
43. Raffaella Gozzelino, V.J.a.M.P.S., *Mechanisms of cell protection by heme Oxygenase-1*. Annual Review of Pharmacology and Toxicology, 2010. **50**: p. 323–354.
44. Sharadha Dayalan Naidu, R.V.K.a.A.T.D.-K., *Transcription factors Hsf1 and Nrf2 engage in crosstalk for cytoprotection*. Trends in Pharmacological Sciences 2015. **36**(1): p. 6-14.
45. Susanna Fiorelli, B.P., Nicola Cosentino, Alessandro Di Minno, Chiara Maria Manega, Franco Fabbicocchi, Giampaolo Niccoli, Francesco Fracassi, Simone Barbieri, Giancarlo Marenzi, Filippo Crea, Viviana Cavalca, Elena Tremoli and Sonia Eligini, *Activation of Nrf2/HO-1 Pathway and Human Atherosclerotic Plaque Vulnerability: An In Vitro and In Vivo Study*. Cells, 2019. **8**(4).
46. Ulrich Förstermann, N.X.a.H.L., *Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis*. Circulation Research, 2017. **120**: p. 713–735.
47. Sven Wassmann, K.W.a.G.N., *Modulation of Oxidant and Antioxidant Enzyme Expression and Function in Vascular Cells*. Hypertension, 2004. **44**: p. 381–386.
48. Kobayashi, Y.F.a.M., *Conservation of the Keap1-Nrf2 System: An Evolutionary Journey through Stressful Space and Time* Molecules, 2017. **22**(3): p. 436.
49. Lauren E. Tebay, H.R., Stephen T. Durant, Steven R. Vitale, Trevor M. Penning, Albena T. Dinkova-Kostova and John D.Hayes, *Mechanisms of activation of the transcription factor Nrf2 by redox stressors, nutrient cues, and energy status and the pathways through which it attenuates degenerative disease*. Free Radical Biology and Medicine, 2015. **88**: p. 108-146.
50. P. Moi , K.C., I. Asunis, A. Cao and Y. W. Kan, *Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the beta-globin locus control region* Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994. **91**(21): p. 9926-30.
51. Bohmann, G.P.S.a.D., *Stress-Activated Cap'n'collar Transcription Factors in Aging and Human Disease*. Sci Signal, 2010. **3**(112): p. re3.
52. Saso, E.P.a.L., *Potential Applications of NRF2 Inhibitors in Cancer Therapy*. Oxid Med Cell Longev, 2019. **2019**: 8592348.
53. BARRERA-RODRÍGUEZ, R., *Importance of the Keap1-Nrf2 pathway in NSCLC: Is it a possible biomarker?*. BIOMEDICAL REPORTS 2018. **9**: p. 375-382.
54. Kei Hiramatsu, T.T., Takahiro Ogawa, Naoaki Morihara, *Aged garlic extract enhances heme oxygenase-1 and glutamate-cysteine ligase modifier subunit expression via the nuclear factor erythroid 2–related factor 2–antioxidant response element signaling pathway in human endothelial cells*. Nutrition Research, 2016. **36**(2): p. 143-149.
55. Ryan Holland, A.E.H., Aimee L. Egger, Andrew D. Mesecar, Daniele Fabris, and James C. Fishbein, *Prospective Type 1 and Type 2 Disulfides of Keap1 Protein*. Chemical Research in Toxicology 2008. **21**(10): p. 2051-2060.

56. Bellezza, I., Giambanco, I., Minelli, A., & Donato, R., *Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress*. . Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research 2018. **1865**(5): p. 721–733.
57. Patricia Rada, A.I.R., Sudhir Chowdhry, Antonio Cuadrado, *SCF/-TrCP Promotes Glycogen Synthase Kinase 3-Dependent Degradation of the Nrf2 Transcription Factor in a Keap1-Independent Manner*. Molecular and Cellular Biology, 2011. **31**(6): p. 1121-33.
58. María Salazar, A.I.R., Diego Velasco, Rosa María de Sagarra, Antonio Cuadrado, *Glycogen Synthase Kinase-3 β Inhibits the Xenobiotic and Antioxidant Cell Response by Direct Phosphorylation and Nuclear Exclusion of the Transcription Factor Nrf2*. Journal of Biological Chemistry, 2006. **281**(21): p. 14841-14851.
59. Jaiswal, A.K.J.a.A.K., *GSK-3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(22): p. 16502–16510.
60. Tina M. Thornton, G.P.-A., Bin Deng, C. David Wood, Alexander Aronshtam, James L. Clements, Guadalupe Sabio, Roger J. Davis, Dwight E. Matthews, Bradley Doble, and Mercedes Rincon, *Phosphorylation by p38 MAPK as an Alternative Pathway for GSK3 β Inactivation*. Science, 2008. **320**(5876): p. 667–670.
61. Guoxiang Shen, V.H., Sujit Nair, Changjiang Xu, Wenge Li, Wen Lin, Young-Sam Keum, Jiahuai Han, Michael A. Gallo, A. N. Tony Kong, *Regulation of Nrf2 Transactivation Domain Activity: The differential effects of mitogen-activated protein kinase cascades and synergistic stimulatory effect of raf and creb-binding protein*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(22): p. 23052-23060.
62. Elbirt K K, W.A.J., Davis R J, and Bonkovsky H L , *Mechanism of sodium arsenite-mediated induction of heme oxygenase-1 in hepatoma cells. Role of mitogen-activated protein kinases*. . J Biol Chem., 1998. **273**(15): p. 8922-8931.
63. H.-C. Huang, T.N.a.C.B.P., *Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by Protein Kinase C Regulates Antioxidant Response Element-mediated Transcription*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(November 8): p. 42769 –42774.
64. Cullinan S B, a.D.J.A., *PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress*. J Biol Chem. , 2004. **279**(19): p. 20108-20117.
65. Min Sung Joo, W.D.K., Ki Young Lee, Ji Hyun Kim, Ja Hyun Koo and Sang Geon, *AMPK Facilitates Nuclear Accumulation of Nrf2 by Phosphorylating at Serine 550*. Molecular and Cellular Biology, 2016. **36**(14).
66. Muhua Yang, Y.Y., Gabriel Eades, Yongshu Zhang, and Qun Zhou, *MiR-28 regulates Nrf2 expression through a Keap1-independent mechanism*. Breast Cancer Res Treat., 2011. **129**(3): p. 983–991. .
67. Xinli Huang, Y.G., Jianjie Qin and Sen Lu, *The Role of miR-34a in the Hepatoprotective Effect of Hydrogen Sulfide on Ischemia/Reperfusion Injury in Young and Old Rats*. PLoS One, 2014. **2014**.
68. Xiaowu Wang, B.Y., Biao Cheng, Ying Liu, Ben Zhang, Xianyu Wang, Xi Lin, Bo Yang and Gu Gong, *Crocin Alleviates Myocardial Ischemia/Reperfusion-Induced Endoplasmic Reticulum Stress via Regulation of miR-34a/Sirt1/Nrf2 Pathway*. SHOCK, 2019. **51**(1): p. 123-130.
69. Anna Stachurska, M.C., Magdalena Kozakowska, Siegfried Wolfram, Christine Boesch-Saadatmandi, Gerald Rimbach, Alicja Jozkowicz, Jozef Dulak and Agnieszka Loboda, *Cross-talk between microRNAs, nuclear factor E2-related factor 2, and heme oxygenase-1 in ochratoxin A-induced toxic effects in renal proximal tubular epithelial cells*. Mol. Nutr. Food Res., 2013. **57**: p. 504–515.
70. Chunlei Zhou, L.Z., Jian Zheng, Kai Wang, Haixia Deng, Ping Liu, Li Chen and Hong Mu, *MicroRNA-144 modulates oxidative stress tolerance in SH-SY5Y cells by regulating nuclear factor erythroid 2-related factor 2-glutathione axis*. Neuroscience Letters, 2017. **655**: p. 21-27.

71. Madhusudhanan Narasimhan, D.P., Dhanashree Vedpathak, Marylatha Rathinam, George Henderson, Lenin Mahimainathan, *Identification of Novel microRNAs in Post-Transcriptional Control of Nrf2 Expression and Redox Homeostasis in Neuronal, SH-SY5Y Cells*. PLoS One, 2012.
72. Sai Zhao, L.M., Shou-Guo Wang, Feng-Li Chen, Feng Ji and Hao-Dong Fei, *MicroRNA-200a activates Nrf2 signaling to protect osteoblasts from dexamethasone*. Oncotarget, 2017. **8**: p. 104867-104876.
73. Weitang Liao, Z.F., Yanfang Zou, Dan Wen, Hongkun Ma, Fangfang Zhou, Yongxi Chen, Mingjun Zhang and Wen Zhang, *MicroRNA-140-5p attenuated oxidative stress in Cisplatin induced Acute Kidney Injury by activating Nrf2/ARE pathway through a Keap1-independent mechanism*. Experimental Cell Research, 2017. **360**(2): p. 292-302.
74. Wang Jian, I.M., Xu Liang, Xia Chunli, Chen Chunli and Li Jichang, *METTL3/m6A/miRNA-873-5p Attenuated Oxidative Stress and Apoptosis in Colistin-Induced Kidney Injury by Modulating Keap1/Nrf2 Pathway*. Frontiers in Pharmacology 2019. **10**: p. 517.
75. S. Inouye, Y.H., T. Kubo, S. Saito, H. Kitamura and R. Akagi, *NRF2 and HSF1 coordinately regulate heme oxygenase-1 expression*. Biochem. Biophys. Res. Commun., 2018. **506**(1): p. 7-11.
76. Yehonatan Gottlieb, M.T., Lyora A. Cohen, Yael Leichtmann-Bardoogo and, Esther G. Meyron-Holtz, *Endoplasmic reticulum anchored heme-oxygenase 1 faces the cytosol*. Haematologica, 2012. **97**(10): p. 1489–1493.
77. Jesus A. Araujo, M.Z., Fen Yin *Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis*. Frontiers in Pharmacology, 2012. **3**.
78. C. Mancuso, E.B., *The Heme Oxygenase/Biliverdin Reductase Pathway in Drug Research and Development*. Current Drug Metabolism, 2009. **10**(6): p. 579 - 594.
79. Yoshimi Kishimoto, K.K.a.Y.M., *The protective role of heme oxygenase-1 in atherosclerotic diseases*. International Journal of Molecular Sciences, 2019. **20**(15): p. 3628.
80. Funes, S.C., et al., *Naturally Derived Heme-Oxygenase 1 Inducers and Their Therapeutic Application to Immune-Mediated Diseases*. Frontiers in Immunology, 2020. **11**(1467).
81. Devesa, M.L.F.a.l., *Inducers of Heme Oxygenase-1*. Current Pharmaceutical Design 2008. **14**(5).
82. Matthias W. Hentze, M.U.M., Bruno Galy and Clara Camaschella, *Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism*. Cell, 2010. **142**(1): p. 24-38.
83. Leo E. Otterbein, R.F., and Roberto Motterlini, *Heme Oxygenase-1 and Carbon Monoxide in the Heart. The Balancing Act Between Danger Signaling and Pro-Survival*. Circulation Research, 2016. **118**: p. 1940–1959.
84. Sophie Brouard, L.E.O., Josef Anrather, Edda Tobiasch, Fritz H. Bach, Augustine M.K. Choi and Miguel P. Soares, *Carbon Monoxide Generated by Heme Oxygenase 1 Suppresses Endothelial Cell Apoptosis*. J Exp Med 2000. **192**(7): p. 1015–1026.
85. Sullivan, J.L., *Iron in arterial plaque: A modifiable risk factor for atherosclerosis*. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research, 2008. **1790**(7): p. 718-723.
86. Giacomo Canesin, S.M.H., Kenneth D. Swanson and Barbara Wegiel, *Heme-Derived Metabolic Signals Dictate Immune Responses*. Front. Immunol., 2020. **11**.
87. Ladislav Novotný, a.L.V., *Inverse Relationship Between Serum Bilirubin and Atherosclerosis in Men: A Meta-Analysis of Published Studies*. Experimental Biology and Medicine, 2003. **228**(5): p. 568-571.
88. Cheng, C., et al., *Heme Oxygenase 1 Determines Atherosclerotic Lesion Progression Into a Vulnerable Plaque*. Circulation, 2009. **119**.
89. Luz D. Orozco, M.H.K., Berenice Barajas, Xuping Wang, Michael M. Weinstein, Jack Wong, Jessy Deshane, Subhashini Bolisetty, Zory Shaposhnik, Diana M. Shih, Anupam Agarwal, Aldons J. Lusis, and Jesus A. Araujo, *Heme Oxygenase-1 Expression in Macrophages Plays a Beneficial Role in Atherosclerosis*. Circulation Research, 2007. **100**: p. 1703–1711.

90. Shaw-Fang Yet, M.D.L., Xiaoli Liu, Yen-Hsu Chen, Bonna Ith, Nicholas E. S. Sibinga and Mark A. Perrella,, *Absence of heme oxygenase-1 exacerbates atherosclerotic lesion formation and vascular remodeling*. The FASEB Journal, 2003. **17**(12): p. 1759-1761.
91. Danan Liu, Z.H., Lirong Wu and Ying Fang, *Effects of Induction/Inhibition of Endogenous Heme Oxygenase-1*

on Lipid Metabolism, Endothelial Function, and Atherosclerosis

in Rabbits on a High Fat Diet. J Pharmacol Sci, 2012. **118**: p. 14-24.

92. Franklin C. C., B.D.S., Mohar I., White C.C., Forman H.J and Kavanagh T.J. , *Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase*. Mol Aspects Med, 2009. **30**(1-2): p. 86-98.
93. Wang-Soo Lee, W.H.a.J.K., *Roles of NAD(P)H:quinone Oxidoreductase 1 in Diverse Diseases*. Frontiers in Vascular Biology, 2021. **11**(12): p. 1301.
94. Nutrition, T.A.J.o.C., *Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence*. The American Journal of Clinical Nutrition, 2000. **72**(5): p. 1307s–1315s.
95. MA, C., *Pathogenesis of atherosclerosis*. American Society of Hematology, 2005: p. 436-41.
96. Sawsan Youssef, O.S., Juan C. Patarroyo, Pedro J. Ruiz, Jennifer L. Radosevich, Eun Mi Hur, Manuel Bravo, Dennis J. Mitchell, Raymond A. Sobel, Lawrence Steinman & Scott S. Zamvil, *The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease*. Nature, 2002. **420**: p. 78–84.
97. Galina Dragneva, P.K.a.S.Y.-H., *Promoting blood vessel growth in ischemic diseases: challenges in translating preclinical potential into clinical success* Dis Model Mech, 2013. **6**(2): p. 312-322.
98. Xinyi Wan, Y.H., Michael Johns, Emma Piper, Justin C. Mason, David Carling, Dorian O. Haskard, and Joseph J. Boyle, *5'-AMP-Activated Protein Kinase-Activating Transcription Factor 1 Cascade Modulates Human Monocyte-Derived Macrophages to Atheroprotective Functions in Response to Heme or Metformin*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2013. **33**(11): p. 2470–2480.
99. Kervadec A, B.V., El Harane N, Arakélian L, Vanneaux V, Cacciapuoti I, Nemetalla H, Périer MC, Toeg HD, Richart A, Lemitre M, Yin M, Loyer X, Larghero J, Hagège A, Ruel M, Boulanger CM, Silvestre JS, Menasché P and Renault NK. , *Cardiovascular progenitor-derived extracellular vesicles recapitulate the beneficial effects of their parent cells in the treatment of chronic heart failure*. J Heart Lung Transplant., 2016. **35**(6): p. 795-807.
100. Andreas Schober, M.N.-J., Yuanyuan Wei, Kiril Bidzhekov, Felix Gremse, Jochen Grommes, Remco T. A. Megens, Kathrin Heyll, Heidi Noels, Michael Hristov, Shusheng Wang, Fabian Kiessling, Eric N. Olson and Christian Weber, *MicroRNA-126-5p promotes endothelial proliferation and limits atherosclerosis by suppressing Dlk1*. Nature medicine, 2014. **20**(4): p. 368-379.
101. Mohammed Rabiul Hosen, P.R.G., Andreas Zietzer, Georg Nickenig, Felix Jansen, *MicroRNAs as master regulators of atherosclerosis: from pathogenesis to novel therapeutic options*. Antioxidants and Redox Signaling, 2020. **33**.
102. Yao Lu, T.T., Wenduo Gu, Jingjing Cai and Qingbo Xu, *Impact of miRNA in Atherosclerosis*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2018. **38**(9): p. e159-e170.
103. Peters Linsey J. F., B.E.A.L., Hohl Mathias, Weber Christian, van der Vorst Emiel P. C. and Santovito Donato, *Small Things Matter: Relevance of MicroRNAs in Cardiovascular Disease*. Frontiers in Physiology, 2020. **11**: p. 793.
104. Cathal McCarthy, M.M.D., Declan Mooney, William G. James, Matthew D. Griffin, Desmond J. Fitzgerald and Orina Belton, *IL-10 mediates the immunoregulatory response in conjugated linoleic acid-induced regression of atherosclerosis*. FASEB J, 2012. **27**(2): p. 499-510.

105. Bonati, L.H., Kakkos, S., Berkefeld, J., de Borst, G. J., Bulbulia, R., Halliday, A., van Herzelee, I., Koncar, I., McCabe, D. J., Lal, A., Ricco, J. B., Ringleb, P., Taylor-Rowan, M., and Eckstein, H. H. , *European Stroke Organisation guideline on endarterectomy and stenting for carotid artery stenosis*. . European stroke journal, , 2021 **6**(2): p. I–XLVII.
106. Müller MD, L.P., Brown MM and Bonati LH. , *Carotid artery stenting versus endarterectomy for treatment of carotid artery stenosis*. Cochrane Database Syst Rev. , 2020. **2**(2): p. CD000515.
107. Li, Y., Yang, J. J., Zhu, S. H., Xu, B., and Wang, L. , *Long-term efficacy and safety of carotid artery stenting versus endarterectomy: A meta-analysis of randomized controlled trials*. . PloS one, 2017. **12**(7): p. e0180804.
108. Bonati, L.H., Gregson, J., Dobson, J., McCabe, D., Nederkoorn, P. J., van der Worp, H. B., de Borst, G. J., Richards, T., Cleveland, T., Müller, M. D., Wolff, T., Engelter, S. T., Lyrer, P. A., Brown, M. M., and International Carotid Stenting Study investigators, *Restenosis and risk of stroke after stenting or endarterectomy for symptomatic carotid stenosis in the International Carotid Stenting Study (ICSS): secondary analysis of a randomised trial*. . The Lancet. Neurology, 2018. **17**(7): p. 587–596.
109. Francesco Stilo, N.M., Rosalinda Calandrelli, Marisa Distefano, Francesco Spinelli, Vincenzo Di Lazzaro and Fabio Pilato, *The management of carotid restenosis: a comprehensive review*. . Annals of translational medicine, , 2020. **8**(19): p. 1272.
110. Lucía Beltrán-Camacho, M.J.-P., Ismael Sanchez-Gomar, Antonio Rosal-Vela, Marta Rojas-Torres, Sara Eslava-Alcon, Jose Angel Alonso-Piñeiro, Almudena González-Rovira, M^a Jesús Extremera-García, Rosario Conejero, Esther Doiz, Manuel Rodriguez-Piñero, Martin R. Larsen and M^a Carmen Duran-Ruiz, *Long Term Response to Circulating Angiogenic Cells, Unstimulated or Atherosclerotic Pre-Conditioned, in Critical Limb Ischemic Mice*. Biomedicines, 2021. **9**(9): p. 1147.
111. Durante, W., *Targeting Heme Oxygenase-1 in Vascular Disease*. Curr Drug Targets, 2010. **11**(12): p. 1504–1516.
112. Durante, W., *Targeting Heme Oxygenase-1 in the Arterial Response to Injury and Disease*. Antioxidants, 2020. **9**: p. 829.
113. Keiichi Kawamura, K.I., Youichiro Wada, Satoshi Kimura, Hayato Matsumoto, Takahide Kohro, Hiroyuki Itabe, Tatsuhiko Kodama, and Yukio Maruyama, *Bilirubin From Heme Oxygenase-1 Attenuates Vascular Endothelial Activation and Dysfunction*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2005. **25**: p. 155–160.
114. A. E. Bharucha, A.K., K. M. Choi, M. Camilleri, M. Lempke, G. J. Brunn, S. J. Gibbons, A. R. Zinsmeister and G. Farrugia, *First-in-Human Study Demonstrating Pharmacological activation of Heme Oxygenase-1 in Humans*. Clinical Pharmacology & Therapeutics, 2010. **87**(2): p. 187-190.
115. Zhewei Zhao, C.L., Tianjia Li, Wenda Wang, Wei Ye, Rong Zeng, Leng Ni, Zhichao Lai, Xuebin Wang and Changwei Liu, *The protective effect of melatonin on brain ischemia and reperfusion in rats and humans: In vivo assessment and a randomized controlled trial*. Journal of Pineal Research, 2018. **65**(4): p. e12521.
116. Ghazaleh Behnammanesh, G.L.D., Yash P. Khanna, Kelly J. Peyton, and William Durante, *Canagliflozin inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration: Role of heme oxygenase-1*. Redox Biology, 2020. **32**: p. 101527.
117. Javier Egea , Á.G.-R., Carmen Gómez-Guerrero and Juan Antonio Moreno, *Editorial: Role of Nrf2 in Disease: Novel Molecular Mechanisms and Therapeutic Approaches* Front Pharmacol, 2019. **10**: p. 1149.
118. Walle, T., *Bioavailability of resveratrol*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2011. **1215**(1): p. 9-15.
119. MOTTERLINI, E.B.M.H.P.G.E.K.C.J.G.R.F.J.A.R., *Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element*. Biochem J, 2003. **371**(3): p. 887–895.

120. Xiaobo Yang, H.J.a.Y.S., *Upregulation of heme oxygenase-1 expression by curcumin conferring protection from hydrogen peroxide-induced apoptosis in H9c2 cardiomyoblasts*. Cell & Bioscience, 2017. **7**(20).
121. Hatem E. Sabaawy, F.Z., Xuandai Nguyen, Abdelmonem ElHosseiny, Alberto Nasjletti, Michal Schwartzman, Phyllis Dennery, Attallah Kappas, and Nader G. Abraham, *Human Heme Oxygenase-1 Gene Transfer Lowers Blood Pressure and Promotes Growth in Spontaneously Hypertensive Rats*. Hypertension, 2001. **38**: p. 210-215.
122. Pejman Hamedi-Asl, R.H., Parisa Bahmani, Mahshid Mohammadipour, Mohammad Mohammadzadeh, Amaneh Mohammadi Roushandeh, Ali Jahanian-Najafabadi, Yoshikazu Kuwahara and Mehryar Habibi Roudkenar, *Adenovirus-mediated expression of the HO-1 protein within MSCs decreased cytotoxicity and inhibited apoptosis induced by oxidative stresses*. Cell Stress and Chaperones, 2012. **17**: p. 181-190.
123. David A. Tulis, W.D., XiaoMing Liu, Alida J. Evans, Kelly J. Peyton, and Andrew I. Schafer, *Adenovirus-Mediated Heme Oxygenase-1 Gene Delivery Inhibits Injury-Induced Vascular Neointima Formation*. Circulation, 2001. **104**: p. 2710-2715.
124. Semenza, G.L., *Vasculogenesis, angiogenesis, and arteriogenesis: Mechanisms of blood vessel formation and remodeling*. 2007. **102**(4): p. 840-847.
125. Takerra Johnson, L.Z., Gygeria Manuel, Herman Taylor, and Dong Liu, *Approaches to therapeutic angiogenesis for ischemic heart disease*. Journal of Molecular Medicine, 2019. **97**(2): p. 141–151.
126. Takayuki Asahara, T.M., Alison Sullivan, Marcy Silver, Rien van der Zee, Tong Li, Bernhard Witzenbichler, Gina Schatteman and Jeffrey M. Isner, *Isolation of Putative Progenitor Endothelial Cells for Angiogenesis*. Science, 1997. **275**(5302): p. 964-966.
127. Reinhold J. Medina, C.L.B., Florence Sabatier, Françoise Dignat-George, Juan M. Melero-Martin, Kiarash Khosrotehrani, Osamu Ohneda, Anna M. Randi, Jerry K.Y. Chan, Teruhide Yamaguchi, Victor W.M. Van Hinsbergh, Mervin C. Yoder and Alan W. Stitt, *Endothelial Progenitors: A Consensus Statement on Nomenclature*. Stem Cells Translational Medicine, 2017. **6**(5): p. 1316-1320.
128. D N Prater, J.C., D A Ingram and M C Yoder, *Working hypothesis to redefine endothelial progenitor cells*. Leukemia, 2007. **21**: p. 1141–1149.
129. Jun Hon Pang, Y.F., Fatemeh Godarzi, Aaron Tan, Jayakumar Rajadas, Brian G. Cousins and Alexander M. Seifalian *In situ Endothelialization: Bioengineering Considerations to Translation* Small 2015. **11**(47): p. 6248–6264.
130. Guido Krenning, M.J.A.v.L.a.M.C.H., *Endothelial progenitor cell-based neovascularization: implications for therapy* Trends Mol Med, 2009. **4**: p. 180-189.
131. Yoder, D.P.B.a.M.C., *Circulating and Tissue Resident Endothelial Progenitor Cells*. Journal of Cellular Physiology, 2014. **229**: p. 10-16.
132. Francesca Felice, A.M.P., Silvia Rocchiccioli, Maria Chiara Barsotti, Tatiana Santoni, Angela Pucci, Silvia Burchielli, Federica Chiellini, Nadia Ucciferri, Roberto Solaro, Angelina Altomare, Antonella Cecchetti and Rossella Di Stefano, *Endothelial progenitor cell secretome delivered by novel polymeric nanoparticles in ischemic hindlimb*. International Journal of Pharmaceutics. **542**(1-2): p. 82-89.
133. Carol W Chen, L.L.W., Samir Zaman, Jon Gordon, Maria F Arisi, Chantel M Venkataraman, Jennifer J Chung, George Hung, Ann C Gaffey, Lynn A Spruce, Hossein Fazelinia, Robert C Gorman, Steven H Seeholzer, Jason A Burdick and Pavan Atluri, *Sustained release of endothelial progenitor cell-derived extracellular vesicles from shear-thinning hydrogels improves angiogenesis and promotes function after myocardial infarction*. Cardiovascular Research, 2018. **114**(7): p. 1029–1040.
134. Francisco M Vega , V.G., Cecilia M Fernandez-Ponce , M J Extremera , A F M Altelaar , Jaime Millan , Juan C Tellez , Jose A Hernandez-Campos , Rosario Conejero , Jorge Bolivar , Ricardo Pardal , Francisco J Garcia-Cózar , Enrique Aguado , Albert J R Heck , M^a Carmen Duran-Ruiz,

- The atheroma plaque secretome stimulates the mobilization of endothelial progenitor cells ex vivo.* J Mol Cell Cardiol. **105**:: p. 12-23.
135. Lucia Beltran-Camacho, M.J.-P., Marta Rojas-Torres, Ismael Sanchez-Gomar, Antonio Rosal-Vela, Sara Eslava-Alcon, M^a Carmen Perez-Segura, Ana Serrano, Borja Antequera-González, Jose Angel Alonso-Piñero, Almudena González-Rovira, M^a Jesús Extremera-García, Manuel Rodriguez-Piñero, Rafael Moreno-Luna, Martin Røssel Larsen, M^a Carmen Durán-Ruiz, *Identification of the initial molecular changes in response to circulating angiogenic cells-mediated therapy in critical limb ischemia.* Stem Cell Research & Therapy, 2020. **2020**(11): p. 106.
136. Chomczynski P, S.N., *The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on.* Nat Protoc, 2006. **1**(2): p. 581-585.
137. Wilfinger W. W., M.K.a.C.P., *Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity.* Biotechniques, 1997. **22**(3): p. 474-479.
138. Salamanca, B.N.d.A.C.I.U.d., *PROGRAMA DE CONTROL DE CALIDAD DE MUESTRAS DE ADN Y ARN.*
139. Goven D, B.A., Leçon-Malas V, Marchal-Sommé J, Soler P, Boczkowski J, Bonay M., *Induction of heme oxygenase-1, biliverdin reductase and H-ferritin in lung macrophage in smokers with primary spontaneous pneumothorax: role of HIF-1alpha.* PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10886.
140. Fabiana Zolea, A.M.B., Emanuela Chiarella, Donatella Malanga, Carmela De Marco, Heather Mandy Bond, Giovanni Morrone, Francesco Costanzo, and Flavia Biamonte, *Ferritin Heavy Subunit Silencing Blocks the Erythroid Commitment of K562 Cells via miR-150 up-Regulation and GATA-1 Repression.* Int J Mol Sci., 2017. **18**(10): p. 2167.
141. Kuniaki Nakanishi, M.F.K., MD; Sadayuki Hiroi, MT; Makio Mukai, MD; Eiji Ikeda, MD; Toshiaki Kawai, MD, *Mre11 Expression in Atypical Adenomatous Hyperplasia and Adenocarcinoma of the Lung.* Arch Pathol Lab Med., 2006. **130**(9): p. 1330-1334.
142. Kim S, L.H., Park SA, Kundu JK, Keum YS, Cha YN, Na HK, Surh YJ, *Keap1 cysteine 288 as a potential target for diallyl trisulfide-induced Nrf2 activation.* PLoS One., 2014. **9**(1): p. e85984.
143. Li-Yeh Chuang, Y.-H.C., Cheng-Hong Yang, *Specific primer design for the polymerase chain reaction.* Biotechnology Letters, 2013. **35**: p. pages 1541–1549.
144. K J Breslauer, R.F., H Blöcker, L A Marky, *Predicting DNA duplex stability from the base sequence.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(11): p. 3746–3750.
145. Pfaff, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.* Nucleic Acids Research, 2001. **29**(9): p. e45.
146. Ivan Dimauro, T.P., Daniela Caporossi & Malcolm J Jackson, *A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue.* BMC Research Notes, 2012. **5**: p. Article number: 513.
147. CANVAX, *ROS Detection Assay kit (DCFDA / H2DCFDA).*
148. Bartomiej Kozera, M.R., *Reference genes in real-time PCR.* Journal of Applied Genetics, 2013. **54**(4): p. 391–406.
149. Kenneth J. Livak, T.D.S., *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method.* Methods, 2001. **25**(4): p. 402-408.
150. Tiantian Sang, Q.C., Yuqiang Wang, Fang Liu and Shuyan Chen, *Overexpression or Silencing of FOXO3a Affects Proliferation of Endothelial Progenitor Cells and Expression of Cell Cycle Regulatory Proteins.* PLoS One, 2014. **9**(8): p. e101703.
151. H. C. Huang, T.N.a.C.B.P., *Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by Protein Kinase C Regulates Antioxidant Response Element-mediated Transcription.* J. Biol. Chem., 2002. **277**(November 8): p. 42769–42774.
152. Boo, Y.C., *Natural Nrf2 Modulators for Skin Protection.* Antioxidants, 2020. **9**: p. 812.
153. M. S. Joo, W.D.K., K. Y. Lee, J. H. Kim, J. H. Koo and S. Geon, *AMPK Facilitates Nuclear Accumulation of Nrf2 by Phosphorylating at Serine 550.* Mol. Cell. Biol., 2016. **36**(14).

154. Y. Kawai, L.G., M. Theodore, J. Yang and I. J. Arinze, *Acetylation-Deacetylation of the Transcription Factor Nrf2 (Nuclear Factor Erythroid 2-related Factor 2) Regulates Its Transcriptional Activity and Nucleocytoplasmic Localization*. J. Biol. Chem., 2011. **286**(9): p. 7629-7640.
155. W. Li, S.Y., T. Liu, J. H. Kim, V. Blank, H. Li and A. N. Kong, *Heterodimerization with small Maf proteins enhances nuclear retention of Nrf2 via masking the NESzip motif*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1783**(10): p. 1847-1856.
156. Simon Kraler, P.L., Paul C. Evans, Alexander Akhmedov, Martin O. Schmiady, Michael Reinehr, Giovanni G. Camici, and Thomas F. Lüscher, *Resilience of the Internal Mammary Artery to Atherogenesis: Shifting From Risk to Resistance to Address Unmet Needs*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 2021. **41**: p. 2237–2251.
157. Vaikom S. Mahadevan, M.C., Pascal P. McKeown and Ulvi Bayraktutan, *Internal mammary artery smooth muscle cells resist migration and possess high antioxidant capacity*. Cardiovascular Research, 2006. **72**(1): p. 60–68.
158. S. R. Archacki, G.A., C. S. Moravec, H. Liu, E. J. Topol, Q. K. Wang, *Comparative gene expression analysis between coronary arteries and internal mammary arteries identifies a role for the TES gene in endothelial cell functions relevant to coronary artery disease*. Hum Mol Genet., 2012. **21**(6): p. 1364-1373.
159. M. S. Nazarenko, A.V.M., I. N. Lebedev, M. B. Freidin, A. A. Sleptcov, I. A. Koroleva, A. V. Frolov, V. A. Popov, O. L. Barbarash, V. P. Puzyrev, *A Comparison of Genome-Wide DNA Methylation Patterns between Different Vascular Tissues from Patients with Coronary Heart Disease*. Plos One, 2015.
160. Teresa Auguet, G.A., Esther Guiu-Jurado, Alba Berlanga, Marta Curriu, Salomé Martínez, Ajla Alibalic, Carmen Aguilar, María-Luisa Camara, Esteban Hernández, Xavier Ruyra, Vicente Martín-Paredero, and Cristóbal Richart, *Adipo/cytokines in atherosclerotic secretomes: increased visfatin levels in unstable carotid plaque*. BMC Cardiovasc Disord, 2016. **19**(149).
161. F. M. Vega, V.G., C. M. Fernandez-Ponce, M. J. Extremera, A. F. M. Altelaar, J. Millan, J. C. Tellez, J. A. Hernandez-Campos, R. Conejero, J. Bolivar, R. Pardal, F. J. Garcia-Cózar, E. Aguado, A. J. R. Heck and M^a C. Duran-Ruiz, *The atheroma plaque secretome stimulates the mobilization of endothelial progenitor cells ex vivo*. J. Mol. Cell. Cardiol., 2017. **105**: p. 12-23.
162. F. Vivanco, J.L.M.-V., M^a C. Duran, M^a G. Barderas, L. Blanco-Colio, V. M. Dardé, S. Mas, O. Meilhac, J. B. Michel, J. Tuñón, and J. Egido, *Quest for Novel Cardiovascular Biomarkers by Proteomic Analysis*. J. Proteome Res., 2005. **4**(4): p. 1181–1191.
163. W. Martinet, D.M.S., G. R.Y De Meyer, A. G. Herman, M. M. Kockx *Western array analysis of human atherosclerotic plaques: downregulation of apoptosis-linked gene 2*. Cardiovasc. Res., 2003. **60**(2): p. 259–267.
164. B. Markus, K.G., M. Worsch, B. Parviz, A. Boening, B. Schieffer, M. S. Parahuleva, *Differential Expression of MicroRNAs in Endarterectomy Specimens Taken from Patients with Asymptomatic and Symptomatic Carotid Plaques*. Plos One, 2016.
165. J. Li, L.D.A., X. Wang, L. Pabon, S. M. Schwartz, D. C. Sane, R. L. Geary., *Regulator of G protein signaling 5 marks peripheral arterial smooth muscle cells and is downregulated in atherosclerotic plaque*. J Vasc Surg., 2004. **40**(3): p. 519-528.
166. J. L. Martín-Ventura, M.C.D., L. M. Blanco-Colio, O. Meilhac, A. Leclercq, J.-B. Michel, O. N. Jensen, S. Hernandez-Merida, J. Tuñón, F. Vivanco and J. Egido *Identification by a Differential Proteomic Approach of Heat Shock Protein 27 as a Potential Marker of Atherosclerosis*. Circulation, 2004. **110**(15): p. 2216–2219.
167. M. C. Durán, J.L.M.-V., S. Mas, M. G. Barderas, V. M. Dardé, O. N. Jensen, J. Egido and F. Vivanco, *Characterization of the human atheroma plaque secretome by proteomic analysis*. Methods Mol Biol. , 2007. **357**: p. 141-150.
168. F. de la Cuesta, M.G.B., E. Calvo, I. Zubiri, A. S. Maroto, V. M. Darde, T. Martín-Rojas, F. Gil-Dones, M^a Posada-Ayala, T. Tejerina, J. A. Lopez, F. Vivanco and G. Alvarez-Llamas, *Secretome*

- analysis of atherosclerotic and non-atherosclerotic arteries reveals dynamic extracellular remodeling during pathogenesis.* J Proteomics., 2012. **75**(10): p. 2960-2971.
169. G. Aragonès, T.A., E. Guiu-Jurado, A. Berlanga, M. Curriu, S. Martínez, A. Alibalic, C. Aguilar, E. Hernández, M^a-L. Camara, N. Canela, P. Herrero, X. Ruyra, V. Martín-Paredero and C. Richart, *Proteomic Profile of Unstable Atheroma Plaque: Increased Neutrophil Defensin 1, Clusterin, and Apolipoprotein E Levels in Carotid Secretome.* J. Proteome Res., 2016. **15**(3): p. 933–944.
170. S. Eslava-Alcon, M.J.E.-G., A. González-Rovira, A. Rosal-Vela, M. Rojas-Torres, L. Beltran-Camacho, I. Sanchez-Gomar, M. Jiménez-Palomares, J. A. Alonso-Piñero, R. Conejero, E. Doiz, J. Olarte, A. Foncubierta-Fernández, E. Lozano, F. J. García-Cozar, M. Rodríguez-Piñero, G. Alvarez-Llamas and M. C. Duran-Ruiz, *Molecular signatures of atherosclerotic plaques: An updated panel of protein related markers.* J Proteomics., 2020. **221**: p. 103757.
171. S. Okinaga, K.T., K. Takeda, M. Yoshizawa, H. Fujita, H. Sasaki and S. Shibahara, *Regulation of human heme oxygenase-1 gene expression under thermal stress.* Blood 1996. **87**(12): p. 5074–5084.
172. Y.-H. Chou, F.-M.H., D.-Z. Liu, S.-Y. Lin, L.-H. Tsai, C.-H. Chen, Y.-S. Ho, L.-F. Hung and Y.-C. Liang, *The possible role of heat shock factor-1 in the negative regulation of heme oxygenase-1.* Int. J. Biochem. Cell Biol., 2005. **37**(3): p. 604-615.
173. T. Kitamuro, K.T., K. Ogawa, R. Udono-Fujimori, K. Takeda, K. Furuyama, M. Nakayama, J. Sun, H. Fujita, W. Hida, T. Hattori, K. Shirato, K. Igarashi and S. Shibahara, *Bach1 functions as a hypoxia-inducible repressor for the heme oxygenase-1 gene in human cells.* J Biol Chem., 2003. **278**(11): p. 9125-9133.
174. Jiajia Wu, S.L., Cheng Li, Liying Cui, Jiajia Ma and Yang Hui, *The non-canonical effects of heme oxygenase-1, a classical fighter against oxidative stress.* Redox Biology, 2021. **47**: p. 102170.
175. Marilina Mascaró, E.N.A., Exequiel G. Alonso, Ezequiel Lacunza, Alejandro C. Curino and María Marta Facchinetti, *Nuclear Localization of Heme Oxygenase-1 in Pathophysiological Conditions: Does It Explain the Dual Role in Cancer?.* Antioxidants, 2021. **10**(1): p. 87.
176. Chhanda Biswas, N.S., Manasa Muthu, Ping La, Amal P. Fernando, Shaon Sengupta, Guang Yang and Phyllis A. Dennery, *Nuclear Heme Oxygenase-1 (HO-1) Modulates Subcellular Distribution and Activation of Nrf2, Impacting Metabolic and Anti-oxidant Defenses.* Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(39): p. P26882-26894.
177. Louise L. Dunn, R.G.M., Jun Ni, Hafizah A. Hamid, Christopher R. Parish, Roland Stocker, *New Insights into Intracellular Locations and Functions of Heme Oxygenase-1.* Antioxid Redox Signal, 2014 **20**(11): p. 1723–1742.
178. Software, G. *Analysis checklist: Kruskal-Wallis test.* Available from: https://www.graphpad.com/guides/prism/latest/statistics/stat_checklist_kw.htm.