





**DOCTORANDO:**

CARLOS SILVESTRE ROIG

**DIRECTOR DE TESIS:**

VICENTE ANDRÉS GARCÍA

**TÍTULO DE LA TESIS:**

Identificación de nuevos biomarcadores genéticos y mecanismos moleculares de la reestenosis tras revascularización vía angioplastia:  
Papel del factor de transcripción NF- $\kappa$ B.

**CURSOS DE DOCTORADO:**

BIOQUÍMICA CLINICO-MÉDICA E INMUNOLOGÍA.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Universidad de Valencia



Departament  
de Bioquímica i  
Biologia Molecular



Instituto de  
Biomedicina  
de Valencia



Centro Nacional  
de Investigaciones  
Cardiovasculares



***A todos los que habéis estado a mi lado***



## **AGRADECIMIENTOS**



Quiero agradecer a todos los que habéis contribuido a la realización de esta tesis, por todo lo que he aprendido y madurado gracias a vuestras enseñanzas y aportaciones científicas, por todo vuestro apoyo durante los momentos difíciles, pero sobre todo por vuestra amistad, que ha permitido que estos años hayan sido una de las experiencias más importantes de mi vida.

En primer lugar quiero agradecer a mi director Vicente Andrés la oportunidad que me ha concedido al permitirme realizar la presente Tesis Doctoral e introducirme y enseñarme el mundo de la investigación científica.

Esta tesis no habría sido posible sin aquellas personas que me han acompañado durante estos años tanto en Valencia como en Madrid.

Aunque llevamos tiempo separados no me olvido de mis compañeros del Instituto de Biomedicina de Valencia con los que he compartido muy buenos momentos. Primero dar las gracias a Patricia, que no solo ha sido una compañera de proyecto excelente en el ámbito científico sino sobre todo personal. Me has enseñado mucho sobre este trabajo, cómo ser crítico y exigente con uno mismo pero también como disfrutarlo y madurar con él. Espero que aunque nos encontremos separados sigamos siendo buenos amigos.

Qué decir de Ana y Rosa, con las que he pasado momentos geniales y me habéis enseñado mucho...sobre todo a ser más ordenado en el trabajo... También dar las gracias a Ángela, Herminia y José Javier por sus consejos y ayuda durante estos años.

No penséis que me he olvidado...A Davinia y Marian que han sido más que mis compañeras, mis amigas, y con las que he vivido experiencias que nunca hubiera pensado como subir a un monte perdido en Asia, perderlas bajo el mar o sobrevivir a las "leeches" en la selva. Muchas gracias y espero que aunque ya sabéis como soy...no dejemos de ser amigos.

Mención especial a "Chemari", que ha estado conmigo todos estos años, tanto en Valencia como Madrid, ayudándome siempre en todo lo que he necesitado. He tenido el placer de trabajar a su lado y conocer no sólo que es un tío genial sino también brillante en el ámbito científico (aunque cuesta llegar a pensar tan rápido como él para poder entenderle). Supongo que aunque no sigamos trabajando juntos, cuando volvamos a vernos volverás a recordarme esas bromas tan malas que haces.

Y llegamos a Madrid. Por suerte, he seguido haciendo amigos aunque haya cambiado de ciudad y he conocido a personas geniales aquí en la “capi”. Por donde empiezo... el “núcleo”, 4 personas con las que he compartido muchos y grandes momentos. Pedrín, tu siempre has estado ahí, eres un amigo con el que me he sentido identificado, me he reído mucho y nunca me has fallado cuando te he pedido ayuda. ¡Mary! Que decir...la rubia es la persona más feliz que he conocido, una amiga genial (aunque nunca me esperaras para comer...) y con la que he aprendido mucho. ¡No cambies! Laia, la “abuela”, uno de los pilares de este laboratorio, la mejor compañera de poyata y una amiga que me ha apoyado siempre, tanto laboral como personalmente. Rapha, ¡el francés que ha sacado el valenciano que llevo dentro! Un amigo genial, una de las personas más inteligentes que he conocido y con el que he disfrutado “discutir” de ciencia.

A María Jesús, que me ha acompañado estos años y siempre me ha ayudado en todo aquello que le he pedido. Y por supuesto, a todo el departamento, Alba, Anabel, Ana Vanesa, Andrés, Bego, Borja, Chris, Cristina, David, Eeva, Inés, Jaime, Javi (el paellero!), José Rivera, Linnea, Marta, Mónica, Oliver, Óscar, Ricardo, Rupa, Vane, Vinatha, Virginia y aquellos que habéis estado de paso (todos los napolitanos).

A mis padres, que sino fuera por ellos todo esto no hubiera sido posible. Apoyándome, ayudándome y soportándome siempre. A mi hermanita, Eva, que siempre ha estado ahí...y que espero no siga mis pasos y ¡se haga médico! ¡Que necesitamos continuar la tradición familiar!

A Cristina, mi gran apoyo, la que siempre ha estado ahí, ayudándome y soportándome (que no es fácil). Espero que me sigas aguantando siempre.

Gracias a todos

Carlos

El autor ha disfrutado de una beca predoctoral Mario Losantos del Campo (convocatoria de 2007) y una beca de investigación Severo Ochoa concedida por la Fundación Ferrer (convocatoria 2011).

Este trabajo de Tesis Doctoral ha sido realizado gracias a las ayudas otorgadas por los siguientes organismos: Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF2007-62110; SAF2010-16044), RECAVA (RD06/0014/0021), Fina Biotech, S.L.U. (Ref. CSIC: 20060238).



## ÍNDICE



<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>1. Reestenosis</b> .....	3
<b>1.1. Impacto sanitario y socio-económico de las enfermedades cardiovasculares</b> .....	3
<b>1.2. Definición</b> .....	3
<b>1.3. Historia, incidencia y prevalencia de la reestenosis</b> .....	5
<b>1.4. Bases moleculares de la reestenosis</b> .....	9
<b>1.5. Factores de riesgo de reestenosis</b> .....	11
<b>1.5.1 Factores clínicos</b> .....	12
1.5.1.1 <i>Diabetes</i> .....	12
1.5.1.2 <i>Sexo</i> .....	13
1.5.1.3 <i>Edad</i> .....	13
1.5.1.4 <i>Hipertensión</i> .....	13
1.5.1.5 <i>Historial familiar</i> .....	13
<b>1.5.2 Factores Biológicos</b> .....	14
1.5.2.1 <i>Inflamación</i> .....	14
1.5.2.2 <i>Función y remodelado vascular</i> .....	15
<b>1.5.3 Factores genéticos</b> .....	16
1.5.3.1 <i>Generalidades</i> .....	16
1.5.3.2 <i>Polimorfismos de base única</i> .....	17
<b>2. Ciclo celular</b> .....	22
<b>2.1. Conceptos generales</b> .....	22
<b>2.2. Fase G2/M y mitosis</b> .....	25
<b>3. Ciclina B1</b> .....	28
<b>3.1. Regulación de la ciclina B1</b> .....	29
<b>3.1.1 Regulación transcripcional</b> .....	30
3.1.1.1 <i>Nuclear Factor-Y</i> .....	30

3.1.1.2	<i>E-Box</i> .....	31
3.1.1.3	<i>FoxM1</i> .....	31
3.1.1.4	<i>p53</i> .....	32
3.1.1.5	<i>CHR y CDE</i> .....	32
3.1.1.6	<i>Otros reguladores</i> .....	33
<b>3.1.2</b>	<b><i>Estabilidad del ARNm</i></b> .....	<b>33</b>
<b>3.1.3</b>	<b><i>Regulación traduccional</i></b> .....	<b>34</b>
<b>3.1.4</b>	<b><i>Regulación post-traduccional</i></b> .....	<b>34</b>
3.1.4.1	<i>Estabilidad proteica de la ciclina B1</i> .....	34
3.1.4.2	<i>Fosforilación de la ciclina B1</i> .....	34
<b>3.2.</b>	<b><i>Ciclina B1 en enfermedades hiper-proliferativas</i></b> .....	<b>35</b>
<b>3.2.1</b>	<b><i>Papel de la ciclina B1 en cáncer</i></b> .....	<b>35</b>
<b>3.2.2</b>	<b><i>Papel de la ciclina B1 en la enfermedad vasculo-proliferativa</i></b> .....	<b>36</b>
<b>4.</b>	<b><i>NF-Y</i></b> .....	<b>38</b>
<b>4.1.</b>	<b><i>Generalidades</i></b> .....	<b>38</b>
<b>4.2.</b>	<b><i>Dominio de unión a ADN: CCAAT</i></b> .....	<b>39</b>
<b>4.3.</b>	<b><i>Subunidades de NF-Y</i></b> .....	<b>39</b>
<b>4.3.1</b>	<b><i>NF-YA</i></b> .....	<b>39</b>
<b>4.3.2</b>	<b><i>NF-YB y NF-YC</i></b> .....	<b>41</b>
<b>4.4.</b>	<b><i>Papel de NF-Y en la proliferación celular</i></b> .....	<b>43</b>
<b>4.5.</b>	<b><i>Papel de NF-Y en la enfermedad hiper-proliferativa</i></b> .....	<b>47</b>
<b>5.</b>	<b><i>Ciclo celular y reestenosis</i></b> .....	<b>48</b>
<b>5.1.</b>	<b><i>Reguladores positivos de la proliferación celular</i></b> .....	<b>48</b>
<b>5.2.</b>	<b><i>Reguladores negativos de la proliferación celular</i></b> .....	<b>56</b>

<b>OBJETIVOS</b> .....	59
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	63
<b>1. Cohorte de pacientes y estudio genético</b> .....	65
<b>1.1. Cohorte de pacientes</b> .....	65
<b>1.1.1 Cohorte Mediterranea</b> .....	65
<b>1.1.2 Cohorte GEISHA</b> .....	67
<b>1.2. Estudio Genético</b> .....	69
<b>1.2.1 Cohorte Mediterranea</b> .....	69
<b>1.2.1 Cohorte GEISHA</b> .....	71
<b>2. Modelos animales</b> .....	71
<b>2.1. Ratón deficiente en apoE</b> .....	71
<b>2.2. Modelo de angioplastia con balón en arteria carótida de rata</b> .....	72
<b>2.3. Modelo de daño endoluminal de la arteria femoral común de ratón</b> .....	72
<b>3. Muestras de tejido humano</b> .....	74
<b>3.1. Muestras de tejido reestenótico</b> .....	74
<b>3.2. Muestras de arteria coronaria y mamaria interna</b> .....	74
<b>4. Obtención y conservación de órganos</b> .....	75
<b>5. Cultivo y mantenimiento de células eucariotas</b> .....	76
<b>5.1. Cultivos de líneas celulares</b> .....	76
<b>5.1.1 Tripsinización y replaqueo</b> .....	77
<b>5.1.2 Congelación y descongelación de células</b> .....	78
<b>5.2. Líneas celulares utilizadas</b> .....	80
<b>5.2.1 Línea celular HeLa</b> .....	80
<b>5.2.2 Línea celular U2OS</b> .....	80

5.2.3	<i>Línea celular E19P</i> .....	81
5.3.	<b>Cultivos primarios utilizados</b> .....	81
5.3.1	<i>CMLV de aorta de rata</i> .....	81
5.3.2	<i>CMLV de arteria coronaria humana</i> .....	84
5.3.3	<i>Linfocitos humanos de sangre periférica</i> .....	84
5.4.	<b>Tratamiento de cultivos celulares</b> .....	86
5.4.1	<i>Tratamiento con citoquinas/quimioquinas</i> .....	86
5.4.2	<i>Tratamiento con Inhibidores específicos de rutas de transducción de señal</i> .....	86
5.5.	<b>Transfección transitoria con vectores plasmídicos</b> .....	87
5.6.	<b>Transducción genética mediante el uso de vectores virales</b> .....	88
5.6.1	<i>Producción y titulación de adenovirus</i> .....	90
5.6.2	<i>Infección de los cultivos primarios</i> .....	90
6.	<b>Técnicas de análisis de la expresión de proteína</b> .....	90
6.1.	<b>Obtención de extractos proteicos</b> .....	90
6.1.1.	<i>Obtención de lisados celulares</i> .....	90
6.1.2	<i>Obtención de lisados de tejido</i> .....	92
6.1.3	<i>Obtención de extractos proteicos de la fracción nuclear soluble y fracción citoplasmática</i> .....	92
6.2.	<b>Valoración de la concentración de proteínas</b> .....	94
6.3.	<b>Electroforesis en SDS-PAGE</b> .....	94
6.3.1	<i>Preparación de las muestras</i> .....	96
6.3.2	<i>Preparación de los geles y electroforesis</i> .....	96
6.3.3	<i>Western Blot</i> .....	97
7.	<b>Técnicas de manipulación y análisis de ácidos nucleicos</b> .....	100
7.1.	<b>Aislamiento de ADN</b> .....	100
7.2.	<b>Tratamiento enzimático del ADN</b> .....	100

7.3. Técnicas de subclonaje en vectores plasmídicos .....	101
7.4. Transformación de bacterias competentes.....	102
7.5. PCR de colonias .....	103
7.6. Análisis de los niveles de ARNm .....	104
7.6.1 <i>Obtención, cuantificación y análisis de calidad del ARN total</i> .....	104
7.6.2 Cuantificación de ARN total.....	106
7.6.3 <i>Retrotranscripción o síntesis de ADNc</i> .....	106
7.6.4 <i>PCR a tiempo real (qPCR)</i> .....	107
<b>8. Técnicas de análisis de interacciones ácido nucleico-proteína.....</b>	<b>110</b>
8.1. EMSA .....	110
8.1.1 <i>Anillamiento de las cadenas de ADN</i> .....	110
8.1.2 <i>Generación de sondas mediante marcaje radiactivo del oligonucleótido</i> .....	111
8.1.3 <i>Reacción de unión, electroforesis, secado y revelado</i> .....	113
8.1.4 <i>Experimentos de competición y supershift</i> .....	115
8.2. Ensayo de CHIP.....	116
8.2.1 <i>Fijación de las células</i> .....	117
8.2.2 Lisis celular y sonicación.....	118
8.2.3 <i>Bloqueo, unión del anticuerpo a las bolas magnéticas e inmunoprecipitación</i> .....	119
8.2.4 <i>Lavado, elución, separación de la unión proteína-ADN y purificación del ADN</i> .....	119
<b>9. Análisis de la actividad transcripcional mediante el gen reportero de la luciferasa .....</b>	<b>120</b>
<b>10. Estudios histológicos.....</b>	<b>122</b>
10.1. Fijación de los tejidos .....	123

10.2. Deshidratación de los tejidos .....	123
10.3. Inclusión en parafina y obtención de cortes .....	123
10.4. Preparación de los cortes histológicos .....	124
10.5. Tinción tricrómica de Masson .....	124
10.6. Inmunohistología.....	125
10.6.1 <i>Desenmascaramiento de antígeno</i> .....	125
10.6.2 <i>Bloqueo de la actividad peroxidasa endógena</i> .....	126
10.6.3 <i>Bloqueo de las uniones inespecíficas antígeno/anticuerpo</i> .....	126
10.6.4 <i>Incubación con anticuerpo primario</i> .....	126
10.6.5 <i>Incubación con anticuerpo secundario</i> .....	126
10.6.6 <i>Revelado de los complejos antígeno-anticuerpo y montaje para microscopía</i> .....	127
10.6.7 <i>Inmunohistoquímica de tejido humano</i> .....	128
10.6.8 <i>Inmunofluorescencias de tejido</i> .....	128
10.6.9 <i>Inmunofluorescencias de isolectina B4</i> .....	130
11. Ensayo de incorporación de 5'-Bromodeoxiuridina .....	130
12. Análisis <i>in silico</i> .....	132
13. Análisis estadístico .....	133
<b>RESULTADOS</b> .....	135
1. Identificación de polimorfismos de base única en genes reguladores del ciclo celular como biomarcadores del riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de <i>stent</i> coronario.....	137
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	139

RESULTADOS.....	141
Los polimorfismos de base única rs350099, rs164390, rs350104, rs875459, rs2282411 y rs733590 se asocian con el riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de <i>stent</i> coronario.....	141
El haplotipo portador de las variantes polimórficas de mayor riesgo (-957T/-475C/+102G) localizado en la región promotora del gen de la ciclina B1 se asocia a un mayor riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de <i>stent</i> coronario.....	152
DISCUSIÓN.....	156
<b>2. Estudio funcional de los polimorfismos de base única rs350099, rs350104 y rs164390 asociados con el riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de <i>stent</i> coronario.....</b>	<b>161</b>
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS.....	163
RESULTADOS.....	165
La variante de riesgo -957T del polimorfismo rs350099 genera un sitio funcional de unión a ADN para el factor de transcripción NF-Y .....	165
La variante de riesgo -475C del polimorfismo rs350104 genera un sitio de unión a ADN para el factor de transcripción AP-1 de mayor eficiencia que la variante -475T .....	169
La variante de riesgo +102G, pero no la variante +102T, del polimorfismo rs164390 genera un sitio de unión a ADN funcional para el factor de transcripción SP1.....	173
Individuos portadores del haplotipo formado por las 3 variantes polimórficas asociadas a un mayor riesgo de reestenosis presentan niveles aumentados de ARNm de ciclina B1 en linfocitos aislados de sangre periférica.....	175
DISCUSIÓN.....	179

<b>3. Papel del factor de transcripción NF-<math>\kappa</math>B en reestenosis y aterosclerosis</b> .....	185
<b>ANTECEDENTES Y OBJETIVOS</b> .....	187
<b>RESULTADOS</b> .....	189
La expresión y la actividad de unión a ADN del factor de transcripción NF- $\kappa$ B aumentan durante el desarrollo de la lesión neointima inducida por daño mecánico .....	189
La expresión y actividad de unión a ADN de NF- $\kappa$ B se inducen en la lesión aterosclerótica nativa .....	193
El factor de transcripción NF- $\kappa$ B induce la expresión de ciclina B1 y la proliferación celular en CMLVs como efector de la vía de señalización PDGF-BB-ERK1/2-Akt .....	199
La inhibición de la actividad de unión a ADN de NF- $\kappa$ B mediante la sobreexpresión del mutante dominante negativo de NF- $\kappa$ B1 reduce la expresión de la ciclina B1 y la proliferación de CMLVs .....	200
<b>DISCUSIÓN</b> .....	205
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	209
<b>CONCLUSIONES</b> .....	215
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	219

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribución de las principales causas de mortalidad en los países occidentales.....	4
<b>Figura 2.</b> Distribución de las principales causas de mortalidad debido a enfermedad cardiovascular en los países occidentales.....	4
<b>Figura 3.</b> Progresión de la lesión reestenótica.....	11
<b>Figura 4.</b> Esquema general del ciclo celular en mamíferos. ....	24
<b>Figura 5.</b> Esquema general de la mitosis en mamíferos.....	27
<b>Figura 6.</b> Esquema y estructura de la proteína NF- $\kappa$ B.....	44
<b>Figura 7.</b> Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de TLR en la cohorte GEISHA para los polimorfismos -957[T/C], -475[T/C] y +102[G/T].....	151
<b>Figura 8.</b> Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de TLR en la cohorte GEISHA para pacientes portadores de haplotipos formados por los polimorfismos -957[T/C], -475[T/C] y +102[G/T].....	155
<b>Figura 9.</b> SNPs localizados en el gen <i>CCNB1</i> validados mediante ensayos funcionales .....	166
<b>Figura 10.</b> La variante alélica -957T localizada en el gen <i>CCNB1</i> asociada a un riesgo aumentado de sufrir reestenosis tras implantación de <i>stent</i> coronario genera un sitio de unión a ADN para el factor de transcripción NF- $\kappa$ B.....	168

<b>Figura 11.</b> La variante alélica -957T asociada a un riesgo aumentado de sufrir reestenosis tras implantación de <i>stent</i> coronario induce la expresión de un gen reportero vía NF-Y .....	170
<b>Figura 12.</b> La variante alélica -475C localizada en el gen <i>CCNB1</i> asociada a un riesgo aumentado de sufrir reestenosis tras implantación de <i>stent</i> coronario genera un sitio de unión a ADN para el factor de transcripción AP-1 de mayor afinidad que la variante -475T .....	172
<b>Figura 13.</b> La variante alélica -475C asociada a un riesgo aumentado de sufrir reestenosis tras implantación de <i>stent</i> coronario induce la expresión de un gen reportero vía AP-1 .....	174
<b>Figura 14.</b> La variante alélica +102G localizada en el gen <i>CCNB1</i> asociada a un riesgo aumentado de sufrir reestenosis tras implantación de <i>stent</i> coronario genera un sitio de unión a ADN para el factor de transcripción SP1.....	176
<b>Figura 15.</b> La variante alélica +102G asociada a un riesgo aumentado de sufrir reestenosis tras implantación de <i>stent</i> coronario induce la expresión de un gen reportero vía SP1.....	177
<b>Figura 16.</b> Linfocitos aislados de sangre periférica de donantes homocigotos para el haplotipo H1 de la ciclina B1 asociado a un mayor riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de <i>stent</i> coronario expresan niveles aumentados de ARNm de ciclina B1. ....	178
<b>Figura 17.</b> Modelo del riesgo aumentado de ISR dependiente de la regulación transcripcional polimórfica del gen <i>CCNB1</i> . ....	183
<b>Figura 18.</b> Sobreexpresión de NF-YA y ciclina B1 e inducción de la actividad NF-Y de unión a ADN en la lesión neoíntima tras angioplastia con balón en la arteria carótida de rata .....	191

<b>Figura 19.</b> Expresión de NF- $\kappa$ B y ciclina B1 en tejido reestenótico coronario humano.....	192
<b>Figura 20.</b> La expresión de NF- $\kappa$ B y ciclina B1 se induce en aterosclerosis murina.....	194
<b>Figura 21.</b> La expresión de NF- $\kappa$ B y ciclina B1 se induce en la lesión aterosclerótica inducida espontáneamente en ratones apoE-KO alimentados con dieta control .....	195
<b>Figura 22.</b> NF- $\kappa$ B y ciclina B1 se expresan en ateroma coronario humano .....	196
<b>Figura 23.</b> La actividad de unión a ADN del factor de transcripción NF- $\kappa$ B se induce en aterosclerosis murina y humana .....	198
<b>Figura 24.</b> El mitógeno PDGF-BB induce la unión de NF- $\kappa$ B al promotor del gen <i>CCNB1</i> , la expresión de <i>CCNB1</i> y la proliferación de las CMLVs mediante un mecanismo dependiente de ERK1/2 y Akt.....	201
<b>Figura 25.</b> La inactivación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en CMLVs reduce la expresión de ARNm de <i>CCNB1</i> y la proliferación celular .....	202
<b>Figura 26.</b> La inhibición de la actividad NF- $\kappa$ B mediante transducción adenoviral de NF- $\kappa$ BAdn reduce la formación de lesión neointima en un modelo de daño endoluminal de la arteria femoral común en ratón.....	204
<b>Figura 27.</b> Papel propuesto de NF- $\kappa$ B en el desarrollo de la hiperplasia de la neointima .....	208

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Cebadores diseñados para el genotipado de los polimorfismos asociados con el riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de <i>stent</i> coronario .....	70
<b>Tabla 2.</b> Características clínicas de los individuos incluidos en el estudio de los niveles de ARNm de ciclina B1 en linfocitos aislados de sangre periférica .....	85
<b>Tabla 3.</b> Anticuerpos utilizados en los experimentos de Western Blot .....	99
<b>Tabla 4.</b> Cebadores utilizados en los experimentos de qPCR. ....	108
<b>Tabla 5.</b> Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en EMSA .....	113
<b>Tabla 6.</b> Cebadores utilizados en los experimentos de CHIP .....	120
<b>Tabla 7.</b> Secuencia del tándem de secuencias repetidas que controlan la expresión del gen reportero de la luciferasa .....	121
<b>Tabla 8.</b> Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de inmunohistología .....	127
<b>Tabla 9.</b> Anticuerpos secundarios utilizados en los experimentos de inmunohistoquímica .....	127
<b>Tabla 10.</b> Anticuerpos secundarios utilizados en los experimentos de inmunofluorescencia .....	129
<b>Tabla 11.</b> Características clínicas de los pacientes con o sin reestenosis angiográfica tras IPTC con implantación de <i>stent</i> coronario (cohorte Mediterránea) .....	142

<b>Tabla 12.</b> Características angiográficas de los pacientes reestenóticos y no reestenóticos tras IPTC con implantación de <i>stent</i> coronario (cohorte Mediterranea) .....	143
<b>Tabla 13.</b> Eventos coronarios adversos tras 12 meses en pacientes con o sin reestenosis angiográfica tras IPTC con implantación de <i>stent</i> coronario (cohorte Mediterranea) .....	144
<b>Tabla 14.</b> Polimorfismos de base única en reguladores positivos del ciclo celular genotipados en pacientes tratados con IPTC y <i>stent</i> coronario (cohorte Mediterranea) .....	145
<b>Tabla 15.</b> Polimorfismos de base única en reguladores negativos del ciclo celular genotipados en pacientes tratados con IPTC y <i>stent</i> coronario (cohorte Mediterranea) .....	146
<b>Tabla 16.</b> Polimorfismos de base única que muestran una asociación estadísticamente significativa con el riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de <i>stent</i> coronario (cohorte Mediterranea).....	149
<b>Tabla 17.</b> Análisis estadístico de la asociación de los polimorfismos rs350099, rs350104, rs164390 y riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de <i>stent</i> coronario en la cohorte GEISHA.....	150
<b>Tabla 18.</b> Análisis de la regresión proporcional Cox y los eventos de supervivencia Kaplan-Meier en la cohorte GEISHA .....	150
<b>Tabla 19.</b> Estimación de la frecuencia de los haplotipos (cohorte Mediterranea) ...	153
<b>Tabla 20.</b> Análisis del desequilibrio de ligamiento (cohorte Mediterranea) .....	154
<b>Tabla 21.</b> Análisis estadístico de la asociación de los haplotipos formados por los polimorfismos rs350099, rs350104, rs164390 y el riesgo de sufrir	

reestenosis tras implantación de <i>stent</i> coronario (cohorte Mediterranea) .....	155
--------------------------------------------------------------------------------------	-----

**ABREVIATURAS**



<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>AP-1</b>	“Activator Protein-1”
<b>APC/C</b>	“Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome”
<b>apoE</b>	apolipoproteína E
<b>apoE-KO</b>	ratón deficiente en apolipoproteína E
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ARNm</b>	Ácido Ribonucleico mensajero
<b>BrdU</b>	5'-Bromo-deoxi-Uridina
<b>CDK</b>	“Cyclin-Dependent Kinase”
<b>ChIP</b>	Inmunoprecipitación de cromatina; “Chromatine Immunoprecipitation”
<b>CKI</b>	“CDK Inhibitor”
<b>CMLV</b>	Célula de Músculo Liso Vascular
<b>DAB</b>	3,3-Diaminobencidina
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EDTA</b>	ácido Etilendiaminotetraacético
<b>EGTA</b>	ácido Etilenglicoltetraacético
<b>EMSA</b>	Ensayo de movilidad electroforética retardada; “Electrophoretic Mobility-Shift Assay”
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente; “Green Fluorescent Protein”
<b>GWAS</b>	“Genome Wide Association Studies”
<b>FBS</b>	Suero fetal bovino; “Fetal Bovine Serum”
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad, “High Density Lipoprotein”
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano; “Horseradish Peroxidase”
<b>ICPT</b>	Intervención Coronaria Percutánea Transluminal
<b>IPT</b>	Intervención Percutánea Transluminal
<b>ISR</b>	Reestenosis en stent; “In-Stent Restenosis”
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad, “Low Density Lipoprotein”
<b>MAF</b>	Alelo de menor frecuencia; “Minor Allele Frequency”
<b>MACE</b>	Eventos coronarios adversos; “Major Adverse Coronary Events”
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MLD</b>	Diámetro luminal mínimo, “Minimum Luminal Diameter”

---

<b>NF-Y</b>	“ <u>N</u> uclear <u>F</u> actor- <u>Y</u> ”
<b>PAGE</b>	Electroforesis en geles de poliacrilamida; “ <u>P</u> oly <u>a</u> crylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis”
<b>PB</b>	<u>P</u> ar de <u>b</u> ases.
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino; “ <u>P</u> hosphate <u>B</u> uffer <u>S</u> aline”
<b>PCNA</b>	“ <u>P</u> roliferating <u>C</u> ell <u>N</u> uclear <u>A</u> ntigen”
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa, “ <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction”
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas, “ <u>P</u> latelet- <u>D</u> erived <u>G</u> rowth <u>F</u> actor”
<b>PFA</b>	<u>P</u> ara <u>f</u> orma <u>l</u> dehido
<b>PFU</b>	Partículas formadoras de calvas, “ <u>P</u> laque <u>F</u> orming <u>U</u> nits”
<b>PNK</b>	Polinucleótido quinasa, “ <u>P</u> olynucleotide <u>K</u> inase”
<b>qPCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, “ <u>Q</u> uantitative <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction”
<b>MOI</b>	“ <u>M</u> ultiplicity <u>O</u> f <u>I</u> nfection”
<b>RPM</b>	<u>R</u> evoluciones <u>P</u> or <u>M</u> inuto
<b>RT</b>	<u>R</u> etro <u>t</u> rascricción o transcripción inversa
<b>SD</b>	Desviación estándar, “ <u>S</u> tándar <u>D</u> eviation”
<b>seg</b>	<u>S</u> egundos
<b>SEM</b>	Error estándar de la media, “ <u>S</u> tándar <u>E</u> rror of the <u>M</u> ean”
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico, “ <u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate”
<b>SL-FA</b>	<u>S</u> tent <u>L</u> iberador de <u>F</u> ármacos <u>A</u> nti- <u>P</u> roliferativos
<b>SNP</b>	Polimorfismo de base única, “ <u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism”
<b>TGF</b>	Factor de crecimiento tumoral, “ <u>T</u> umor <u>G</u> rowth <u>F</u> actor”
<b>TLR</b>	Revascularización de la lesión diana, “ <u>T</u> arget <u>L</u> esión <u>R</u> evascularization”
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral, “ <u>T</u> umor <u>N</u> ecrosis <u>F</u> actor”
<b>UTR</b>	Región no traducible, “ <u>U</u> n <u>t</u> ranslated <u>R</u> egion”
<b>WCE</b>	Extracto total de la célula, “ <u>W</u> hole- <u>C</u> ell <u>E</u> xtract”

# **INTRODUCCIÓN**



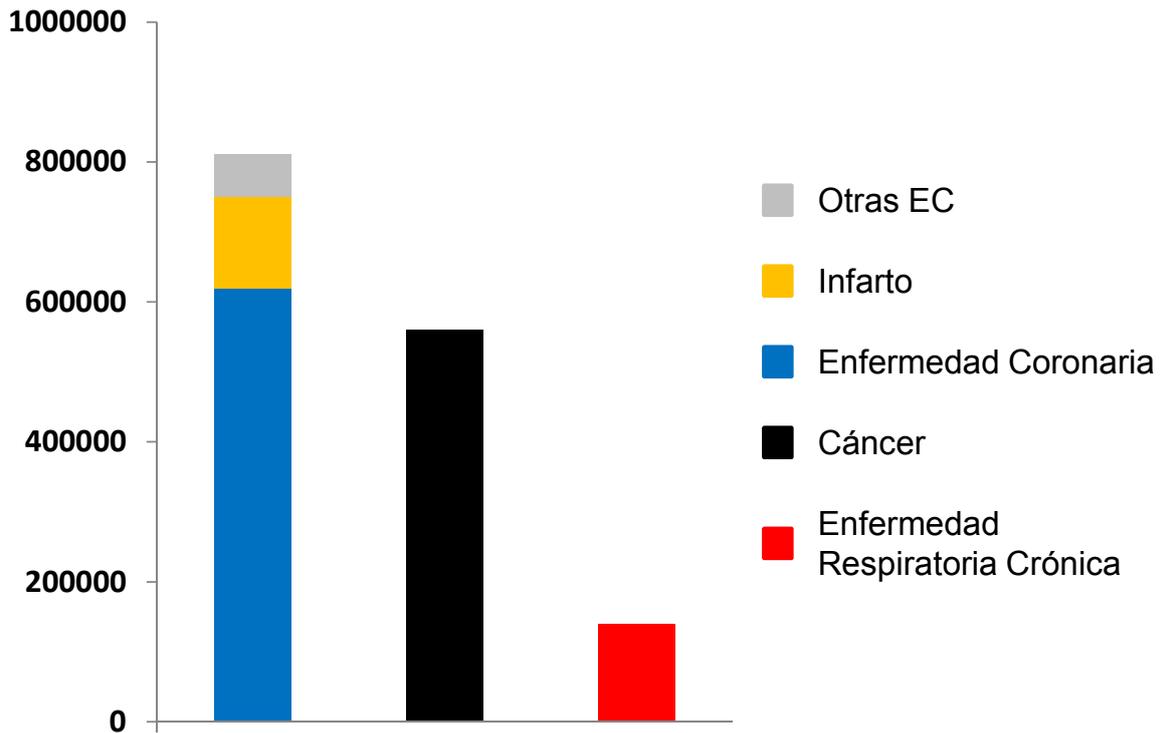
## 1. Reestenosis

### 1.1. Impacto sanitario y socio-económico de las enfermedades cardiovasculares

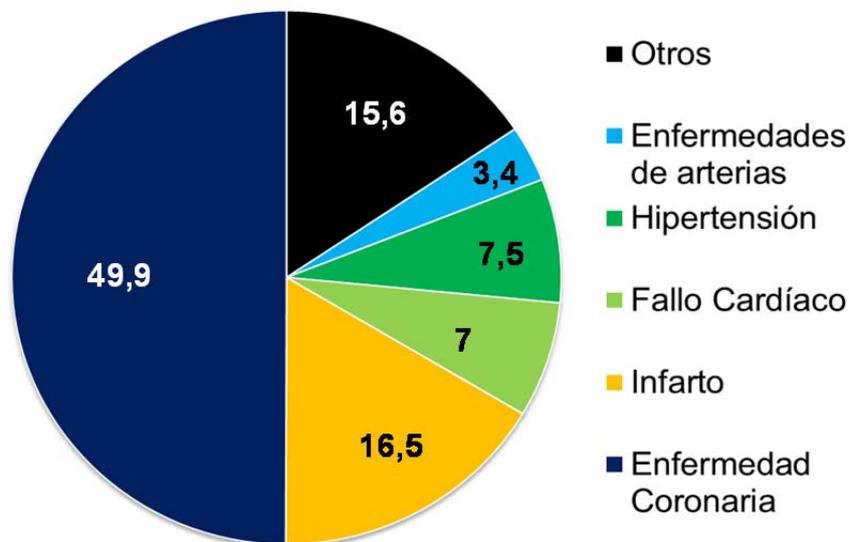
Las enfermedades cardiovasculares representan actualmente la principal causa de mortalidad en los países industrializados, considerándose uno de los mayores problemas sociosanitarios a nivel mundial. En el año 2008, se contabilizaron más de 248 muertes por cada 100000 habitantes, alrededor de un 30.6%, debidas a enfermedades de tipo cardiovascular (*Heart Disease and Stroke Statistics 2012*, **Figura 1**). Cabe destacar que este problema sociosanitario puede agravarse durante los próximos años, pues se ha previsto que para el periodo de tiempo comprendido entre los años 2006 y 2015 se produzca un aumento del número de muertes asociadas a enfermedad cardiovascular. Dentro de las enfermedades cardiovasculares, la enfermedad coronaria y la cardiopatía isquémica, más concretamente, el infarto, son las más recurrentes (**Figura 2**). La aterosclerosis es la enfermedad coronaria más común y representa el principal factor de morbilidad y mortalidad en el mundo occidental (American Heart Association, 1996), causando globalmente el 30% de las muertes por enfermedad cardiovascular. En España encontramos datos similares pues las enfermedades cardiovasculares ocasionaron 120.760 muertes en 2006, lo que supone el 32,5% del total de muertes, causadas principalmente por las cardiopatía isquémica (30,7%) y la enfermedad cerebrovascular o ictus (27,2%) (Javaherian, Park et al. 2002).

### 1.2. Definición

La Intervención Percutánea Transluminal (IPT) es el tratamiento más frecuentemente utilizado para el tratamiento de la aterosclerosis, siendo su principal limitación la **reestenosis**. La reestenosis se define como el engrosamiento progresivo de la pared arterial que se produce tras realizar una IPT que tiene como



**Figura 1. Distribución de las principales causas de mortalidad en los países occidentales. EEUU, 2008.** Figura adaptada de *Heart Disease and Stroke Statistics 2012*. EC=Enfermedad Cardiovascular.



**Figura 2. Distribución de las principales causas de mortalidad debido a enfermedad cardiovascular en los países occidentales. EEUU, 2008.** Datos en porcentaje. Figura adaptada de *Heart Disease and Stroke Statistics 2012*.

objetivo la dilatación de vasos afectados de aterosclerosis para eliminar la estenosis del vaso o revascularizar un miocardio infartado. A diferencia de los ateromas nativos, caracterizados principalmente por un presentar un elevado contenido lipídico y un desarrollo que se produce durante años, las lesiones reestenóticas carecen de lípidos y su crecimiento ocurre normalmente entre 4-6 meses tras la IPT (Wessely 2010). En algunos pacientes, como resultado de una excesiva reestenosis y una recurrencia en los síntomas clínicos asociados, es necesario repetir la revascularización del vaso afectado. La IPT se puede llevar a cabo en diferentes arterias de medio y gran tamaño, y en función del vaso intervenido la angioplastia se clasifica en angioplastia coronaria, angioplastia renal, angioplastia carótida o angioplastia cerebral (Costa and Simon 2005; Wessely 2010).

### **1.3. Historia, incidencia y prevalencia de la reestenosis**

El uso de dispositivos prostéticos implantados percutáneamente para mantener la integridad de la luz del vaso afectados de enfermedad coronaria fue propuesto por primera vez por Dootter y Judkins en 1964 (Dotter and Judkins 1964). Pero fue en 1977 cuando Andreas Grüntzig y colaboradores introdujeron por primera vez la angioplastia coronaria, convirtiéndose en el procedimiento quirúrgico más utilizado en el tratamiento de pacientes afectados de enfermedad arterial coronaria (Grüntzig, Senning et al. 1979). Grüntzig desarrolló un catéter balón para uso periférico. El balón era de material rígido y adquiría un diámetro fijo al ser inflado a 6 atmósferas. El catéter presentaba un lumen distal que permitía la medición de presiones y la inyección de contraste y estaba dotado de un alambre flexible en su extremo distal para permitir el paso atraumático del catéter balón a través de las lesiones arteriales. El procedimiento consistía en la introducción del catéter a través de un vaso sistémico para la dilatación de una arteria estenótica mediante el inflado controlado del balón distensible localizado en el catéter.

La angioplastia con balón presentaba importantes problemas asociados, que incluían el colapso agudo del vaso, el espasmo coronario o la disección de la arteria tratada, así como la posterior re-oclusión del vaso afectado (reestenosis),

transcurridos 2 a 12 meses de la intervención del paciente. La oclusión del vaso es la complicación aguda más importante de la angioplastia y clínicamente se asoció a fenómenos de espasmo (2% de los casos), trombosis localizada (8%) o la disección de la arteria (34%) (Baim and Ignatius 1988). La segunda complicación aguda de mayor relevancia es la disección de la capa media, siendo la más frecuente dada la naturaleza de la angioplastia (Fuster, Badimon et al. 1992; Fuster, Badimon et al. 1992). Sin embargo, sobrepasado el riesgo de complicación aguda, la reestenosis es la principal complicación asociada a la IPT.

En 1985, Palmaz y colaboradores implantaron en arterias periféricas de perros una prótesis metálica denominada *stent*, montada sobre el balón. Esta prótesis es una malla metálica que actúa como soporte del vaso, permitiendo mantener su estructura radial y evitar así, los problemas de colapso de la arteria y la disección de la media. La posterior modificación del *stent* de Palmaz por Schatz y colaboradores dio lugar al primer *stent* comercial, el *stent* Palmaz-Schatz (Schatz, Palmaz et al. 1987). En 1986, Puel y Sigwart implantaron por primera vez un *stent* en humanos y fue Schatz quién demostró en 1987, en pacientes afectados de enfermedad ilíaca, femoral y coronaria, que el uso de *stents* era un método fiable y seguro para evitar los problemas de retroceso elástico y disección, y reducir los niveles de reestenosis, siendo una importante alternativa al bypass de emergencia (Sigwart, Puel et al. 1987). Sin embargo, su uso se asoció con una elevada incidencia de trombosis aguda, requiriendo de un tratamiento anticoagulante, que por contra elevaba la probabilidad de sangrados y hospitalizaciones. La utilización de *stents* coronarios fue finalmente aceptada gracias a los estudios BENESTENT ("Belgian Netherlands Stent") y STRESS ("Stent Reestenosis Study"), que evidenciaron la seguridad de los *stents* en ausencia de terapia anticoagulante, con una terapia doble antiplaquetaria y una correcta implantación del *stent* (Garg and Serruys 2010). El uso de *stents* se ha incrementando enormemente, constituyendo la principal opción elegida al realizar una IPT (84,2%), debido a la menor incidencia de las principales complicaciones agudas de la angioplastia, con la consiguiente mejora del pronóstico a corto y largo plazo de los pacientes tratados.

Pese a las evidentes ventajas del uso de *stents* rápidamente se observaron una serie de problemas vinculados a su uso, como el riesgo de trombosis

subaguda y el desarrollo de una hiperplasia de la neoíntima tras la implantación del *stent* (ISR, del inglés “*In-Stent Restenosis*”). La ISR se asoció a una **proliferación y migración excesiva** de las Células de Músculo Liso Vascular (CMLVs) produciéndose en un 20-30% de los pacientes a los que se les había implantado un *stent* coronario.

Gracias al uso de modelos animales de angioplastia que permiten emular las condiciones de crecimiento de la neoíntima tras daño mecánico observadas en humanos, se demostró la eficacia de la terapia anti-proliferativa para la inhibición del desarrollo de la reestenosis tras angioplastia (Andres and Castro 2003). La identificación del sirolimus (rapamicina o rapamune) como un potente inhibidor de la proliferación celular de las CMLVs y linfocitos durante el desarrollo de la lesión neoíntima (Poon, Marx et al. 1996; Burke, Lubbers et al. 1999; Gallo, Padurean et al. 1999; Marx and Marks 2001) dio lugar al desarrollo del primer Stent Liberador de Fármacos Anti-proliferativos (**SL-FA**). Los SL-FAs son *stents* recubiertos de una envoltura que contiene el fármaco anti-proliferativo y que permite su liberación gradual y local actuando directamente sobre la proliferación de las CMLVs, principal causa de la ISR. Los primeros ensayos clínicos demostraron una reducción significativa de la reestenosis 12 meses tras la implantación del *stent* (Sousa, Costa et al. 2001; Morice, Serruys et al. 2002; Moses, Leon et al. 2003). Estos prometedores resultados dieron lugar finalmente a la comercialización del primer SL-FA basado en la liberación de sirolimus, el *Cypher* (Cordis, Warren, New Jersey). Casi de manera simultánea se desarrolló otro SL-FA basado en la liberación del fármaco anti-proliferativo denominado paclitaxel (taxol), y que se comercializó con el nombre de *Taxus* (Boston Scientific, Natick, Massachusetts) (Grube, Silber et al. 2003). La superior eficacia de los SL-FAs respecto a los *stents* convencionales se demostró de manera irrefutable en múltiples estudios clínicos multicéntricos con una reducción dramática de las tasas de reestenosis desde un 20-30% con los *stents* convencionales a un 0-16% en los SL-FAs (Garg and Serruys 2010; Farooq, Gogas et al. 2011). Por ello, actualmente su uso ha aumentado muy significativamente, de modo que los procedimientos de revascularización en EEUU utilizaron SL-FAs en el 80-90% de los pacientes en 2005.

Pese a los prometedores resultados obtenidos con el uso de los SL-FAs en el tratamiento de la ISR, pronto aparecieron los primeros estudios que evidenciaron las limitaciones y problemas asociados a su uso. El principal problema, respecto al *stent* desnudo, es un aumento en el riesgo de sufrir **trombosis tardía**, aproximadamente 1 año tras la implantación del *stent*. La trombosis debida a la implantación de un *stent* coronario se relaciona con una elevada tasa de mortalidad por infarto agudo de miocardio (10-25%) y depende de factores intrínsecos del paciente y factores dependientes del procedimiento quirúrgico. El mayor riesgo de trombosis asociado al uso de SL-FAs es causado por el retraso en el proceso de re-endotelización del vaso afectado como consecuencia de la inhibición indiscriminada de la proliferación celular, que afecta tanto a las CMLVs como a las células endoteliales. Otros factores importantes son las reacciones de hipersensibilidad o inflamación en respuesta a los polímeros que recubren el SL-FA, roturas del sostén del *stent*, mala posición del *stent* (falta de contacto entre el *stent* y la pared vascular) o el desarrollo de neoaterosclerosis (Kirtane and Stone 2011). Como consecuencia de estos riesgos, las directrices actuales recomiendan el uso de un tratamiento antiplaquetario dual (clopidogrel y aspirina) de duración prolongada, pues su interrupción genera un elevado riesgo de trombosis e infarto agudo de miocardio (Daemen and Serruys 2007; Kirtane and Stone 2011). Cabe destacar el número creciente de casos descritos durante los últimos años (5-10%) de pacientes que desarrollan **ISR tras la implantación de un SL-FA**, lo cual se ha vinculado a múltiples factores de tipo biológico, arterial, dependientes del *stent* o de su implantación (Farooq, Gogas et al. 2011). Esta complicación unida a la implantación inapropiada de SL-FAs, o bien en pacientes con lesiones complejas, a quienes su aplicación puede ser contraproducente, o bien el uso no autorizado de SL-FAs, ha supuesto el aumento de la incidencia de la reestenosis desde un 5% a un 15% (Simsek, Magro et al. 2010; Stolker, Kennedy et al. 2010; Manari, Ortolani et al. 2011). Existe un inconveniente **económico** adicional en el uso de los SL-FAs, pues su precio es 2 a 3 veces superior a un *stent* convencional (Daemen and Serruys 2007). Teniendo en cuenta que en EEUU se realizan 590000 IPTC cada año con un gasto de aproximadamente 12000 millones de dólares, y que la aplicación de SL-FAs es del 76% respecto al total de *stents* implantados (datos de 2006) (*Heart Disease and Stroke Statistics 2012*), la relevancia socio-sanitaria de los problemas asociados a los SL-FAs se agrava. Una situación similar la

encontramos en España, donde en 2009 se realizaron 216 IPTC primarias/millón de habitantes (Sjin, Krishnaraju et al. 2002), un número que ha ido en aumento desde 2006 y donde la implantación de SL-FAs supone un 60% respecto al 40% de *stents* convencionales. El constante incremento en el uso clínico de los SL-FAs y la progresiva identificación de nuevos problemas asociados al uso de los SL-FAs hace vital la realización de futuras investigaciones que permitan mejorar su eficacia a corto y largo plazo. También sería conveniente disponer de tests para identificar los pacientes con menor riesgo de desarrollar reestenosis, a quienes podría implantarse *stents* convencionales, más baratos y con menos efectos adversos.

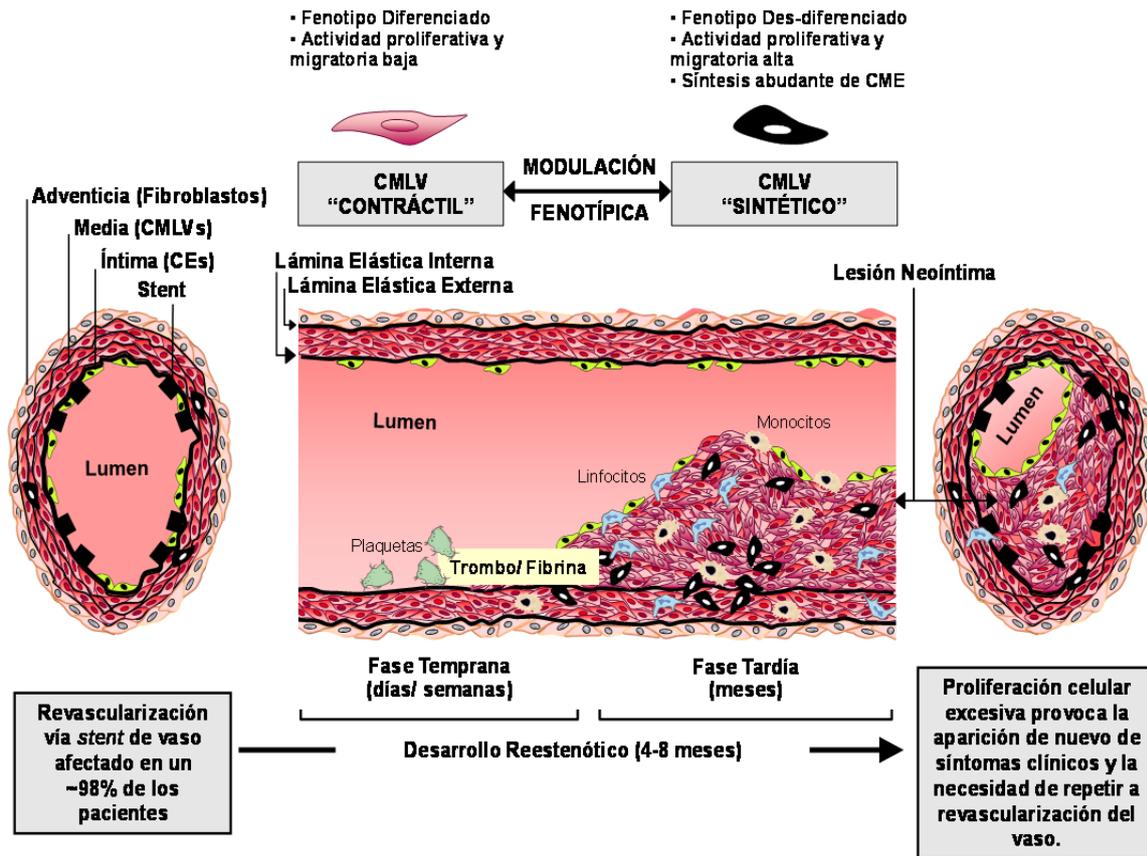
#### 1.4. Bases moleculares de la reestenosis

La reestenosis es un proceso multifactorial en el que intervienen diversos tipos celulares, principalmente plaquetas, monocitos/macrófagos, células endoteliales y CMLVs. Se acepta que el crecimiento de la lesión reestenótica o lesión neoíntima, es un proceso iniciado por el daño mecánico que provoca la implantación del *stent* (Andres 2004; Costa and Simon 2005). La reestenosis es un proceso biológico cuya etiología es muy similar a un proceso de sanado de una herida y se puede dividir en 3 fases: una fase inflamatoria, una fase de proliferación celular y una fase de remodelado de la matriz extracelular (**Figura 3**)

La **fase inflamatoria**, que se produce en días o semanas, se inicia con un proceso agudo que supone una activación plaquetaria y trombosis localizada, acompañada del reclutamiento de monocitos, neutrófilos y linfocitos circulantes en la superficie arterial dañada (Inoue, Croce et al. 2011). Estos tipos celulares desencadenan una respuesta inflamatoria crónica caracterizada por la activación de las CMLVs residentes en la túnica media, las cuales adoptan un fenotipo “sintético” caracterizado por cambios morfológicos, expresión de isoformas embrionarias de proteínas contráctiles, alta capacidad de respuesta a estímulos de crecimiento y quimiotácticos, y síntesis abundante de matriz extracelular. La **fase de proliferación celular** se inicia en respuesta a una plétora de factores quimiotácticos y mitogénicos producidos por las células de la lesión neoíntima que provoca una primera fase proliferativa de las CMLVs de la media y su migración

hacia la lesión, seguida por una segunda respuesta hiperplásica de las CMLVs de la lesión neoíntima (la importancia de la proliferación celular en el contexto de la reestenosis se analiza en detalle en el **Apartado 5**). Finalmente, en la **fase de remodelado de la matriz extracelular**, se produce una resolución de la inflamación y cicatrización de la lesión vascular que va acompañada con la restauración del fenotipo contráctil de las CMLVs de la neoíntima y cambios en la composición de la matriz extracelular que se asemeja más a la pared arterial no dañada (Andres 2004; Costa and Simon 2005; Marx, Totary-Jain et al. 2011). Además de la importancia de los componentes celulares previamente descritos, estudios recientes sugieren la implicación de progenitores de CMLVs en el desarrollo de la lesión neoíntima. Estos progenitores, tras movilizarse desde la médula ósea a la zona de daño vascular, se diferencian a CMLVs maduras contribuyendo al desarrollo de la lesión (Sata, Saiura et al. 2002; Caplice, Bunch et al. 2003). Sin embargo, este concepto es controvertido y requiere de nuevos estudios para definir la función de las células progenitoras en el contexto de la reestenosis.

Entre los reguladores de la hiperplasia de la neoíntima identificados en estudios animales y humanos se incluyen factores trombogénicos (por ejemplo, el factor tisular, receptor de la trombina), moléculas de adhesión celular (por ejemplo, VCAM, ICAM, LFA-1, Mac-1), transductores de señales (por ejemplo, PI3K, MEK/ERK), factores de transcripción (por ejemplo, NF- $\kappa$ B, E2F, AP-1, c-myc, c-myb, YY1, Gax), proteínas reguladoras del ciclo celular (por ejemplo, pRb, p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>, CDK2, *cdc2*, ciclina B1, PCNA), factores de crecimiento (por ejemplo, PDGF-BB, TGF- $\beta$ , FGF, IGF, EGF, VEGF), citoquinas inflamatorias (por ejemplo, TNF $\alpha$ ), factores de quimiotaxis (por ejemplo, CCR2, MCP-1), y metaloproteasas (por ejemplo, MMP-2, MMP-9). Más recientemente se ha demostrado la importancia de los microRNAs en el control de la proliferación y diferenciación de las CMLVs (Andres 2004; Costa and Simon 2005; Marx, Totary-Jain et al. 2011).



**Figura 3. Progresión de la lesión reestenótica.** CMLV: célula de músculo liso vascular; CE: célula endotelial; CME: componente de matriz extracelular.

## 1.5. Factores de riesgo de reestenosis

A diferencia de la aterosclerosis primaria, cuyos factores de riesgo están bien establecidos, los factores conocidos asociados al desarrollo de la reestenosis tras IPT son limitados y su uso en la identificación de grupos de riesgo ha derivado en resultados solo parcialmente satisfactorios (Weintraub, Kosinski et al. 1993; Kastrati, Schomig et al. 1997; Agema, Jukema et al. 2001; Monraats, W et al. 2004; Roy, Okabe et al. 2007; Rathore, Terashima et al. 2009). La estratificación de los pacientes se ha basado en el uso de factores de tipo clínico, biológico, asociados al tipo de lesión y de procedimiento. A continuación se resumen algunos de estos factores de riesgo, centrándonos en los factores clínicos y biológicos de la enfermedad, con especial énfasis en los factores de tipo genético. La información acerca de la implicación del tipo de lesión y del procedimiento de la intervención se

resumen en revisiones recientes (Farooq, Gogas et al. 2011; Jukema, Verschuren et al. 2012).

### **1.5.1 Factores clínicos**

#### **1.5.1.1 Diabetes**

El factor de riesgo clínico más consistentemente vinculado a la susceptibilidad a sufrir reestenosis es la diabetes mellitus (Gilbert, Raboud et al. 2004). Los pacientes con diabetes presentan un mayor riesgo de sufrir reestenosis y complicaciones clínicas asociadas comparado con los pacientes no diabéticos (Abizaid, Kornowski et al. 1998). El principal mecanismo responsable de la mayor incidencia de reestenosis en pacientes diabéticos es el desarrollo de una hiperplasia de la intima (Aronson, Bloomgarden et al. 1996; Kornowski, Mintz et al. 1997; Elezi, Kastrati et al. 1998), que es más frecuente, menos focalizada y más susceptible de producir la oclusión total del vaso afectado (Van Belle, Abolmaali et al. 1999). Algunos estudios también evidencian una mayor incidencia de eventos reestenóticos y clínicos en pacientes diabéticos revascularizados con un SF-LA (Lemos, Hoye et al. 2004; Moussa, Leon et al. 2004; Daemen, Wenaweser et al. 2007; Iijima, Ndrepepa et al. 2007; Maisel 2007).

El mecanismo biológico aceptado que explica las alteraciones asociadas al aumento de la reestenosis en diabetes incluye diferentes procesos tales como la disfunción endotelial causada por la hiperglicemia, defectos en la fibrinólisis, un aumento de la agregación plaquetaria, inestabilidad de la placa, defectos en el remodelado arterial y mayor propensión a la calcificación y fibrosis de las arterias coronarias (Lee, David et al. 2004; Berry, Tardif et al. 2007; Stone, Chiquette et al. 2007; Aronson and Edelman 2010). El tratamiento basado en la administración de insulina ha permitido corregir el grado de reestenosis, reduciendo el desarrollo de la lesión neoíntima en modelos animales (Kim, Chan et al. 2005; Breen, Chan et al. 2009; Murthy, Sukhanov et al. 2009; Breen, Dhaliwall et al. 2010). Sin embargo, su reciente aplicación clínica no ha demostrado un efecto beneficioso en pacientes diabéticos (Natarajan, Strauss et al. 2012).

#### 1.5.1.2 Sexo

Pese a que algunos investigadores han evidenciado la existencia de un mayor riesgo de sufrir reestenosis en hombres respecto a mujeres (Holmes, Vlietstra et al. 1984; Popma, De Cesare et al. 1993; Brown, Williams et al. 2010), los resultados no son concluyentes. De hecho, en un estudio reciente realizado de forma independiente en tres cohortes de pacientes se concluye que no hay diferencias significativas en la eficacia y seguridad de diversos *stents* de uso comercial entre hombres y mujeres (Stefanini, Kalesan et al. 2012).

#### 1.5.1.3 Edad

Como en el caso del sexo, la relación entre la edad y el riesgo de sufrir reestenosis es inconcluyente. Mientras que existen estudios que evidencian un aumento progresivo del riesgo de sufrir reestenosis con la edad (Weintraub, Kosinski et al. 1993), otros no observan dicha asociación (Rathore, Terashima et al. 2009).

#### 1.5.1.4 Hipertensión

La hipertensión es un factor de riesgo de reestenosis ampliamente reconocido (Cutlip, Chauhan et al. 2002; Agema, Monraats et al. 2004; Singh, Gersh et al. 2004), posiblemente como consecuencia de la mayor disfunción endotelial en pacientes hipertensos.

#### 1.5.1.5 Historial familiar

El historial clínico del paciente al considerar la incidencia de eventos de reestenosis previos o en familiares directos, se considera un factor clínico de riesgo de sufrir reestenosis (Kastrati, Schomig et al. 1998). El acervo genético (características genéticas) de cada individuo puede explicar este factor.

---

## 1.5.2 Factores Biológicos

### 1.5.2.1 Inflamación

La inflamación es probablemente el factor de riesgo biológico más importante en el desarrollo de la reestenosis (Niccoli, Montone et al. 2010; Inoue, Croce et al. 2011; Jukema, Verschuren et al. 2012). La implantación del *stent* produce un daño mecánico que conlleva una elevada inflamación de tipo local mediada por las plaquetas, neutrófilos y monocitos (Welt, Edelman et al. 2000; Welt and Rogers 2002).

El análisis de los niveles de la proteína C-reactiva en plasma de pacientes es un marcador de inflamación asociado al desarrollo de la enfermedad cardiovascular. Niveles altos de la proteína C-reactiva predicen una mayor incidencia del desarrollo de la reestenosis tras implantación de un *stent* convencional y una mayor severidad de la lesión (Niccoli, Montone et al. 2010). Sin embargo, la asociación entre los niveles de proteína C-reactiva y la reestenosis no es clara en pacientes tratados con un SL-FA (Niccoli, Montone et al. 2010), pues los niveles de proteína C-reactiva se ven reducidos en estos pacientes comparado con pacientes revascularizados con un *stent* convencional (Kim, Ko et al. 2005). Esta discrepancia no se observa, sin embargo, en la predicción del riesgo de sufrir trombosis tardía tras implantación de SF-LAs, donde los niveles altos de proteínas C-reactiva sí determinan un mayor riesgo (Niccoli, Montone et al. 2010). La inhibición de la inflamación asociada a los fármacos liberados explicaría la falta de relación entre los niveles de proteína C-reactiva y el riesgo de reestenosis en pacientes tratados con SL-FAs, mientras que sí que se asocia con el riesgo de sufrir trombosis tardía, momento en el cual el *stent* ha dejado de liberar el fármaco.

Otros marcadores de inflamación identificados como predictores del desarrollo de reestenosis tras implantación de un *stent* convencional son las metaloproteinasas MMP2 (Matrix Metalloproteinase-2), MMP9 y la proteína A plasmática asociada al embarazo, cuya actividad es importante en la degradación de la matriz extracelular y la migración por parte de las CMLVs (Niccoli, Montone et al. 2010; Inoue, Croce et al. 2011). Los marcadores de activación de las plaquetas

y neutrófilos, sCD40L y glicosilfosfatidilinositol-80, o las proteínas del sistema de coagulación, fibrinógeno y el inhibidor de la activador del plasminógeno se han considerado también marcadores de inflamación asociados a reestenosis (Niccoli, Montone et al. 2010; Inoue, Croce et al. 2011). En el caso de los SL-FAs, los niveles de MMP2 y MMP9 también predicen el riesgo de reestenosis tras su implantación (Katsaros, Kastl et al. 2010). Resultados similares fueron obtenidos al analizar los niveles séricos del inhibidor del activador del plasminógeno (Katsaros, Speidl et al. 2008) y de las proteínas del complemento C3a y C5a (Speidl, Katsaros et al. 2010) en pacientes tratados con este tipo de *stents*.

Finalmente, existe una respuesta inflamatoria alérgica frente al propio fármaco o adyuvante del SL-FA, al material del cual está fabricado el *stent* o al polímero que lo recubre, y que aumenta significativamente la probabilidad de sufrir eventos de trombosis tardía en pacientes tratados con estos dispositivos (Inoue, Croce et al. 2011).

#### 1.5.2.2 Función y remodelado vascular

Como hemos descrito previamente, el papel de las MMPs en el proceso inflamatorio y remodelado vascular, resultado de su actividad proteolítica de la matriz extracelular, es un factor relevante en el riesgo de desarrollo de la lesión reestenótica.

Por otro lado, el papel de los progenitores endoteliales circulantes en la función vascular durante el desarrollo de la reestenosis es controvertido, encontrando trabajos que evidencian una mejora en la re-endotelización y prevención de la proliferación (Kong, Melo et al. 2004; Forte, Cipollaro et al. 2007), mientras que otros sugieren un efecto inductor del desarrollo de la lesión neoíntima (Pelliccia, Cianfrocca et al. 2010). Pelliccia y colaboradores identifican, en este trabajo, la presencia de niveles elevados de progenitores endoteliales circulantes en pacientes afectados de reestenosis respecto a pacientes no reestenóticos (Pelliccia, Cianfrocca et al. 2010).

El óxido nítrico, producido por la enzima óxido nítrico sintasa, es una molécula vasodilatadora con un efecto inhibitorio de la proliferación y migración de las CMLVs (Jukema, Verschuren et al. 2012). Variaciones genéticas en el gen de la enzima óxido nítrico sintasa con posibles implicaciones funcionales en la expresión o función de la enzima se han asociado con el riesgo de sufrir reestenosis. Dada la importancia del óxido nítrico en la biología del vaso, en los últimos años se han publicado diversos trabajos cuyo objetivo se centra en el desarrollo de sistemas de liberación local de óxido nítrico como sistema de bloqueo de la reestenosis en el vaso afectado. Ensayos preliminares en pacientes, mediante el uso de estrategias de terapia génica basadas en la transducción de genes mediada por vectores lipídicos o víricos, sugieren que la liberación local de óxido nítrico es un abordaje beneficioso y seguro en el tratamiento de la enfermedad (Sharif, Hynes et al. 2008; Brito, Chandrasekhar et al. 2010; von der Leyen, Mugge et al. 2011). Otro miembro del metabolismo del óxido nítrico, la dimetilarginina asimétrica, ha sido identificada como un predictor positivo del riesgo de reestenosis, posiblemente debido a su capacidad de inhibir la producción de óxido nítrico al bloquear la enzima de síntesis (Ari, Ari et al. 2010).

### **1.5.3 Factores genéticos**

#### *1.5.3.1 Generalidades*

Las enfermedades vasculares se caracterizan por tener en común la influencia de los factores genéticos en el desarrollo de las mismas. El impacto de los factores de riesgo de tipo clínico depende de las características genéticas del paciente que influirán fuertemente sobre la susceptibilidad individual a dicho factor. Existen múltiples evidencias que apoyan la contribución de los factores genéticos en el desarrollo de la enfermedad reestenótica, de forma independiente de los factores clínicos. Un ensayo en pacientes afectados de múltiples lesiones se analizó la dependencia del desarrollo de reestenosis tras implantación de *stent* coronario debida a factores inherentes al propio paciente (Kastrati, Schomig et al. 1998). La incidencia de aparición de una lesión reestenótica resultó ser 2,5 veces mayor si un vaso adyacente sufría reestenosis respecto a los que no presentaban vasos cercanos afectados de reestenosis (Kastrati, Schomig et al. 1998). La

importancia de los factores genéticos en la enfermedad reestenótica se puso también de manifiesto en un estudio realizado en gemelos por el grupo de Marenberg y colaboradores, quienes observaron que la incidencia de muerte por enfermedad coronaria a edades tempranas es un potente predictor del riesgo de muerte para el otro hermano (Marenberg, Risch et al. 1994).

### 1.5.3.2 Polimorfismos de base única

Existen numerosos ejemplos de trabajos que estudian la importancia de las variaciones genéticas presentes en genes involucrados en la regulación de procesos inflamatorios, proliferativos, homeostáticos, de señalización celular, metabolismo de lípidos o función endotelial, y que juegan un papel esencial en el desarrollo de la reestenosis. Durante los últimos años han ganado importancia estudios genéticos basados en la identificación de locis genéticos presentes en todo el genoma humano que actúan como biomarcadores de la susceptibilidad individual a desarrollar enfermedades concretas. Este tipo de estudios se les denomina con el término inglés “*Genome Wide Association Studies*” (GWAS) (Hardy and Singleton 2009; Manolio, Collins et al. 2009; Gibson 2011; Visscher, Brown et al. 2012). Una de las teorías en las que se han basado los GWAS es la influencia de variantes genéticas comunes (frecuencia poblacional >1%) presentes en el genoma sobre la predisposición individual a una enfermedad, en contraposición con el uso de variantes genéticas raras (frecuencia poblacional <1%) (Gibson 2011). Las variantes genéticas comunes más estudiadas son los polimorfismos de base única (SNP, del término inglés “*Single Nucleotide Polymorphism*”). Los SNPs son variaciones alélicas de un solo nucleótido que constituyen aproximadamente el 90% de toda la variabilidad del genoma humano, y se estima su presencia cada 100-300 pares de bases (pb) aproximadamente (Chorley, Wang et al. 2008). Pese a que estas variaciones no suelen producir de forma directa efectos graves sobre la salud humana, la suma de múltiples efectos moderados sí puede influir profundamente en el riesgo individual a sufrir una enfermedad (Lohmueller, Pearce et al. 2003; Hardy and Singleton 2009).

Pese a que en la mayoría de los casos no se ha reconocido un efecto funcional de los SNPs identificados como marcadores de una enfermedad, se ha

demostrado la existencia de polimorfismos que pueden afectar a la expresión génica o función proteica, dependiendo de su localización en el genoma. La implicación funcional de SNPs localizados en regiones codificantes ha sido extensamente estudiada en la literatura científica. La razón que se atribuye al mayor número de trabajos parece obvia pues su presencia ejerce un efecto directo sobre la funcionalidad de la proteína. Estos polimorfismos pueden provocar alteraciones en la proteína, como por ejemplo sustituciones aminoacídicas (mutaciones no sinónimas), cambios de polaridad, cambios en el estado de fosforilación, alteraciones en el correcto plegamiento de la proteína u otras modificaciones, que alteran, en último término la funcionalidad de la proteína (Evans and Relling 1999; Syvanen 2001). La presencia de polimorfismos en regiones no codificantes del genoma también se ha asociado con alteraciones en la regulación transcripcional de algunos genes. La dificultad a la hora de estudiar la implicación funcional de estos polimorfismos ha derivado en un menor número de estudios, centrándose principalmente el análisis de SNPs localizados en regiones reguladoras de la expresión génica, como promotores, potenciadores (“*enhancers*”) o silenciadores (“*silencers*”). El término anglosajón designado para estos SNPs es el de “*regulatory SNPs*” (rSNPs). El principal mecanismo molecular que explica la importancia funcional de estos polimorfismos es su capacidad para alterar la interacción de las proteínas reguladoras de la transcripción génica (como por ejemplo factores de transcripción) con sus elementos génicos de unión al ADN, favoreciendo o impidiendo su correcta actividad (Chorley, Wang et al. 2008; Macintyre, Bailey et al. 2010).

En el contexto de la reestenosis existen numerosos trabajos que identifican SNPs localizados en genes reguladores de procesos relevantes en el desarrollo de la enfermedad. El conjunto de estos trabajos apoya la importancia directa de estos genes en el desarrollo de la reestenosis, así como la contribución de la variabilidad genética individual en la susceptibilidad a la misma. A continuación se resumen los más relevantes:

---

### *Sistema hemostático*

La importancia del sistema hemostático en el inicio y desarrollo de la reestenosis se ha puesto de manifiesto con la identificación de polimorfismos en genes reguladores de este proceso como predictores de la enfermedad. La identificación del polimorfismo rs5918 en el gen que codifica para la glicoproteína IIIa en plaquetas por el grupo de Kastrati y colaboradores como un predictor del riesgo aumentado de sufrir reestenosis (Kastrati, Schomig et al. 1999), fue validado en una población independiente por el grupo de Wheeler y colaboradores (Wheeler, Braden et al. 2002). Sin embargo, esta asociación genética no fue replicada en otros estudios alternativos (Mamotte, van Bockxmeer et al. 1998; Volzke, Grimm et al. 2004).

El análisis de variantes génicas en genes reguladores del sistema trombocítico en 3104 pacientes reclutados en el estudio genético de la enfermedad reestenótica, GENDER (del inglés “*GENetic DEterminants of REstenosis*”) resultó en la identificación de un SNP presente en el gen que codifica para el Factor V Leyden asociado al riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario (Pons, Monraats et al. 2007). En el mismo estudio, se encontró una asociación estadísticamente significativa entre un haplotipo presente en el gen codificante para el receptor de plaquetas P2Y12 y el riesgo de reestenosis (Rudez, Pons et al. 2008). Sin embargo, estudios posteriores no han encontrado una relevancia funcional de este polimorfismo (Angiolillo, Fernandez-Ortiz et al. 2005; von Beckerath, von Beckerath et al. 2005; Giusti, Gori et al. 2007; Lev, Patel et al. 2007). La posible causa de esta discrepancia es la inclusión en el estudio de pacientes en tratamiento con una terapia antiplaquetaria. Recientemente, Sofi y colaboradores encontraron asociación positiva entre el polimorfismo CYP2C19(\*)2 (o 681 G>A) y el riesgo a sufrir eventos cardiovasculares y trombosis asociada a *stent* en una cohorte de más de 8000 pacientes (Sofi, Giusti et al. 2011). El ensayo GENDER también identificó un SNP localizado en el gen del activador del plasminógeno-I asociado a un mayor riesgo de reestenosis (Pons, Monraats et al. 2007). Esto ha sido corroborado por otros trabajos (Ishiwata, Tukada et al. 1997; Prisco, Fedi et al. 2001) y apoyado por ensayos funcionales que vinculan la variante polimórfica de riesgo con niveles aumentados de la proteína en plasma (Diamanti-Kandarakis,

Palioniko et al. 2004; Kathiresan, Gabriel et al. 2005; Asselbergs, Williams et al. 2006).

Por último, otros ejemplos los encontramos en la asociación del SNP 1166A>C del receptor de la angiotensina II tipo 1 (Wijpkema, van Haelst et al. 2006), el SNP 365C>A del gen que codifica para el receptor de la insulina (Oishi, Manabe et al. 2010) o el SNP 161C>T localizado en el receptor PPAR $\gamma$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$* ) (Neugebauer, Goldbergova-Pavkova et al. 2009) con el riesgo de sufrir reestenosis, todos ellos importantes reguladores del sistema hemostático.

### *Inflamación*

Como ya hemos comentado previamente, la inflamación local producida por el daño endotelial tras la implantación de un *stent* se considera el evento desencadenante de la respuesta proliferativa y migratoria de las CMLVs y en consecuencia del desarrollo de la lesión. Dada su relevancia en la patofisiología de la enfermedad, numerosos estudios se han centrado en la identificación de variantes génicas, principalmente SNPs, en genes reguladores del proceso inflamatorio y la reestenosis, como por ejemplo citoquinas, quimioquinas, selectinas u otros mediadores de la respuesta inflamatoria. El grupo de Kastrati y colaboradores demostraron en una cohorte de 1850 pacientes la asociación entre un SNP localizado en el exón 2 del gen que codifica para el antagonista del receptor de la Interleuquina-1 con el riesgo reducido de sufrir reestenosis (Kastrati, Koch et al. 2000). Otra citoquina, la interleuquina 10, contiene 3 SNPs que han sido identificados como marcadores del riesgo de reestenosis gracias al estudio de asociación genética multicéntrico GENDER (Monraats, Kurreeman et al. 2007). Otros ejemplos de polimorfismos asociados con el riesgo de sufrir reestenosis los encontramos en la selectina L (Rauchhaus, Gross et al. 2002), el factor de estimulación de colonias-2 (gen CD14) (Monraats, Pires et al. 2005), en la eotaxina (Monraats, Pires et al. 2005) o el Toll-Like -2 receptor (Hamann, Gomma et al. 2005). Por último la citoquina TNF- $\alpha$  (del inglés "*Tumor Necrosis Factor- $\alpha$* "), un mediador esencial del proceso inflamatorio, ha sido objeto de ensayos de

asociación enfermedad-genotipo, identificándose dos SNPs localizados en el promotor del gen que se han asociado con una función protectora en el desarrollo de la reestenosis (Monraats, Pires et al. 2005). Estos resultados, sin embargo, no pudieron ser corroborados por el grupo de Koch y colaboradores (Koch, Tiroch et al. 2003).

#### *Remodelado vascular*

La actividad de las MMPs juega un papel muy relevante en la patogénesis de la aterosclerosis y reestenosis (Agema, Jukema et al. 2001). Diversos ensayos funcionales han demostrado que el polimorfismo -1612 5A/6A, localizado en el promotor del gen de la MMP3, se asocia con una expresión alterada de la proteína (Ye, Eriksson et al. 1996; Beyzade, Zhang et al. 2003; Lichtinghagen, Bahr et al. 2003; Medley, Kingwell et al. 2003) y con el grado de inestabilidad de la placa aterosclerótica (Ye 2006). Este efecto funcional del polimorfismo sobre la expresión de MMP3 parece estar vinculado con el riesgo de sufrir reestenosis, tal y como se demuestra en diversos estudios (de Maat, Jukema et al. 1999; Humphries, Bauters et al. 2002; Hoppmann, Koch et al. 2004). Sin embargo, esta asociación no pudo replicarse en el estudio GENDER, donde no se observó significatividad estadística entre polimorfismos presentes en los genes MMP2 y MMP3 y el desarrollo de reestenosis tras implantación de *stent* (Verschuren, Sampietro et al. 2010). Igualmente, el grupo de Jguirim-Souissi y colaboradores falló en la identificación de una asociación genética con el desarrollo de reestenosis en el análisis de polimorfismos presentes en los genes que codifican para las MMP1 y 12 (Jguirim-Souissi, Jelassi et al. 2011).

#### *Proliferación celular*

La proliferación celular excesiva es una de las características más importantes de la patofisiología de la reestenosis. Sin embargo, los estudios realizados para la identificación de SNPs localizados en genes reguladores del ciclo celular han dado lugar a pocas asociaciones estadísticamente significativas con el riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent*. En el estudio más importante, realizado por el grupo de Van Tiel y colaboradores, se identifica un polimorfismo en el promotor

del inhibidor de ciclo celular p27<sup>Kip1</sup> que se asocia con un riesgo reducido de sufrir reestenosis (van Tiel, Bonta et al. 2009). Además, se aportan evidencias de un posible valor funcional del SNP, al demostrar una modulación de la actividad promotora del gen dependiente de la variante polimórfica presente (van Tiel, Bonta et al. 2009).

Por el contrario, no se encontraron asociaciones entre polimorfismos localizados en los genes p27<sup>Kip1</sup> y p53 (Tiroch, Koch et al. 2009), o en entre el loci del cromosoma 9p21.3 y el riesgo de sufrir reestenosis en pacientes tratados con SL-FA (Hoppmann, Erl et al. 2009).

## 2. Ciclo celular

### 2.1. Conceptos generales

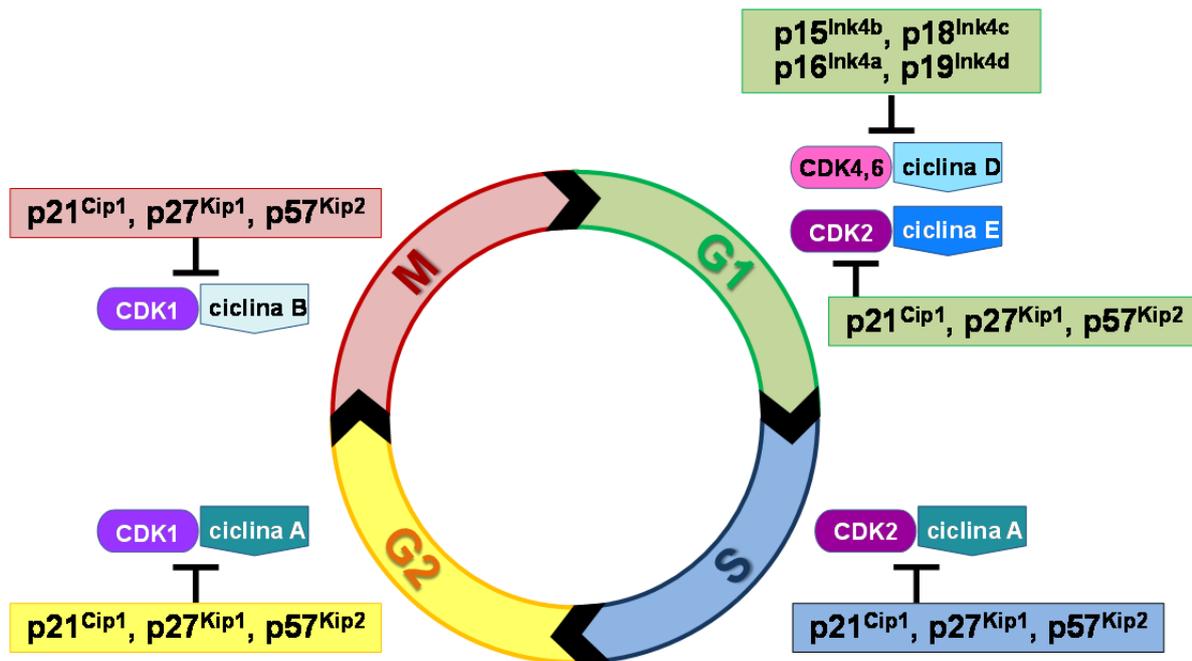
La división celular en mamíferos implica la transducción, estrictamente regulada, de señales mitogénicas a la maquinaria celular que controla la duplicación del material genético y la correcta segregación a las células hijas. El **ciclo celular** se refiere al conjunto de eventos secuenciales y coordinados que permiten la división de la célula madre en dos células hijas que poseen la misma e idéntica cantidad de material (Norbury and Nurse 1992). El ciclo celular se divide en 4 grandes fases, **G0/G1**, **S**, **G2** y **M**. En condiciones normales, las células totalmente diferenciadas se mantienen en un estado no proliferativo o quiescente (**Fase G0**). Tras la estimulación con factores mitogénicos, las células entran la **Fase G1**, durante la cual se produce la síntesis y/o activación de las proteínas necesarias para la replicación del ADN en la fase siguiente (**Fase S**). A continuación la célula entra en la **Fase G2**, en la que se produce la síntesis/activación de las proteínas necesarias para la mitosis celular (**Fase M**). Con el objetivo de garantizar el orden correcto de los eventos que constituyen el ciclo celular existen una serie de **Puntos de Control** (en inglés "*Checkpoints*") (Malumbres 2011) que aseguran no entrar en la siguiente fase del ciclo celular sin haber completado correctamente la fase anterior. Así, existe una separación entre la fase de mitosis y la siguiente replicación del ADN, con un punto de control entre

la fase G1 y S que certifica que el material genético se replique sólo una vez (Hunt, Nasmyth et al. 2011). Por otro lado, un punto de control presente en la fase S asegura la replicación sin errores del ADN, evitando el avance a la siguiente fase del ciclo celular en caso de daño del ADN o de producirse defectos en la replicación cromosómica y facilitando el tiempo necesario para que se lleve a cabo la reparación del ADN (Labib and De Piccoli 2011). Finalmente, el punto de control de ensamblaje del huso mitótico controla el avance a lo largo de la fase de mitosis al controlar la correcta unión de los microtúbulos al huso mitótico (Musacchio 2011).

El avance a través de las distintas fases del ciclo celular requiere de la activación secuencial de holoenzimas específicas constituidas por una subunidad catalítica denominada quinasa dependiente de ciclina (CDK, del inglés “*Cyclin-Dependent Kinase*”) y una subunidad reguladora denominada ciclina (**Figura 4**) (Ekholm and Reed 2000). La activación secuencial de las CDK/ciclinas permite diversos eventos de fosforilación de sustratos celulares implicados en la proliferación celular. Las CDKs se hayan presentes en la célula en un estado inactivo debido a la ausencia de su subunidad reguladora, la ciclina. En presencia de un estímulo mitogénico se produce la transcripción de los genes que codifican para las ciclinas permitiendo de esta manera la activación de las CDKs. Entre los mecanismos que regulan la activación de los complejos CDK/ciclinas, existen procesos de síntesis y degradación periódica de reguladores positivos y negativos del ciclo celular y procesos de fosforilación/defosforilación de CDKs y ciclinas (Fuster, Fernandez et al. 2010; Malumbres 2011). Las modificaciones por fosforilación permiten el incremento de la capacidad catalítica, como por ejemplo la fosforilación en la treonina 161 de la CDK1, en la treonina 160 de la CDK2 o bien en la treonina 170 de la CDK7. Por otro lado, la fosforilación de CDKs puede también disminuir su actividad quinasa, como en el caso de la fosforilación de los residuos de treonina 14 y tirosina 15 de la CDK1 y CDK2 (Morgan 1995).

Los complejos CDK/ciclina modulan la expresión de los genes encargados del control del ciclo celular y la síntesis de ADN a través de la regulación de la actividad de los factores de transcripción E2F/DP y pRb. En células no proliferantes, una actividad baja de los complejos CDK/ciclina permite mantener a

pRb en una forma hipofosforilada que es capaz de unirse e inactivar el factor E2F/DP. Por el contrario, en células en proliferación donde la actividad CDK/ciclina es alta, se produce la hiperfosforilación de pRb durante el final de la fase G1 que permite la liberación de E2F/DP resultando en la activación transcripcional de los genes necesarios para la progresión del ciclo celular (Fuster, Fernandez et al. 2010).



**Figura 4. Esquema general del ciclo celular en mamíferos.**

Con el objetivo de asegurar la progresión unidireccional del ciclo celular existe un control estricto de los niveles de las proteínas que regulan, tanto positivamente como negativamente, la transición a lo largo del ciclo celular. Uno de los sistemas de control, se basa en la degradación controlada y específica de las proteínas que participan en la regulación del ciclo celular mediante el marcaje de la proteína diana por ubiquitilación y su posterior degradación por el proteasoma (Reed 2003). La destrucción de una proteína marcada se lleva a cabo por la ligasa de proteínas ubiquitiniladas SCF (del inglés “*Skip1/Cullin/E-box*”) y del complejo proteico APC/C (del inglés “*Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome*”), responsables de la ubiquitilación de diferentes proteínas reguladoras del ciclo celular (Reed 2003). La función de las ligasas SCF se basa en su capacidad de reconocer substratos

fosforilados, siendo por tanto activas cuando la proteína diana ha sido previamente fosforilada (Reed 2003). Por contra, el complejo APC/C se activa al inicio de la anafase hasta la siguiente transición G1-S por procesos de fosforilación y unión a co-factores específicos, como la proteína *cdc20* o la proteína Cdh1 y es, tras su activación, cuando reconoce y ubiquitila un conjunto de proteínas diana (Reed 2003).

Otro nivel de regulación del ciclo celular depende de la actuación de proteínas inhibitoras de CDKs denominadas CKIs (del inglés "CDK Inhibitors"), regulando su función mediante interacción con los complejos CDK/ciclina. Las CKIs se pueden subdividir en 2 subfamilias: CIP/KIP (del inglés "CDK Interacting Protein/Kinase Inhibitory Protein": p21, p27 y p57) e INK4 (del inglés "INhibitor of CDK4": p15, p16, p18, y p19). Los CKIs de la familia CIP/KIP son capaces de unirse a e inhibir diferentes complejos CDK/ciclina, mientras que los CKIs de la familia INK4 interaccionan e inhiben de forma específica los complejos CDK-ciclina D. Los niveles proteicos de CKIs, así como su actividad sobre los diferentes complejos CDK/ciclina, se encuentran moduladas por estímulos pro- y anti-mitogénicos. El factor supresor de tumores p53 y otras proteínas son capaces de regular la expresión y función de los CKIs para asegurar la parada del ciclo celular en aquellas situaciones donde las condiciones externas no sean las adecuadas o exista la posibilidad de que se acumulen daños genéticos.

A continuación se dedica un apartado a la fase G2/M y de mitosis del ciclo celular, en la que juega un papel esencial la proteína ciclina B1, la cual ha sido motivo de estudio en la presente tesis.

## **2.2. Fase G2/M y mitosis**

El término mitosis, acuñado por Whalter Flemming en el año 1880, constituye el evento final del ciclo celular que supone la división de la célula madre dando lugar a dos células hijas que reciben la misma cantidad e idéntico ADN. Durante la fase que le precede, fase G2, y la propia fase de mitosis se producen un conjunto orquestado de eventos que permitirá la correcta segregación de los cromosomas previo a la división celular.

Tradicionalmente, la mitosis se encuentra dividida en diferentes fases (**Figura 5**):

Profase: Se considera la fase inicial del ciclo celular que se inicia con la condensación de los cromosomas y finaliza con la rotura de la envoltura nuclear, que inicia la prometafase.

Prometafase: Se produce la unión de los cromosomas al huso mitótico a través de una estructura proteica denominada cinetócoro.

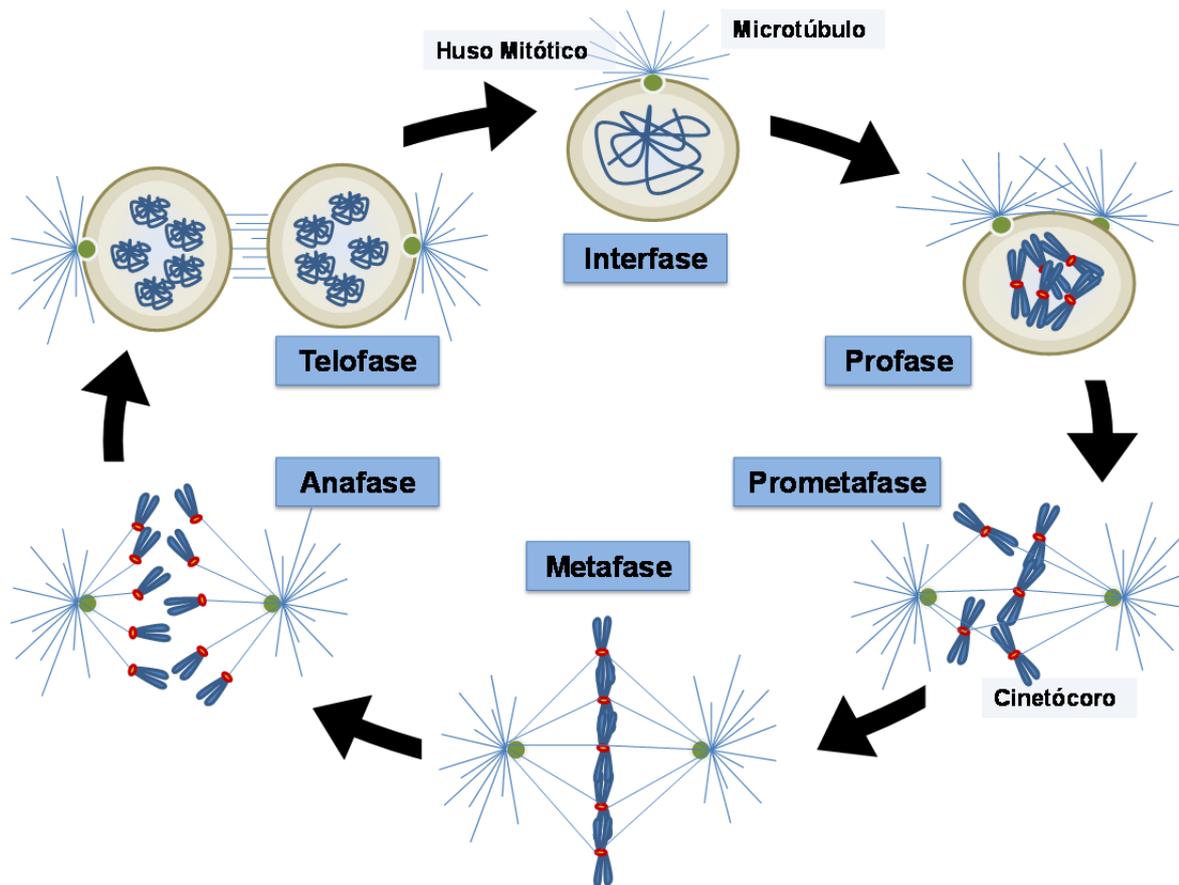
Metafase: Comprende la finalización de la unión de los cromosomas al huso mitótico y su alineación formando la placa metafásica y termina con la rápida separación de las cromátidas hermanas que comenzarán a segregarse hacia los extremos del huso mitótico.

Anafase: Se produce la segregación de las cromátidas hermanas hacia los extremos opuestos del huso mitótico y la posterior elongación del propio huso mitótico.

Telofase: Una vez las cromátidas se encuentran en los extremos del huso mitótico, comienza la descondensación de los cromosomas, se reconstituye la membrana nuclear y se desensambla el huso mitótico.

Citocinesis: Se produce la separación física de las dos células hijas.

El conjunto de eventos que controlan el correcto desarrollo de la fase G2 y la mitosis se encuentra regulado por la actuación concertada de CDKs y otras quinasas como Polo, Aurora o quinasas de la familia NIMA (Nigg 2001). El proceso se encuentra coordinado a través del reclutamiento de una quinasa a un sustrato tras su fosforilación por la quinasa que le precede. La actividad de estas quinasas es opuesta a la realizada por las fosfatasa, y es el equilibrio entre la actividad de ambas lo que controla el avance a través de las diferentes fases de la mitosis (Nigg 2001).



**Figura 5. Esquema general de la mitosis en mamíferos.** Figura adaptada de (Verdaasdonk and Bloom 2011).

La quinasa que participa principalmente en la regulación de las fases de la mitosis es la **CDK1** (34 KDa) y su componente regulador, la **ciclina B1** (62 KDa). Así, la transición G2/M se inicia cuando se produce la defosforilación, mediada por *cdc25c*, de dos residuos presentes en la CDK1. El complejo activo CDK1-ciclina B1 fosforila un gran número de sustratos que participan en eventos importantes en la mitosis como la rotura de la membrana nuclear, la separación del centrosoma, la formación del huso mitótico, la condensación de los cromosomas o la fragmentación del aparato de Golgi. Además, regula la actividad del complejo APC/C, cuya principal función es asegurar la correcta segregación de los cromosomas y coordinar la mitosis y citocinesis a través de su capacidad de ubiquitinación de sustratos específicos que luego son degradados por el sistema ubiquitina-proteasoma. Esto asegura, por ejemplo, la degradación de inhibidores de la anafase, como securinas y ciclina B1. Finalmente, tras la degradación de las ciclinas, se procede a la inactivación de la CDK1, proceso que precede la salida de

la mitosis y la citocinesis. Además la inactivación de la CDK1 permite la formación, de nuevo, de los complejos de iniciación situados en los orígenes de replicación, permitiendo que se pueda producir la siguiente replicación del ADN.

Por tanto, los niveles de ciclina B1 se encuentran estrictamente controlados tanto espacial como temporalmente durante la progresión del ciclo celular. Así, desde un **punto de vista temporal**, los niveles proteicos de ciclina B1 se van acumulando durante la fase S, lo cual permite el paso a la fase G2/M, en la que alcanza un pico de expresión y baja de nuevo al inicio de la anafase (Holloway, Glotzer et al. 1993; Clute and Pines 1999). La degradación de la ciclina B1 y la securina se produce justo cuando el último cinetócoro se ha unido al huso mitótico (finaliza un punto de control) y permite el inicio de la anafase y la citocinesis (Clute and Pines 1999; Hagting, Den Elzen et al. 2002). Como se ha comentado anteriormente, tanto la acumulación de ciclina B1 durante la fase S como su degradación posterior son procesos necesarios para la transición hacia la Fase G2/M como la salida de la mitosis, respectivamente. Por otro lado, desde el **punto de vista espacial**, la ciclina B1 se transloca desde el citoplasma al núcleo mediante procesos de fosforilación (Li, Meyer et al. 1997; Hagting, Jackman et al. 1999).

### 3. Ciclina B1

Con motivo del estudio de la ciclina B1 en la presente tesis, a continuación dedicamos un apartado centrado en su papel como regulador esencial del ciclo celular y miembro clave en la patofisiología de las enfermedades hiperproliferativas, y en concreto, en la enfermedad reestenótica.

Las ciclinas tipo B forman parte de una gran familia de proteínas cuyas diferencias residen en su especificidad de interacción con otras proteínas reguladoras de ciclo celular y su localización subcelular. En eucariotas superiores se han encontrado 5 tipos de ciclina B (B1-B5), de las cuales las ciclinas B1 a B3 se expresan en todos ellos, mientras que las ciclinas B4 y B5 se han identificado únicamente en oocitos, huevos y embriones de anfibios (Hochegger, Klotzbucher et

al. 2001). Todas las ciclinas tipo B interaccionan y activan la subunidad catalítica, CDK1, sin embargo la localización subcelular difiere entre ellas. Mientras que la ciclina B1 se encuentra asociada a los microtúbulos citoplasmáticos y se transloca al núcleo para iniciar la mitosis celular (Jackman, Firth et al. 1995), la ciclina B2 se localiza en el aparato de Golgi y la ciclina B3 en el nucleoplasma durante todo el ciclo celular (Gallant and Nigg 1994; Jackman, Firth et al. 1995). La función de la ciclina B2 y B3 no es clara. Mientras que la delección de la ciclina B2 en ratón no supone problemas de viabilidad, fertilidad o desarrollo, la delección de la ciclina B1 es letal para el embrión, demostrando que la ciclina B1 es capaz de compensar la ausencia de la ciclina B2 y es esencial para la correcta progresión del ciclo celular (Santamaria and Ortega 2006). La ciclina B1 es por tanto, junto con la ciclina A (Kalaszczynska, Geng et al. 2009), esencial en la correcta progresión del ciclo celular.

### **3.1. Regulación de la ciclina B1**

La proteína ciclina B1, codificada por el gen *CCNB1*, se comienza a detectar justo tras la replicación del material genético e incrementa su nivel en el citoplasma conforme avanza la fase G2. La expresión de ciclina B1 no se produce únicamente a nivel proteico, pues los niveles de ARN mensajero (ARNm) también cambian (Morgan 1995; Trembley, Ebbert et al. 1996), de modo que su regulación se produce tanto a nivel transcripcional como a nivel de la estabilidad del transcrito (Maity, McKenna et al. 1995; Piaggio, Farina et al. 1995). Por otro lado, como se ha explicado anteriormente, la degradación proteica de la ciclina B1 por el proteasoma, tras su ubiquitinalización por el complejo APC/C, es esencial para el avance desde la metafase a la anafase y la citocinesis.

### 3.1.1 Regulación transcripcional

La región promotora del gen *CCNB1* presenta secuencias consenso de unión para varios factores de transcripción y otras proteínas reguladoras (Trembley, Chen et al. 2000). La región promotora del gen *CCNB1* presenta dos inicios de transcripción alternativos que producen dos transcritos distintos que difieren en tamaño (en 65 pb) (Hwang, McKenna et al. 1998). El transcrito de mayor tamaño se expresa de manera constitutiva a niveles bajos durante el ciclo celular y aumenta cuando la célula entra en un estado de ayuno por depleción de suero (Piaggio, Farina et al. 1995). La función de este transcrito aún es desconocida.

Por el contrario, la regulación y función del transcrito de menor tamaño ha sido objeto de numerosos estudios (Porter and Donoghue 2003). La regulación de la expresión del ARNm de menor tamaño se encuentra controlada por diferentes elementos reguladores y factores de transcripción, que serán detallados a continuación:

#### 3.1.1.1 Nuclear Factor-Y (NF-Y, Véase Introducción, Apartado 4)

El promotor del gen *CCNB1* contiene dos secuencias consenso de unión, cajas CCAAT, para el factor de transcripción NF-Y localizadas en las posiciones -17/-13 y +16/+20 respecto al inicio de transcripción (+1). Ensayos de mutagénesis dirigida han permitido demostrar que ambas secuencias consenso, a través de la unión de NF-Y, son necesarias para la correcta actividad promotora del gen de la ciclina B1 (Farina, Manni et al. 1999). NF-Y participa en la inducción de la expresión de la ciclina B1 que se produce durante la fase S del ciclo celular tras la activación por los complejos CDK4-ciclina D1 o CDK2-ciclina E o A (Katula, Wright et al. 1997). Por otro lado, su actividad también controla la transcripción del gen de la ciclina B1 durante la fase de mitosis (Sciortino, Gurtner et al. 2001), actuando de forma cooperativa con el co-activador p300 (Wasner, Tschop et al. 2003). La unión de NF-Y al promotor favorece la unión de la ARN polimerasa-I, modulando la actividad transcripcional del gen y por tanto el avance correcto del ciclo celular (Sciortino, Gurtner et al. 2001).

### 3.1.1.2 E-Box

El motivo E-box, CACGTC, presente en el promotor del gen *CCNB1* es reconocido por diversos factores de transcripción, como *c-Myc*, TFE3 (del inglés “*Transcription Factor E3*”) o USF (del inglés “*Ubiquitous Upstream Factor*”). Estudios previos han demostrado la unión del protooncogen *c-Myc* tanto en ensayos *in vitro* (Yin, Grove et al. 2001) como *in vivo* (Menssen and Hermeking 2002), actuando como un regulador positivo de la expresión del gen causante de la inhibición de la formación del huso mitótico y la generación de células tetraploides (Yin, Grove et al. 2001). La activación transcripcional del gen *CCNB1* dependiente de *c-Myc* requiere de la activación previa del factor de transcripción por parte del regulador del ciclo celular CDK5 (Seo, Kim et al. 2008). Por otro lado, Cogswell y colaboradores sugieren que el factor de transcripción USF juega un papel importante en la regulación de la expresión de ciclina B1 durante la fase G2/M del ciclo celular (Cogswell, Godlevski et al. 1995).

Otros estudios han demostrado que el motivo E-Box participa también en la regulación negativa de la actividad transcripcional del promotor de *CCNB1*. Farina y colaboradores sugieren que el factor de transcripción Max inhibe la transcripción del gen de *CCNB1* en células quiescentes a través de su unión con el motivo E-Box (Farina, Gaetano et al. 1996). En el mismo sentido, la unión al motivo E-Box del factor de transcripción MXI1 inhibe la expresión de la ciclina B1 en células tumorales (Manni, Tunci et al. 2002).

### 3.1.1.3 FoxM1

La expresión del factor de transcripción “*Forkhead*” FoxM1 está íntimamente vinculado a la fase del ciclo celular y su actividad se ha asociado con el control de la mitosis y de la estabilidad cromosómica a través de la regulación de la expresión de la ciclina B1 y de la proteína CENP-F (Laoukili, Kooistra et al. 2005). Así, su sobreexpresión aumenta los niveles de ciclina B1 en células tumorales (Leung, Lin et al. 2001) y se asocia con el desarrollo y progresión del cáncer de cérvix (Chan, Yu et al. 2008).

#### 3.1.1.4 p53

El supresor tumoral p53 se ha asociado íntimamente con la regulación negativa de la expresión de la ciclina B1. Innocente y colaboradores demostraron que p53 controla el inicio de la mitosis a través de la regulación de la expresión de la ciclina B1 (Innocente, Abrahamson et al. 1999), inhibiendo la activación de la transcripción dependiente c-Myc (Yin, Grove et al. 2001). Estos resultados fueron corroborados posteriormente por Krauss y colaboradores que muestran la represión transcripcional no directa del gen *CCNB1* mediada por p53 (Krause, Wasner et al. 2000). El mecanismo propuesto que explica esta actividad de p53 es controvertido, pues se ha propuesto que la inactivación de NF-Y juega un papel importante en la reducción de la actividad promotora del gen de la ciclina B1 en células en senescencia y tras arresto del ciclo celular en fase G2 (Jung, Yun et al. 2001; Manni, Mazzaro et al. 2001). Sin embargo, Innocente y colaboradores sugieren la inactivación del factor de transcripción SP1 como responsable de la actividad inhibidora de p53 (Innocente and Lee 2005).

#### 3.1.1.5 CHR y CDE

Los motivos CHD (del inglés "Cell-Cycle Homology Region") y CDE (del inglés "Cell-Cycle-Dependent Element") controlan la expresión de diferentes genes reguladores de la fase G2 del ciclo celular. Estas secuencias controlan la expresión de la ciclina B a lo largo del ciclo celular, bloqueando su expresión en las fases G0 y G1, permitiendo su expresión en Fase S y alcanzando su máximo en fase G2. La regulación negativa controlada por los motivos CHR y CDE requiere de la cooperación con cajas CCAAT, controladas por NF-Y, que regulan la activación de la expresión del gen. Así, los genes regulados por motivos CHR y CDE presentan 2 o 3 cajas CCAAT en regiones cercanas, permitiendo la regulación de la expresión del gen dependiente de la fase del ciclo celular. Las ciclinas B1 y B2, a diferencia de otros reguladores del ciclo celular, se encuentran regulados únicamente por motivos CHR y no CDE (Muller and Engeland 2010).

### 3.1.1.6 Otros reguladores

El factor de transcripción E2F, ligado al control de la expresión de genes reguladores de la fase G1 y G2 del ciclo celular, participa en la regulación de la expresión de la ciclina B1, tanto positiva, dependiente de una caja CCAAT, como negativa, dependiente de una caja CHR (Zhu, Giangrande et al. 2004). Otros factores de transcripción como YB-1 ("Y-Box 1"), c-Myb, B-Myb, Nkx2-1 ("Nk2 homeobox") o STOX1A regulan positivamente la expresión de la ciclina B1 (Jurchott, Bergmann et al. 2003; Nakata, Shetzline et al. 2007; Pilkinton, Sandoval et al. 2007; Abel, Abdul-Hamid et al. 2012; Tagne, Gupta et al. 2012), mientras que el inhibidor del ciclo celular p21<sup>Cip1</sup> actúa como mediador en la regulación negativa de la ciclina B1 y de la proliferación celular, por el inhibidor de la actividad deacetilasa de histonas, butirato, estudiado en el tratamiento de diversos cánceres humanos por su capacidad inhibidora de la proliferación celular (Archer, Johnson et al. 2005).

### 3.1.2 Estabilidad del ARNm

La vida media del ARNm de la ciclina B1 juega un papel importante en la regulación de sus niveles proteicos en las diferentes fases del ciclo celular. Así, los primeros estudios demostraron que durante el avance del ciclo celular la vida media del mensajero cambiaba, alcanzando su máximo de estabilidad durante la fase G2 y disminuyendo tras sufrir la célula daño en el ADN (Trembley, Kren et al. 1994; Maity, McKenna et al. 1995; Maity, McKenna et al. 1997). Posteriormente, Wang y colaboradores demostraron que la proteína HuR, a través de su unión al ARNm de la ciclina B1 y A, es responsable de su estabilización (Wang, Caldwell et al. 2000). HuR se une a la región no traducible del extremo 3' del mensajero estabilizándolo, pues su sobreexpresión permite aumentar su vida media (Fan and Steitz 1998).

### **3.1.3 Regulación traduccional**

Pese a que el aumento de la actividad traduccional del ARNm de la ciclina B1 no parece presentar un papel relevante en células somáticas, sí está íntimamente implicado en la oogénesis y desarrollo de organismos vertebrados e invertebrados. Así, en peces y anfibios, excepto *Xenopus*, la ciclina B1 no se detecta en oocitos inmaduros, mientras que se expresa durante su maduración mediante un mecanismo dependiente de la activación traduccional de los ARNm (Nagahama and Yamashita 2008; Yasuda, Kotani et al. 2010).

### **3.1.4 Regulación post-traduccional**

#### **3.1.4.1 Estabilidad proteica de la ciclina B1**

Los niveles proteicos de las ciclinas se regulan por degradación dependiente de los sistemas APC/C y SCF (Reed 2003). En el caso concreto de la ciclina B1, su degradación, junto con el de la securina, se produce justo cuando las cromátidas se han unido correctamente al huso mitótico permitiendo la continuación de la mitosis. Ambas proteínas son substrato del complejo APC/C unido al coactivador *cdc20*, siendo degradadas al mismo tiempo, justo cuando el último cinetócoro se une al huso mitótico (Clute and Pines 1999; Hagting, Den Elzen et al. 2002). Interesantemente, la proteólisis de la ciclina B1 se regula a nivel espacial, pues su degradación requiere su translocación al huso mitótico, donde se encuentra el complejo APC/C (Pines 2006).

#### **3.1.4.2 Fosforilación de la ciclina B1**

La fosforilación de la ciclina B1 juega un papel importante en la translocación de la proteína entre el citoplasma y el núcleo. Li y colaboradores demostraron que la ciclina B1 presenta 5 sitios de fosforilación esenciales para la activación de la proteína que permiten su translocación al núcleo durante la profase (Li, Meyer et al. 1997; Hagting, Jackman et al. 1999). Pese a que inicialmente se demostró que la fosforilación de la ciclina B1 no se veía implicada en la regulación de su interacción

con CDK1 o en la función del complejo CDK1-ciclina B1 (Li, Meyer et al. 1997; Hagting, Jackman et al. 1999), recientemente se ha descrito su participación en la activación temprana en el citoplasma del complejo CDK1-ciclina B1 (Peter, Le Peuch et al. 2002).

### **3.2. Ciclina B1 en enfermedades hiper-proliferativas**

El crecimiento celular incontrolado de las células es una característica propia de diversas patologías tales como el cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas, fibrosis o enfermedad cardiovascular. Como regulador del ciclo celular, la ciclina B1 se ha convertido tanto en diana como marcador pronóstico de las enfermedades que cursan con alteraciones de la proliferación celular.

#### **3.2.1 *Papel de la ciclina B1 en cáncer***

Las ciclinas, como reguladores positivos del ciclo celular, se encuentran normalmente sobreexpresadas en diferentes tipos de cánceres. La expresión descontrolada de la ciclina B1 es una característica distintiva de muchos tipos de tumores, siendo considerada por los patólogos como un marcador pronóstico de su malignidad. Desde 1997, cuando se reportó por primera vez la producción de anticuerpos frente a la ciclina B1 en pacientes que sufrían carcinoma hepatocelular (Covini, Chan et al. 1997), la sobreexpresión de la ciclina B1 y la respuesta inmunológica frente a ella ha sido descrita en numerosos tipos de cánceres, como cáncer de próstata, pecho, colorectal, pulmón y carcinoma hepatocelular (Koziol, Zhang et al. 2003; Suzuki, Graziano et al. 2005). Así, la presencia de anticuerpos séricos frente a la ciclina B1 es un marcador clásico del desarrollo tumoral en pacientes afectados por los cánceres anteriormente mencionados (Koziol, Zhang et al. 2003).

Los niveles de ciclina B1 se encuentran fuertemente controlados en condiciones homeostáticas y su desregulación se asocia con alteraciones del ciclo celular, contenido génico de las células y, en consecuencia, con el desarrollo de diversas patologías. Ensayos funcionales basados en la expresión ectópica de la ciclina B1 han demostrado la generación de aberraciones cromosómicas durante la

división celular debido a una incorrecta formación del huso mitótico (Yin, Grove et al. 2001; Sarafan-Vasseur, Lamy et al. 2002; Deng, Tsao et al. 2011), características celulares asociadas a las células tumorales donde se haya sobreexpresada (Rassool, North et al. 2003). Por el contrario, una reducción de los niveles de ciclina B1 en células cancerosas conlleva una reducción en la inestabilidad cromosómica (Deng, Tsao et al. 2011).

La sobreexpresión de la ciclina B1 en células procedentes de carcinoma esofágico de células escamosas aumenta su capacidad proliferativa e invasiva y su actividad metastásica *in vivo* (Song, Zhao et al. 2008). Por el contrario, la inhibición de la expresión de ciclina B1 mediada por la transducción transitoria de un ARNi (ARN de interferencia) específico, conduce al bloqueo de la proliferación celular al detener las células en la fase G2/M, induce la muerte de la célula por apoptosis y sensibiliza a la célula frente al tratamiento con fármacos citolíticos como el taxol (Yuan, Yan et al. 2004; Yuan, Kramer et al. 2006; Androic, Kramer et al. 2008). Además, la inhibición de la expresión de la ciclina B1 de forma específica en células tumorales, mediante la administración de un ARNi ligado al péptido MPG-8, ha permitido reducir significativamente la formación de tumores en un modelo murino de tumor inducido con células humanas de cáncer de próstata (Crombez, Morris et al. 2009).

### **3.2.2 Papel de la ciclina B1 en la enfermedad vasculo-proliferativa**

El estudio de la ciclina B1 en el contexto de la enfermedad cardiovascular se ha centrado principalmente en su papel en el desarrollo de la reestenosis, patología en la que la proliferación juega un papel esencial. Braun-Dullaeus y colaboradores demostraron que la ciclina B1, junto con otras ciclinas, se inducen tras daño vascular en un modelo de angioplastia con balón en arteria carótida de rata (Braun-Dullaeus, Mann et al. 2001). Esta inducción, observada a nivel proteico, se vio bloqueada cuando se trató con inhibidores de la ruta PI3 quinasa, rapamicina o wortmanina, moléculas implicadas en el bloqueo de la proliferación celular (Braun-Dullaeus, Mann et al. 2001). Ensayos de terapia génica basada en el uso oligodeoxinucleótidos antisentido (ODNs, del inglés "OligoDeoxyNucleotides")

específicos frente a la ciclina B1 o su quinasa CDK1 demostraron su papel en el desarrollo de la neoíntima tras daño mecánico, de modo que el bloqueo individual de la expresión de la ciclina B1 o CDK1 produjo una reducción parcial pero significativa de la lesión neoíntima, mientras que el bloqueo de ambas proteínas se asoció con una inhibición prácticamente total de la misma (Morishita, Gibbons et al. 1994).

El tratamiento con drogas antiproliferativas, tales como la mitomicina, el 2-metoxiestradiol, el paclitaxel o el butirato, también ha demostrado un efecto inhibitorio de la hiperplasia de la íntima en modelos de daño mecánico y una correlación con una reducción de los niveles de reguladores del ciclo celular, incluyendo la ciclina B1 (Ranganna, Yousefipour et al. 2003; Granada, Ensenat et al. 2005; Barchiesi, Jackson et al. 2006; Blagosklonny, Demidenko et al. 2006). En el mismo sentido, el análisis de la expresión génica mediante microarrays en CMLVs de arteria coronaria humana tras un tratamiento con estatinas, asociadas con la inhibición de la proliferación celular, demostró una supresión total de los niveles de ciclina B1 (Morikawa, Takabe et al. 2004). Por el contrario, el tratamiento con otras moléculas reguladoras como la angiotensina-II, la vasopresina arginina, la progesterona (Lee, Harder et al. 1997; Fujita, Furukawa et al. 1999) o factores de riesgo de enfermedad cardiovascular como la hipertensión arterial (Tanner, Greutert et al. 2003) no modificaron los niveles de la ciclina B1. Interesantemente, Tanner y colaboradores demostraron que la hipertensión arterial induce una mayor proliferación de CMLVs a través de una mayor actividad del complejo CDK1-ciclina B1 sin modificar los niveles totales de ciclina B1 (Tanner, Greutert et al. 2003). Por otro lado, la poliploidía característica de las CMLVs en condiciones de hipertensión se asocia con fallos en el punto de control del huso mitótico por sobreexpresión de la proteína Cks1 e inhibición de la expresión de ciclina B1 (Hixon, Obejero-Paz et al. 2000).

## 4. NF-Y

Con motivo del estudio del factor de transcripción NF-Y en la presente tesis, a continuación dedicamos un apartado centrado en su papel como regulador transcripcional del ciclo celular.

### 4.1. Generalidades

El factor de transcripción NF-Y es una proteína heterotrimérica ubicua que participa en la regulación de una gran variedad de genes eucariotas. Se trata de una proteína muy conservada en organismos eucariotas cuyos genes han sido clonados y caracterizados en diversos mamíferos, levaduras o plantas (Hooft van Huijsduijnen, Li et al. 1990; Serra, Zemzoumi et al. 1998). NF-Y, también conocido como CBF (del inglés “CCAAT Binding Factor”) o CP1 (del inglés “CCAAT Binding Protein-1”), se encuentra formado por 3 subunidades: NF-YA (CBF-B, HAP2 en levaduras), NF-YB (CBF-A, HAP3 en levaduras) y NF-YC (CBF-C, HAP5 en levaduras), todas requeridas para una correcta unión al ADN (McNabb, Xing et al. 1995; Sinha, Maity et al. 1995). NF-Y, junto con otros factores de transcripción como CTF/NF1 (del inglés “CCAAT Transcription Factor/Nuclear Factor 1”), C/EBP (del inglés “CCAAT/Enhancer Binding Protein”), y CDP (del inglés “CCAAT Displacement Protein”), se une de manera específica a la secuencia de pentanucleótidos CCAAT, en sentido o antisentido (Mantovani 1999). A diferencia de otros factores de transcripción capaces de unirse a la secuencia CCAAT, NF-Y requiere de la secuencia CCAAT intacta para una correcta actividad de unión a ADN (Bi, Wu et al. 1997; Mantovani 1998), mientras que las secuencias adyacentes al elemento CCAAT son importantes para una actividad óptima del factor (Mantovani 1999). Mediante el uso de la técnica ChIp-on-chip, que combina la técnica de inmunoprecipitación de cromatina y la hibridación en microarrays para analizar *in vivo* la unión de proteínas a ADN a nivel de todo el genoma, se identificó a NF-Y como el principal factor de transcripción de unión para la caja CCAAT (Testa, Donati et al. 2005; Ceribelli, Alcalay et al. 2006; Ceribelli, Dolfini et al. 2008).

## 4.2. Dominio de unión a ADN: CCAAT

Los primeros elementos de ADN identificados como reguladores de la transcripción de genes eucariotas se localizaron en regiones promotoras de genes transcritos por la ARN polimerasa II. Estos elementos, altamente conservados a lo largo de la evolución, incluyen las cajas TATA y CCAAT. La caja TATA es un elemento esencial en el núcleo del promotor que se localiza generalmente a -30 pb respecto al inicio de transcripción (+1) y que actúa principalmente durante el inicio de la transcripción, al reclutar la maquinaria encargada de la transcripción basal del gen. La caja CCAAT es un elemento regulador presente antes de la caja TATA (-60/200 pb respecto al inicio de la transcripción) (Bucher 1990; Roeder 1996). En 1990, el trabajo de Bucher y colaboradores identificó la caja CCAAT en aproximadamente un 30% de promotores eucariotas (de un total de 500) (Bucher 1990). Sin embargo, actualmente se han identificado más de 328 promotores que presentan un total de 484 cajas CCAAT funcionalmente activas (Dolfini, Zambelli et al. 2009). Aunque mayoritariamente se localizan en regiones cercanas al inicio de transcripción, existen evidencias de secuencias CCAAT funcionales a mayor distancia o incluso en regiones intergénicas (Testa, Donati et al. 2005; Dolfini, Zambelli et al. 2009).

## 4.3. Subunidades de NF-Y

### 4.3.1. NF-YA

La subunidad NF-YA es la responsable de las principales interacciones específicas de secuencia asociada al trímero, aunque el dominio tipo histona  $\alpha 1$  de la subunidad NF-YB también contribuye a la unión al ADN (Zemzoumi, Frontini et al. 1999). La subunidad NF-YA posee un dominio conservado dividido en dos partes: una de 20 aminoácidos en la región N-terminal (residuos 298-318) requerida para su interacción con el dímero NF-YB-NF-YC y una región C-terminal (residuos 266-282) requerida para su interacción con el ADN (Mantovani 1999). Ambos dominios forman hélices- $\alpha$  anfipáticas que se encuentran muy conservados a través de la evolución (Xing, Fikes et al. 1993) (**Figura 6**).

La expresión y actividad de la subunidad NF-YA se regula por diversos mecanismos a nivel transcripcional y post-traducciona. Uno de los niveles de regulación transcripcional de la proteína depende de un proceso de *splicing* alternativo del exón B, donde se encuentra el dominio de activación rico en glutaminas (Li, Hooft van Huijsduijnen et al. 1992). Li y colaboradores muestran en su trabajo que como resultado de este proceso de *splicing* se producen dos tipos de transcritos, uno corto y otro largo, que codifican para dos isoformas de NF-YA que difieren en 28 aminoácidos. Además, estas isoformas presentan una expresión diferencial en distintos tejidos y tipos celulares (Li, Hooft van Huijsduijnen et al. 1992). Este tipo de regulación por *splicing* alternativo dependiente de tejido se ha observado también en los genes de NF-YA en la planta *A. thaliana* (Edwards, Murray et al. 1998). Las isoformas de NF-YA presentan actividades biológicas que difieren según el tipo celular o el tejido donde se expresan. Así, la regulación de la actividad transcripcional del promotor CD10/NEP (del inglés "Neutral EndoPeptidase") se produce de forma dependiente de tejido y se ha asociado con una expresión diferencial de las isoformas de NF-YA en linfocitos o células epiteliales (Ishimaru, Mari et al. 1997). Por otro lado, en células madre hematopoyéticas, la subunidad corta de NF-YA se expresa durante los estadios en los que la célula madre mantiene su capacidad proliferativa y de auto-renovación, y se va perdiendo dando paso a la subunidad larga, durante la diferenciación a los distintos linajes hematopoyéticos (Grskovic, Chaivorapol et al. 2007).

Los niveles proteicos de la subunidad NF-YA varían en diferentes procesos celulares, tipos celulares y tejidos, regulando en cada caso la actividad de unión a ADN del factor. Así, los niveles proteicos de NF-YA son altos en la fase G1, aumentan durante la fase S y descienden en la fase G2/M (Bolognese, Wasner et al. 1999). Por otro lado, su expresión se reduce tras privación de suero en fibroblastos humanos (Chang and Liu 1994), aumenta durante la diferenciación de monocitos a macrófagos humanos (Marziali, Perrotti et al. 1997) o desaparece durante la diferenciación de mioblastos C2C12 a miotubos (Gurtner, Manni et al. 2003; Gurtner, Fuschi et al. 2008). Cabe destacar que los niveles de NF-YA disminuyen durante la entrada de la célula en senescencia, proceso que se caracteriza por pérdida de capacidad de división celular (Matuoka and Chen 2000). Manteniéndose los niveles de ARNm constantes (Bolognese, Wasner et al. 1999;

Farina, Manni et al. 1999), esta regulación de los niveles de NF-YA se produce a nivel post-traducciona l a través de la degradación controlada de la proteína por procesos de acetilación y ubiquitilación (Manni, Caretti et al. 2008). Interesantemente, Yun y colaboradores demostraron que durante el avance del ciclo celular, el complejo CDK2-ciclina A la subunidad NF-YA fosforila en dos residuos de serina permitiendo su interacción con el dímero NF-YB-NF-YC y facilitando la transactivación de los genes regulados por NF-Y (Yun, Chae et al. 2003; Chae, Yun et al. 2004). Este proceso está inhibido por el supresor tumoral p53 impidiendo el avance del ciclo celular a través del punto de control en fase G2 tras daño en el ADN (Yun, Chae et al. 2003; Yun, Park et al. 2006).

Por último, otro sistema de control de la actividad de NF-Y depende de la translocación de la subunidad NF-YA desde el citoplasma al núcleo, donde realiza su función de transactivación a través de su interacción con el dímero NF-YB-NF-YC. Alabert y colaboradores demostraron que el tratamiento con TGF- $\beta$  (del inglés "*Transforming Growth Factor- $\beta$* ") induce la entrada de NF-YA al interior del núcleo por mecanismos dependientes de ERK (del inglés "*Extracellular Signal-Regulated*") o de MAP (del inglés "*Mitogen Activated Protein*") quinasa p38 (Alabert, Rogers et al. 2006). En oposición a este trabajo, Frontini y colaboradores establecen que NF-YA y NF-YB son proteínas principalmente nucleares, mientras que la subunidad NF-YC se transporta entre el núcleo y el citoplasma de forma dependiente del ciclo celular (Frontini, Imbriano et al. 2004).

#### **4.3.2. NF-YB y NF-YC**

El análisis de la homología de la secuencia de las subunidades NF-YB y NF-YC reveló su similitud estructural con la familia de proteínas portadoras de un motivo tipo histona (Baxevanis, Arents et al. 1995). Las proteínas tipo histona poseen un elemento estructural secundario de 65 aminoácidos muy conservado a lo largo de la evolución compuesto por 3-4 hélices  $\alpha$  separados por pequeños loops/strand (L1 y L2) que permiten la dimerización de las histonas y la formación de interacciones con el ADN no específicas de secuencia (Arents and Moudrianakis 1995; Luger, Rechsteiner et al. 1997). Más concretamente, el análisis de las

subunidades NF-YB y NF-YC reveló la existencia de un motivo muy conservado tipo histona ( $\alpha 1$  L1  $\alpha 2$  L2) y una hélice  $\alpha 3$ , con mayor variabilidad de secuencia (Arents and Moudrianakis 1995; Coustry, Maity et al. 1996; Mantovani 1999). La resolución de la estructura del dímero NF-YB-NF-YC reveló que el motivo tipo histona es similar al propio de las familias H2A/H2B y NC2 $\alpha$ /NC2 $\beta$ , aunque con características únicas del factor de transcripción NF-Y (Romier, Cocchiarella et al. 2003). Además, en el mismo estudio, se demostró que la interacción no específica de secuencia de NF-YB-NF-YC y del trímero completo muestra grandes similitudes con el factor de transcripción NC2 (**Figura 6**).

La formación del dímero NF-YB-NF-YC es esencial para la asociación de la subunidad NF-YA y la actividad de unión a ADN (Sinha, Maity et al. 1995; Kim, Sinha et al. 1996; Sinha, Kim et al. 1996). Sin embargo su función no se limita al mantenimiento estructural del trímero, pues la formación del dímero es necesaria para la correcta interacción de NF-Y con otros factores de transcripción como por ejemplo **TBP** (del inglés "*TATA-Binding Protein*") (Bellorini, Lee et al. 1997; Coustry, Sinha et al. 1998; Frontini, Imbriano et al. 2002), **p300** (Faniello, Bevilacqua et al. 1999), **myc** (Izumi, Molander et al. 2001; Romier, Cocchiarella et al. 2003), **p53** (Romier, Cocchiarella et al. 2003; Imbriano, Gnesutta et al. 2012) o **p73** (Hackzell, Uramoto et al. 2002), entre otros. Finalmente, y pese a que la subunidad NF-YA es la principal encargada de la especificidad de secuencia del trímero, el dímero NF-YB-NF-YC también juega un papel importante en el reconocimiento y unión a la caja CCAAT (Romier, Cocchiarella et al. 2003).

Como se ha comentado en el apartado anterior, la regulación de la actividad de unión a ADN depende mayoritariamente del control de los niveles proteicos de la subunidad A de NF-Y o de modificaciones post-traduccionales de la misma. Sin embargo, la expresión y localización de las subunidades NF-YB y NF-YC varía en distintos procesos biológicos.

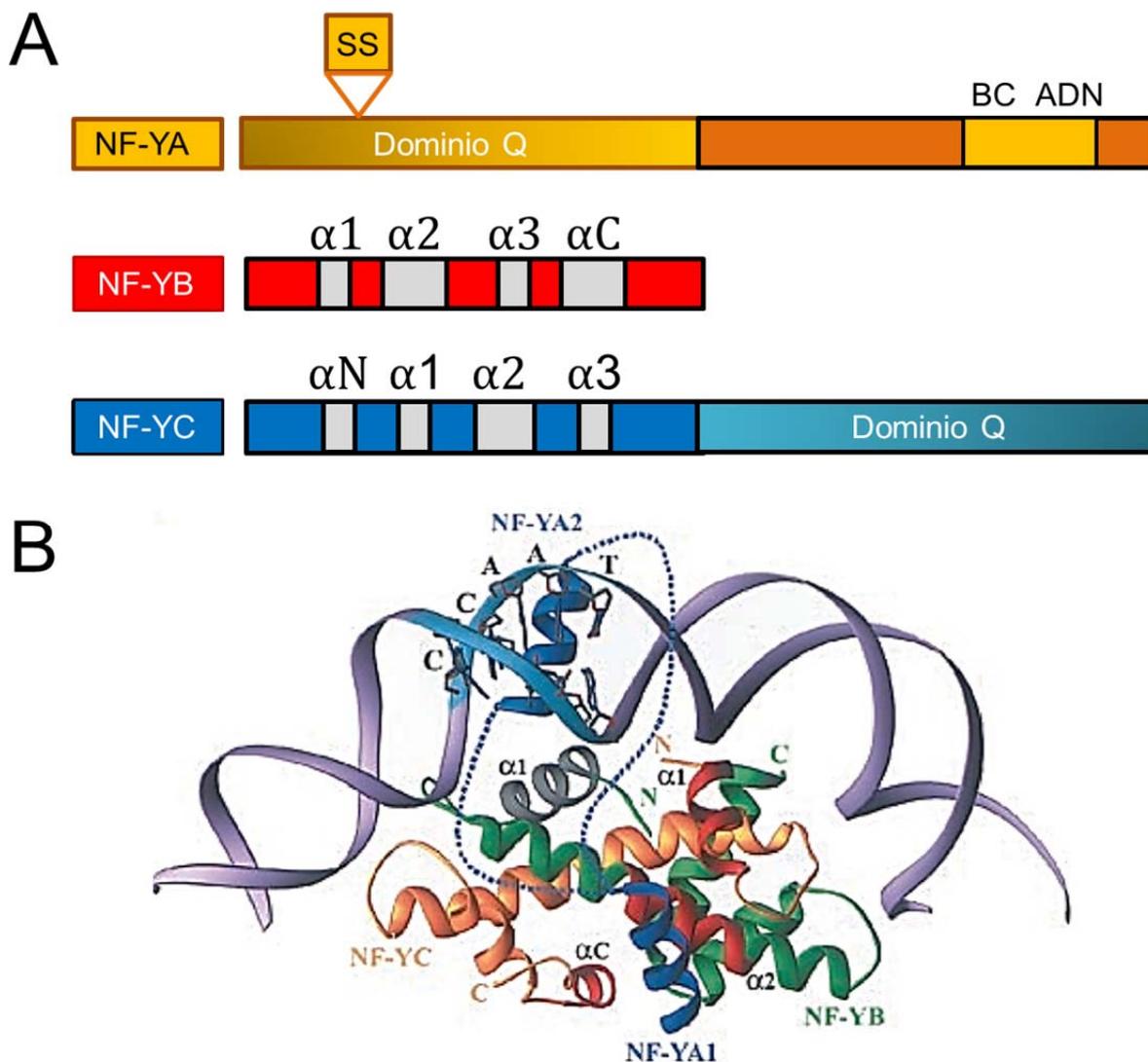
Como en el caso de NF-YA, Ceribelli y colaboradores identificaron 4 isoformas distintas de la subunidad NF-YC obtenidas por splicing alternativo de la región que contiene el dominio rico en cisteínas (Ceribelli, Benatti et al. 2009). Las isoformas mayoritarias, de 37 y 50 Kda, son exclusivas y se unen de manera diferencial a las

isoformas de la subunidad NF-YA, adquiriendo diferentes actividades transcripcionales. El gen NF-YC presenta un sistema de regulación adicional dependiente de dos regiones promotoras que generan dos transcritos distintos, uno asociado con la expresión basal del gen y otro con la respuesta a daño a ADN dependiente de p53 (Ceribelli, Benatti et al. 2009). Por otro lado, la translocación núcleo-citoplasma de la subunidad NF-YC se regula durante la progresión del ciclo celular, acumulándose en el núcleo al principio de la fase S (Frontini, Imbriano et al. 2004). En el caso de la subunidad NF-YB, recientemente se ha descrito que la reducción de su expresión por parte del microARN, miR-485-3p, disminuye la expresión de la ADN topoisomerasa-II y aumenta la sensibilidad de células cancerosas al tratamiento con drogas anti-proliferativas (Chen, He et al. 2011).

#### 4.4. Papel de NF-Y en la proliferación celular

NF-Y juega un papel fundamental en la regulación de la proliferación celular al participar en el control transcripcional de la expresión de numerosos genes reguladores del ciclo celular. Mediante el uso de técnicas bioinformáticas para el estudio de las secuencias reguladoras presentes en genes de ciclo celular y de los factores de transcripción con capacidad de unión a ellas, se ha identificado a NF-Y como el principal factor de transcripción asociado al control de la transcripción de genes reguladores de la fase G2 y fase de mitosis (Elkon, Linhart et al. 2003; Linhart, Elkon et al. 2005; Halperin, Linhart et al. 2009). Además numerosos trabajos han demostrado la implicación de NF-Y en el control positivo de la expresión basal e inducida de genes reguladores del ciclo celular, como la **ciclina A** (Huet, Rech et al. 1996; Plet, Huet et al. 1997; Chae, Kim et al. 2011), **ciclina B1** (Farina, Gaetano et al. 1996; Katula, Wright et al. 1997; Farina, Manni et al. 1999; Innocente, Abrahamson et al. 1999; Hu and Maity 2000; Krause, Wasner et al. 2000; Manni, Mazzaro et al. 2001; Sciortino, Gurtner et al. 2001; Gurtner, Manni et al. 2003; Wasner, Tschop et al. 2003; Zhu, Giangrande et al. 2004; Innocente and Lee 2005; Hu, Lu et al. 2006; Chae, Kim et al. 2011), **ciclina B2** (Bolognese, Wasner et al. 1999; Salsi, Caretti et al. 2003; Wasner, Haugwitz et al. 2003; Park, Yu et al. 2007; Wu, Zhang et al. 2010), **cdc2** (Zwicker, Lucibello et al. 1995; Liu, Yan et al. 1998; Kao, Tanimoto et al. 1999; Yun, Chae et al. 1999; Chae, Kim et al. 2011), **cdc25** (Zwicker, Gross et al. 1995; Zwicker, Lucibello et al. 1995; Korner and

Muller 2000; Korner, Jerome et al. 2001; Chae, Kim et al. 2011; Dalvai, Mondesert et al. 2011), **p27<sup>Kip1</sup>** (Kamiyama, Inoue et al. 1999), **timidina quinasa** (Good and Chen 1996; Kim, Lau et al. 1997), **topoisomerasa-II** (Adachi, Nomoto et al. 2000; Lok, Lang et al. 2002), **PCNA** (del inglés "Proliferating Cell Nuclear Antigen") (Gatta and Mantovani 2011) o **CKS1** (del inglés "Cyclin-dependent Kinase-Subunit-1") (Rother, Li et al. 2007).



**Figura 6. Esquema y estructura de la proteína NF-Y.** SS: Sitio de *Splicing*; BC: Sitio de unión a las subunidades NF-YB y NF-YC; ADN: Sitio de unión a ADN. Dominio Q: Dominio de transactivación de ADN. Figura adaptada de (Mantovani 1999; Romier, Cocchiarella et al. 2003).

Cabe destacar que NF-Y participa íntimamente en la vía de respuesta a daño del ADN dependiente de p53, un supresor tumoral responsable del control de la integridad del genoma de la célula. Así, la interacción de NF-Y con p53, o con sus homólogos p63 y p73, supone la represión de la expresión de numerosos genes controlados por NF-Y, principalmente de la fase G2/M, en respuesta a condiciones de daño de ADN (Imbriano, Gnesutta et al. 2012). Interesantemente, la forma mutada de p53 presente en diferentes tipos de tumores interacciona con NF-Y e induce, en respuesta a daño de ADN, la expresión de ciclina A, B, CDK1 y *cdc25c* y la síntesis de ADN, provocando una regulación transcripcional descontrolada y la generación de aberraciones cromosómicas en la célula (Di Agostino, Strano et al. 2006). La participación de NF-Y en la regulación de la apoptosis celular no se limita solo a su asociación con p53 o sus homólogos, sino que interacciona directamente con otros factores de transcripción reguladores de la respuesta a estrés por hipoxia (HIF- $\alpha$ , *Hipoxia-Inducible Factor- $\alpha$* ), a choque térmico (HSF1, del inglés "*Heat Shock Factor protein 1*") o estrés del retículo endoplasmático (CHOP, del inglés "*CCAAT/Enhancer-Binding Protein Homologous Protein*"; XBP1, del inglés "*X-box Binding Protein 1*") (Gatta, Dolfini et al. 2011; Imbriano, Gnesutta et al. 2012).

El papel de NF-Y como regulador del ciclo celular se ha puesto de manifiesto mediante ensayos de ganancia y pérdida de función en modelos celulares y animales. Así, la delección global del gen NF-YA en ratón es letal, al detener el desarrollo del embrión en el estadio 8.5 dpc (Bhattacharya, Deng et al. 2003). En el mismo trabajo, sus autores demostraron que la ausencia de NF-YA en fibroblastos embrionarios inhibe la proliferación celular, al detener a la célula en Fase S, e induce posteriormente muerte por apoptosis. Resultados similares fueron obtenidos al sobreexpresar un mutante dominante negativo de la subunidad NF-YA cuya interacción con las subunidades NF-YB-NF-YC genera un trímero no activo (Mantovani, Li et al. 1994; Hu and Maity 2000). Posteriormente, el mismo grupo demostró que la sobreexpresión de este mutante dominante negativo produce la parada de las células en la fase G2/M al inhibir la expresión de genes esenciales para la correcta transición del ciclo celular, como la ciclina B1, aurora A o CDK1 (Hu, Lu et al. 2006). En estudios más recientes, Benatti y colaboradores analizaron el efecto sobre la proliferación celular de las subunidades formadoras del complejo

NF-Y, NF-YA y NF-YB, mediante la inhibición específica de la expresión con ARNi frente a estas proteínas (Benatti, Dolfini et al. 2011). Sorprendentemente, la inactivación de las subunidades produjo efectos distintos sobre el avance del ciclo celular y los genes expresados por la célula. Así pues, la inactivación de NF-YA produjo un retraso en la fase S, daño del ADN y posterior apoptosis. Por el contrario, la inactivación de la subunidad NF-YB dio lugar al arresto de la célula en la fase G2/M sin afectar al avance de la fase S del ciclo celular (Benatti, Dolfini et al. 2011).

NF-Y se ha vinculado también al control de la expresión de genes implicados en la autorenovación de células madre hematopoyéticas asociados como por ejemplo HOXB4, Nox1, LEF-1, etc. Zhu y colaboradores demostraron que la subunidad NF-YA se haya sobreexpresada en células madre hematopoyéticas y disminuye sus niveles durante su diferenciación (Zhu, Zhang et al. 2005). Además, la expresión ectópica de NF-YA en progenitores de médula ósea induce la expresión de HOXB4, Nox1, LEF-1 o de la ARN telomerasa, aumenta su capacidad de auto-renovación y disminuye su capacidad de diferenciación a los linajes celulares derivados de ellas (Zhu, Zhang et al. 2005). En este sentido, la sobreexpresión de una proteína de fusión TAT-NF-YA en células madre hematopoyéticas aumentó su capacidad de crecimiento y mantenimiento en condiciones de cultivo *in vitro*, así como su capacidad de repoblación de la médula ósea en un modelo de trasplante en animales irradiados letalmente (Domashenko, Danet-Desnoyers et al. 2010). Por el contrario, la inactivación condicional de NF-YA en células madre hematopoyéticas produce su acumulación en fase G2/M y posterior entrada en apoptosis, fallo hematopoyético y muerte del animal (Bungartz, Land et al. 2012). Recientemente, Luo y colaboradores demostraron que la delección de la subunidad NF-YA de forma específica en hepatocitos provoca una degradación progresiva del hígado tras 4 semanas después del nacimiento, así como diversas modificaciones celulares, como un aumento del tamaño celular, acumulación de lípidos, inducción de estrés del retículo endoplasmático, disfunción mitocondrial y defectos metabólicos (Luo, Klumpp et al. 2011).

#### 4.5. Papel de NF-Y en la enfermedad hiper-proliferativa

La importancia de NF-Y en el control de la proliferación celular convierte a este factor en una diana atractiva en el tratamiento de enfermedades cuya etiología cursa con hiperplasia celular anormal. Estudios computacionales que integran información de secuencias reguladoras, perfiles de expresión, rutas de transducción de señales o rutas metabólicas han identificado a NF-Y, junto con otros factores de transcripción como E2F, p53, NRF1 (del inglés “*Nuclear Respiratory Factor 1*”), ELK1 o YY1 (“*Ying Yang- 1*”), como elementos reguladores potenciales de las rutas asociadas a la patología tumoral que se correlacionan positivamente con el desarrollo, malignidad o invasividad de diferentes tipos de cánceres (Niida, Smith et al. 2008; Thomassen, Tan et al. 2008; Blum, Gupta et al. 2009; Goodarzi, Elemento et al. 2009; Yano 2012). En concordancia con estas aproximaciones *in silico*, estudios funcionales revelan una implicación de NF-Y como regulador transcripcional de diversos genes asociados a patologías de tipo tumoral como por ejemplo DEK (Sitwala, Adams et al. 2002), DDIT3 (Huang, Chuang et al. 2010) o C7orf24 (Ohno, Hattori et al. 2011). En el mismo sentido, el estudio del mecanismo de acción de diferentes fármacos anti-neoplásicos reveló una inhibición directa o indirecta de la actividad de unión a ADN de NF-Y. El mecanismo de acción de estos fármacos se basa en su capacidad de inhibir la proliferación celular y su actividad inmunosupresora como es el caso de la ecteinascidina-743 (Trabectedina o Yondelis™) (Minuzzo, Marchini et al. 2000; Allavena, Signorelli et al. 2005), los inhibidores de actividad deacetilasa de histonas, butirato y ácido hidroxámico suberoilánilida (SAHA) (Butler, Zhou et al. 2002; Lecona, Barrasa et al. 2008), la quercetina (Jeong, An et al. 2009) o el resveratrol (De Amicis, Giordano et al. 2011). Otros fármacos como la poliamida pirrolobenzodiacepina (GWL-78) inhiben la unión de NF-Y de manera muy específica, convirtiéndolos en buenos candidatos en el tratamiento de enfermedades hiperproliferativas basadas en una posible sobreexpresión o hiperactividad del complejo NF-Y (Kotecha, Kluza et al. 2008). Conjuntamente estos trabajos remarcan la importancia de NF-Y como diana putativa para el tratamiento de enfermedades cuya etiología se basa en una proliferación celular anormal.

## 5. Ciclo celular y reestenosis

La importancia de los reguladores del ciclo celular en el desarrollo de la lesión neointima tras daño mecánico se ha puesto de manifiesto gracias a estudios de análisis de su expresión y experimentos de terapia farmacológica y génica (Andres and Castro 2003; Andres 2004). Estudios en modelos animales de daño mecánico han demostrado que el proceso de formación de la lesión reestenótica, mediada principalmente por una excesiva actividad proliferativa de las CMLVs, se asociada con la expresión coordinada temporalmente y espacialmente de genes reguladores del ciclo celular (CDKs y ciclinas) (Abe, Zhou et al. 1994; Wei, Krasinski et al. 1997; Braun-Dullaeus, Mann et al. 2001). Estos trabajos demostraron también con una mayor actividad de CDK1 (*cdc2*) y CDK2 en la pared arterial sometida a daño mecánico (Abe, Zhou et al. 1994; Wei, Krasinski et al. 1997). Estos resultados fueron corroborados en muestras de lesiones reestenóticas humanas, que mostraron una fuerte inducción de la expresión de proteínas reguladoras del ciclo celular, sugiriendo la importancia de la proliferación celular en la etiopatología de esta enfermedad (Kearney, Pieczek et al. 1997; Wei, Krasinski et al. 1997; Braun-Dullaeus, Ziegler et al. 2003; O'Sullivan, Scott et al. 2003).

### 5.1. Reguladores positivos de la proliferación celular

La importancia de los reguladores del ciclo celular en el desarrollo de la lesión reestenótica se ha demostrado fehacientemente mediante el uso de inhibidores farmacológicos y experimentos de terapia génica. El uso de inhibidores específicos de la actividad CDK como la purina CVT-313 redujo en un 80% la formación de la lesión neointima en un modelo de angioplastia con balón en la carótida de rata (Brooks, Gray et al. 1997). Por otro lado, la administración oral de flavopiridol redujo significativamente la formación de la lesión neointima inducida por angioplastia (Ruef, Meshel et al. 1999). La acción antiproliferativa del flavopiridol redujo los niveles de expresión de los reguladores de las fases del ciclo celular G1 y G2/M, aumentó la expresión de los reguladores negativos p21<sup>Cip1</sup>, p27<sup>Kip1</sup> y p53, y bloqueó la fosforilación de pRB, reduciendo la proliferación y migración celular (Jaschke, Milz et al. 2004).

Existen numerosos ejemplos de **fármacos** cuyo efecto inhibitor tiene como diana el ciclo celular y su mecanismo de acción se ha asociado a la modificación de la expresión y actividad de reguladores positivos y negativos de la proliferación celular. Así, la aplicación de donantes de óxido nítrico, nitroprusiato sódico o S-Nitroso-N-acetilpenicilamina, redujo significativamente la proliferación de las CMLVs y la formación de la neoíntima a través del bloqueo de la actividad de CDK2 y la expresión de la ciclina A (Guo, Andres et al. 1998). De igual manera, el efecto inhibitor de la proliferación que ejerce la heparina se asocia con una reducción de los niveles de ciclina A y un aumento de la expresión de p27<sup>Kip1</sup> (Fasciano, Patel et al. 2005). Por otro lado, el inhibidor cilostazol, utilizado en pacientes diabéticos, disminuye la formación de la lesión reestenótica al reducir la expresión de ciclina A y PCNA a través de la inhibición de la actividad del factor de transcripción E2F (Kim, Park et al. 2005). El fármaco anti-alérgico tranilast posee un potente efecto anti-reestenótico posiblemente asociado a la reducción de la actividad de CDK2-ciclina E y CDK4-ciclina D1 por un aumento del inhibidor del ciclo celular, p21<sup>Cip1</sup> (Takahashi, Taniguchi et al. 1999; Izawa, Suzuki et al. 2001). De hecho, p21<sup>Cip1</sup> es esencial en el efecto inhibitor del tranilast, ya que este fármaco no redujo la lesión neoíntima en un ratón deficiente en p21<sup>Cip1</sup> (Sata, Takahashi et al. 2002). Otro ejemplo es el caso del fármaco anti-trombótico PCA-4230, el cual reduce de manera reversible la proliferación a través de la inhibición específica la vía ciclina D1/E2F1 (Goukassian, Sanz-Gonzalez et al. 2001). Finalmente, hay que destacar la rapamicina, un inhibidor de la vía mTOR que se usa en clínica para disminuir el desarrollo de la reestenosis (Andres and Castro 2003). Su acción anti-proliferativa ha sido demostrada en numerosos trabajos pre-clínicos y clínicos y se basa en el bloqueo del avance del ciclo celular a través de la inducción de los niveles del inhibidor del ciclo celular p27<sup>Kip1</sup> (Andres and Castro 2003).

Estudios de **terapia génica** basados en el uso ODNs han sido utilizados para la inhibición de CDKs y ciclinas en modelos animales de angioplastia con balón. El uso de ODNs permite el bloqueo de la expresión de un gen específico mediante hibridación con las regiones complementarias de su ARNm. En concreto, la utilización de ODNs frente a CDK2, CDK1 (*cdc2*) o ciclina B1 bloqueó la formación de la lesión neoíntima en modelos de angioplastia con balón en arteria carótida de rata (Morishita, Gibbons et al. 1993; Abe, Zhou et al. 1994; Morishita, Gibbons et al.

1994; Morishita, Gibbons et al. 1994). Sin embargo, el uso combinado de ODNs frente a CDK1 (*cdc2*) y PCNA no tuvo resultados positivos en un modelo de angioplastia en arteria coronaria de cerdo (Robinson, Chronos et al. 1997).

Otras estrategias de terapia génica se han basado en el uso de ribozimas, que son enzimas sintetizadas químicamente cuya acción permite la degradación específica del ARNm que codifica la proteína de interés. Así, la aplicación de ribozimas frente a la ciclina E o los factores de transcripción c-myb o E2F redujo significativamente la proliferación de CMLVs y la formación de la lesión neoíntima en modelos animales de lesión vascular por daño mecánico (Jarvis, Alby et al. 1996; Jarvis, Wincott et al. 1996; Macejak, Lin et al. 1999; Grassi, Grassi et al. 2001; Grassi, Schneider et al. 2005; Platz, Grassi et al. 2007).

Existen numerosos ejemplos de proteínas mitogénicas como los factores de crecimiento PDGF (del inglés "*Platelet-Derived Growth Factor*"), bFGF (del inglés "*basic Fibroblast Growth Factor*") o IGF-1 (del inglés "*Insulin-like Growth Factor-1*") los cuales inician la progresión del ciclo celular, al facilitar la superación del punto de control que regula la transición de la fase G1 a la fase S. Su activación depende de la interacción con receptores tirosina quinasa localizados en la superficie celular y la posterior transactivación de factores de transcripción, derivando en último término en la inducción de la expresión de los reguladores positivos del ciclo celular (Andres and Castro 2003; Andres 2004; Charron, Nili et al. 2006). Los factores de transcripción de la familia AP-1, c-myc, c-myb, E2F, egr-1, NFAT, SP1 o NR4A se inducen en respuesta a estos estímulos mitogénicos y son capaces de activar, y en otros casos, inhibir la respuesta proliferativa de las CMLVs (Andres and Castro 2003; Andres 2004; Charron, Nili et al. 2006). A continuación se describen algunos de los factores de crecimiento y transcripción más importantes en el contexto de la reestenosis.

Los **PDGFs** y sus **receptores** (PDGFRs) se han convertido en un prototipo de factores de crecimiento con función dependiente de receptores tirosina quinasa durante los últimos 20 años. El PDGF se asoció rápidamente a múltiples procesos patológicos de tipo vascular, como la aterosclerosis, reestenosis, hipertensión pulmonar, enfermedad de la retina, así como enfermedades fibróticas como la

cirrosis hepática, esclerodermia, glomerulosclerosis o fibrosis cardiaca y pulmonar (Andrae, Gallini et al. 2008).

Los mitógenos PDGF (A-D) y sus receptores, PDGFR- $\alpha$  y PDGFR- $\beta$ , se expresan a muy bajos niveles en los tipos celulares presentes en la pared de vasos normales, observándose una fuerte inducción durante la formación de la lesión vascular, tanto aterosclerótica como reestenótica (Raines 2004). La inducción de estas moléculas se ha asociado a diferentes parámetros y factores relacionados con la enfermedad cardiovascular, como la presión arterial y la estimulación  $\alpha$ -adrenérgica de la pared vascular (Majesky, Daemen et al. 1990; Negoro, Kanayama et al. 1995), la reducción del estrés endotelial generada por el flujo sanguíneo (Mondy, Lindner et al. 1997) o la hipercolesterolemia (Mondy, Lindner et al. 1997). La inducción de la proliferación y migración de las CMLVs de la íntima en respuesta a daño endotelial se produce como consecuencia de la liberación de diferentes moléculas mitogénicas e inflamatorias, que incluyen el PDGF, por parte de las plaquetas agregadas en la zona afectada (Andres and Castro 2003; Andres 2004). La importancia de PDGF en el desarrollo de la lesión neoíntima inducida tras el daño endotelial y la posterior respuesta inflamatoria se ha puesto de manifiesto en múltiples trabajos de ganancia y pérdida de función en modelos animales de daño arterial por cateterización con balón (Raines 2004). La administración de anticuerpos frente a PDGF (Ferns, Motani et al. 1991; Morrison, Sethi et al. 2001) o su receptor (Giese, Marjjanowski et al. 1999; Hart, Kraiss et al. 1999), antagonistas de PDGF-B (Leppanen, Janjic et al. 2000), o de inhibidores de la actividad quinasa de PDGFR (Banai, Wolf et al. 1998; Bilder, Wentz et al. 1999; Yamasaki, Miyoshi et al. 2001) reduce la acumulación de CMLVs de la neoíntima en diferentes modelos de daño mecánico vascular. Por el contrario, la administración de PDGF-BB (Jawien, Bowen-Pope et al. 1992) o la transfección local de un plásmido que codifica para PDGF-B (Nabel, Yang et al. 1993) indujo la proliferación de las CMLVs y el desarrollo de la hiperplasia de la íntima en modelos animales de daño arterial. Estudios con ratones quiméricos compuestos por células normales o deficientes para PDGFR-B demostraron también la importancia del eje PDGF/PDGFR en el desarrollo de neoíntima (Crosby, Seifert et al. 1998; Buetow, Tappan et al. 2003).

El **factor de crecimiento de fibroblastos básico, bFGF**, promueve también la estimulación de la proliferación de las CMLVs de la neoíntima y el posterior desarrollo de la lesión vascular. Su expresión en células endoteliales y CMLVs se induce tras la lesión, siendo un fuerte inductor de la proliferación y migración celular en sistemas *in vitro* y en modelos animales de daño vascular (Lindner, Lappi et al. 1991; Jackson, Raines et al. 1993). En este sentido, la administración de un quelante de  $Ca^{+2}$ , tetrathiomolibdato (TTM), que reduce la liberación de FGF1 (Mandinov, Mandinova et al. 2003), inhibe la formación de la lesión neoíntima en un modelo de angioplastia con balón en la arteria carótida de rata (Mandinov, Mandinova et al. 2003). La acción sinérgica de FGF2 y PDGF se ha sugerido en diversos trabajos (Sato, Hamanaka et al. 1991; Pickering, Uniyal et al. 1997; Rutherford, Martin et al. 1997), observándose un aumento de la expresión del receptor 1 de FGF en fibroblastos humanos en respuesta a PDGF, o la inducción de su actividad en diferentes procesos patológicos inducidos por PDGF-BB (Landgren, Eriksson et al. 1996).

Durante los últimos años, numerosos trabajos han demostrado la regulación del **factor de crecimiento insulínico, IGF**, y su receptor en respuesta a múltiples estímulos como factores de crecimiento, citoquinas, lipoproteínas, especies reactivas de oxígeno o fuerzas hemodinámicas que se asocian con el desarrollo de diferentes patologías vasculares. Tránscrios del factor de crecimiento IGF-1 y su receptor se inducen en CMLVs procedentes de arterias afectadas de reestenosis comparadas con arterias normales (Grant, Freemerman et al. 1996). Por el contrario, a nivel proteico, mientras que IGF-1 se ve inducido en la lesión neoíntima, la expresión de su receptor se encuentra inhibida (Khorsandi, Fagin et al. 1992). El estudio del papel de IGF-1 en modelos animales demostró que su sobreexpresión en ratones transgénicos induce la formación de la lesión neoíntima tras daño vascular (Zhu, Zhao et al. 2001). En contraposición, la sobreexpresión de un mutante de la forma inmadura de IGF-1, IGFBP-4, incapaz de ser procesado por proteasas específicas para la producción de IGF-1 funcional, induce hipotrofia de las CMLVs de la íntima (Zhang, Smith et al. 2002). El uso de inhibidores de IGF, como los análogos de la somatoestatina (octreótido) y angiopeptina reduce eficientemente la proliferación de CMLVs *in vitro* y la formación de la neoíntima en modelos animales (Lundergan, Foegh et al. 1989; Santoian, Schneider et al. 1993;

Bauters, Van Belle et al. 1994; Yumi, Fagin et al. 1997; Grimm, Spiecker et al. 2002). Sin embargo, el uso de angiopeptina en ensayos clínicos dio lugar a resultados contradictorios (Emanuelsson, Beatt et al. 1995; Eriksen, Amtorp et al. 1995), mientras que el tratamiento con octeótrido no supuso un beneficio para el paciente al no reducir el porcentaje de reestenosis o los eventos clínicos asociados (von Essen, Ostermaier et al. 1997).

Como hemos mencionado anteriormente, la inducción de la proliferación celular mediada por factores de crecimiento requiere la actividad de **factores nucleares** que regulan directamente la expresión de las proteínas reguladoras del ciclo celular. Uno de los principales ejemplos lo encontramos en los genes de inducción temprana, **c-fos** y **c-jun**, miembros de la **familia AP-1** (del inglés "Activator Protein-1"). La implicación de los miembros de la familia AP-1 en el desarrollo de la lesión reestenótica fue establecida por primera vez por Hu y colaboradores en el estudio del papel de las MAP quinasas en la regulación de la proliferación celular durante la evolución de la enfermedad vascular (Hu, Cheng et al. 1997). La rápida inducción y fosforilación de las quinasas ERK2 y JNK (del inglés "c-Jun N-terminal Kinase") tras daño mecánico en un modelo de angioplastia en arteria carótida de rata precedió a un aumento de la expresión de c-Jun y c-Fos y una inducción de la actividad AP-1. El bloqueo de esta inducción mediante estrategias de terapia génica basadas en el uso de *decoy* ODN frente a AP-1, redujo la proliferación y migración de las CMLVs inducida por diferentes estímulos mitogénicos, y el tamaño de la lesión en modelos de angioplastia en la arteria carótida de rata (Ahn, Morishita et al. 2002), de conejo (Kume, Komori et al. 2002) y en arteria coronaria de cerdo (Buchwald, Wagner et al. 2002). La técnica *decoy* ODN consiste en la liberación de ODN portadores de la secuencia diana consenso del factor de transcripción de interés, secuestrándolo y, por tanto, disminuyendo su capacidad de interacción con sus secuencias de unión a ADN localizadas en los genes diana. En concordancia con estos trabajos, la inactivación de la proteína c-Jun mediante la aplicación de deoxiribozimas específicos (molécula de ADN con función homóloga a los ribozimas) redujo la hiperplasia de la capa íntima tras angioplastia con balón, pero no tras implantación de *stent* en arteria carótida de conejo (Murrell, Khachigian et al. 2007).

La conexión entre los factores de transcripción de la familia **myc** y **myb** y la regulación del ciclo celular, así como su vinculación con el desarrollo de enfermedades de tipo hiperproliferativo, principalmente cáncer, ha sido extensamente estudiada durante los últimos 25 años (Soucek and Evan 2010; Zhou and Ness 2011). En el contexto de la enfermedad reestenótica, diversos trabajos han demostrado que la inhibición de los genes *c-myc* y *c-myb* reduce significativamente la proliferación de CMLVs y la formación de la lesión neointima en modelos animales de daño mecánico (Andres and Castro 2003; Andres 2004). En el caso específico de *c-myc*, el bloqueo de su expresión mediante la administración local de oligonucleótidos en anti-sentido o ARNi redujo significativamente la formación de lesión neointima en un modelo porcino de reestenosis (Kipshidze, Kim et al. 2002; Kipshidze, Iversen et al. 2004) y en un modelo de reestenosis en vena por trasplante (Wang, Liu et al. 2011), respectivamente. Sin embargo, su aplicación en ensayos clínicos no mostró resultados satisfactorios al no reducir el nivel de reestenosis tras implantación de *stent* coronario (Kutryk, Foley et al. 2002). La importancia del factor de transcripción *c-myb* como inductor del proceso reestenótico ha sido también demostrada en distintos trabajos mediante el uso de terapia génica (Burgess, Fisher et al. 1995; Villa, Guzman et al. 1995; Jarvis, Alby et al. 1996; Jarvis, Wincott et al. 1996; Macejak, Lin et al. 1999; Lambert, Malik et al. 2001) o de un modelo de expresión condicional y específica en CMLVs de un mutante dominante negativo de *c-myb* (You, Mungrue et al. 2003).

La familia de factores de transcripción **E2F** juega un papel muy importante en el control de la proliferación celular dependiente del regulador del ciclo celular pRb (Polager and Ginsberg 2008). La atenuación de la actividad de E2F redujo significativamente el crecimiento de la lesión vascular en modelos de angioplastia en rata (Hashiya, Aoki et al. 2004) y cerdo (Nakamura, Morishita et al. 2002). En este sentido, la inhibición de la expresión de E2F1 mediante el uso de ribozimas específicos produjo una disminución de la proliferación *in vitro* de CMLVs humanas (Grassi, Grassi et al. 2001; Grassi, Schneider et al. 2005).

Por otro lado, el factor de crecimiento de respuesta temprana **egr-1** (del inglés “early growth response factor-1”) regula la expresión de genes implicados en las

actividades inflamatoria, migratoria y proliferativa que forman parte de la patogenia de la aterosclerosis y la reestenosis (Blaschke, Bruemmer et al. 2004). Mediante el uso de ADN catalíticos, cuya actividad enzimática permite la rotura selectiva del enlace fosfodiéster entre una purina no pareada y una pirimidina pareada de un ARNm diana, se bloqueó la expresión del factor de transcripción egr-1. Así, Lowe y colaboradores demostraron que la reducción de los niveles de egr-1 bloquea la proliferación de CMLVs *in vitro* y el engrosamiento de la túnica íntima en un modelo de angioplastia con balón en la arteria coronaria de cerdo (Lowe, Fahmy et al. 2001). Resultados similares fueron obtenidos mediante el uso de *decoy* ODNs frente a egr-1 en un modelo de angioplastia con balón en la arteria carótida de rata (Han and Liu 2010) y conejo (Murrell, Khachigian et al. 2011), y tras implantación de *stent* en arteria carótida de conejo (Murrell, Khachigian et al. 2011).

La inhibición del factor de transcripción **NFATc1** (del inglés “*Nuclear Factor of Activated T cell*”) se ha asociado con una disminución de la expresión de ciclina A1 y de la proliferación celular de las CMLVs inducidos por PDGF-BB. De hecho, la administración del péptido sintético VIVIT, un inhibidor específico de la actividad de NFAT, bloqueó la proliferación de CMLVs *in vitro* e *in vivo* (Yu, Sliedregt-Bol et al. 2006; Karpurapu, Wang et al. 2008) y atenuó la hiperplasia vascular en un modelo de angioplastia con balón en arteria carótida de rata (Karpurapu, Wang et al. 2008). Recientemente, Yu y colaboradores han diseñado un nuevo péptido, MCV1, que presenta una acción más potente y selectiva que el VIVIT (Yu, Bot et al. 2012), cuya posible eficacia en el tratamiento de la reestenosis merece ser estudiada.

Los miembros de la **familia Sp** participan en la regulación de múltiples genes reguladores del ciclo celular, y la alteración de la actividad **Sp1** se asocia con enfermedades que cursan con una actividad proliferativa excesiva, por ejemplo, el cáncer (Black, Black et al. 2001; Safe and Abdelrahim 2005; Wierstra 2008). La sobreexpresión de Sp1 en tejido tumoral se correlaciona con el grado de desarrollo y la prognosis de varios cánceres (Kitadai, Yasui et al. 1992; Lietard, Musso et al. 1997; Shi, Le et al. 2001; Chiefari, Brunetti et al. 2002; Wang, Wei et al. 2003; Yao, Wang et al. 2004). Por el contrario la inactivación de SP1 mediante el uso de ribozimas específicos (Lou, O'Reilly et al. 2005), siRNAs (Jiang, Wang et al. 2004; Yuan, Wang et al. 2007), o fármacos anti-tumorales (Jia, Gao et al. 2010;

Chintharlapalli, Papineni et al. 2011) reduce la formación de tumores en modelos animales. En el contexto de la enfermedad cardiovascular, y concretamente en la reestenosis, nuestro laboratorio y otros han profundizado en la función de Sp1 durante el desarrollo de la neoíntima en respuesta a daño mecánico. Los niveles proteicos de SP1 y su actividad de unión a ADN se inducen durante el desarrollo de la lesión neoíntima tras daño mecánico en el modelo de angioplastia de la arteria carótida de rata (Madsen, Regan et al. 1997; Andres, Urena et al. 2001). La activación de Sp1 supone la represión de la transcripción del gen SM-MHC (del inglés "Smooth Muscle-Mynosin Heavy Chain"), marcador del fenotipo contráctil de las CMLVs, favoreciendo su fenotipo sintético característico de la enfermedad reestenótica (Madsen, Regan et al. 1997). Sin embargo, Sp1 se une al promotor del inhibidor de ciclo celular p27<sup>Kip1</sup>, induciendo su expresión y con ello, la inhibición de la proliferación celular asociado a las fases finales de la enfermedad (Andres, Urena et al. 2001). Kavurma y colaboradores proponen que la actividad supresora de la proliferación de las CMLVs por Sp1 se produce a través de la inhibición de la expresión de p21<sup>Cip1</sup> y de la formación del complejo ciclina D1/CDK4/p21<sup>Cip1</sup> (Kavurma and Khachigian 2003).

## 5.2. Reguladores negativos de la proliferación celular

El papel de los inhibidores del ciclo celular en el desarrollo de la lesión reestenótica ha sido ampliamente estudiado en ensayos *in vitro* y en modelos animales de hiperplasia vascular tras daño mecánico. Ensayos de terapia génica basados en la administración de vectores adenovirales que sobreexpresan el inhibidor del ciclo celular, p21<sup>Cip1</sup>, bloqueó la proliferación de las CMLVs *in vitro* y la formación de la lesión neoíntima tras daño mecánico en modelos de angioplastia en carótida de rata, arteria coronaria en cerdo y en arteria carótida de ratones deficientes en apolipoproteína E (apoE-KO) (Chang, Barr et al. 1995; Yang, Simari et al. 1996; Condorelli, Aycocock et al. 2001). De igual manera, Chen y colaboradores demostraron que la sobreexpresión del regulador negativo del ciclo celular p27<sup>Kip1</sup> mediante vectores adenovirales reduce la proliferación de CMLVs y la hiperplasia vascular tras daño mecánico a través de la inhibición de la expresión y actividad de CDK2 y ciclina A (Chen, Krasinski et al. 1997). En el mismo sentido, la

sobreexpresión de una proteína de fusión p27<sup>Kip1</sup> y p16<sup>Ink4a</sup> reduce la oclusión vascular en un modelo porcino de angioplastia con balón (Tsui, Camrud et al. 2001).

El supresor tumoral **p53** se relacionó por primera vez con la enfermedad reestenótica en 1994, al observarse que el 38% de las lesiones reestenóticas humanas de pacientes sometidos a angioplastia presentaban niveles elevados de p53, que además correlacionaron con la presencia del citomegalovirus humano (Speir, Modali et al. 1994). Los autores demostraron como la unión de IE84, una de las proteínas del citomegalovirus humano, era la responsable de la inhibición de la función de p53. Estos resultados sugirieron que la infección por citomegalovirus puede aumentar el riesgo de reestenosis debido a una mayor respuesta proliferativa causada por la inactivación de p53. Posteriormente, Yonemitsu y colaboradores demostraron que p53 es un inhibidor potencial de la proliferación celular en el contexto de la reestenosis, ya que la transferencia del gen que codifica para p53 en CMLVs inhibe la proliferación dependiente del mitógeno PDGF-BB y la formación de lesión reestenótica en un modelo de angioplastia en arteria carótida de conejo sin producir un aumento significativo de la apoptosis celular (Yonemitsu, Kaneda et al. 1998). En el mismo sentido, la inhibición de p53 mediante la administración de ODNs específicos, supone un aumento descontrolado de la proliferación celular y de la oclusión vascular tras angioplastia en la arteria carótida de rata (Aoki, Morishita et al. 1999; Matsushita, Morishita et al. 2000). Finalmente, nuestro laboratorio demostró que la sobreexpresión de p53 reduce el desarrollo de lesión neointima en un modelo de daño mecánico en la arteria femoral común de ratón (Sanz-Gonzalez, Barquin et al. 2007).

La familia de factores de transcripción **NR4A** se ha asociado también con la regulación negativa de la proliferación celular dependiente de la sobreexpresión de inhibidores del ciclo celular. Los NR4A son receptores nucleares huérfanos pertenecientes a la superfamilia de receptores nucleares hormonales que incluye a los miembros Nurr77 (NR4A1), Nurr1 (NR4A2) y NOR1 (NR4A3). En los últimos años, estos factores de transcripción se han vinculado con la regulación de la homeostasis de la glucosa y de lípidos, adipogénesis, inflamación y remodelación vascular (Zhao and Bruemmer 2010). Así, en el contexto de la enfermedad

cardiovascular, Nurr77 reduce la proliferación de las CMLVs y atenúa el desarrollo de la lesión reestenótica en modelos animales a través de la inducción de p27<sup>Kip1</sup> (Pires, Pols et al. 2007). Bonta y colaboradores demostraron también que Nurr1 presenta una actividad similar a Nur77, pues su sobreexpresión inhibe la proliferación *in vitro* de las CMLVs y la hiperplasia de la neoíntima *in vivo* (Bonta, Pols et al. 2010). Sin embargo, la actividad del miembro de la familia NOR1 es opuesta a la de Nur77 y Nurr1, al regular positivamente la proliferación de CMLVs dependiente de PDGF-BB a través del control de la expresión de los genes de la ciclina D1 y D2 (Nomiyama, Nakamachi et al. 2006), y su deficiencia en el ratón atenúa la formación de la lesión neoíntima inducida por daño mecánico (Nomiyama, Zhao et al. 2009).

## **OBJETIVOS**



Los objetivos generales de la presente tesis son el estudio de factores genéticos y moleculares implicados en la patofisiología de la reestenosis, para la identificación de biomarcadores genéticos de la enfermedad y mejorar el conocimiento de los mecanismos implicados en el desarrollo de la lesión neoíntima inducida por daño mecánico. Teniendo en cuenta la importancia de la proliferación celular en la fisiopatología de la reestenosis y la ausencia biomarcadores del riesgo individual de sufrir reestenosis, los objetivos concretos son:

1. Identificar polimorfismos de base única (SNPs) en genes reguladores del ciclo celular como marcadores genéticos del riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario.
2. Investigar la implicación funcional de los SNPs asociados a un mayor riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario.
3. Estudiar el papel de NF-Y en la enfermedad cardiovascular vasculo-proliferativa: aterosclerosis y reestenosis.
  - A. Investigar el papel de NF-Y en el desarrollo de la lesión neoíntima inducida por daño mecánico.
  - B. Investigar el papel del NF-Y en el desarrollo de la aterosclerosis nativa.
  - C. Investigar el papel del NF-Y en el control de la proliferación de la CMLV.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. Cohorte de pacientes y estudio genético

### 1.1. Cohorte de pacientes

#### 1.1.1 Cohorte Mediterranea

434 pacientes fueron admitidos de forma consecutiva en la Clínica **Mediterranea** (Nápoles, Italia; Investigadores Principales: Gianluigi Condorelli y Carlo Briguori) desde Enero a Diciembre de 2004. Los criterios de inclusión utilizados en el estudio fueron IPT coronaria (IPTC) programada con implantación de un *stent* de cromo-cobalto y tratamiento de una lesión *de novo* en una arteria coronaria. De la cohorte inicial, 101 pacientes fueron excluidos debido a la implantación de al menos un SF-LA (n=77) o una conservación inadecuada de la muestra sanguínea (n=24), reduciendo la cohorte a una población final de 333 pacientes. Del total de 333 pacientes, a 284 (85%) se les llevó a cabo una angiografía coronaria rutinaria a los 6-9 meses tras IPTC para comprobar si habían desarrollado o no reestenosis, representando la población final de pacientes. Los *stents* de cromo-cobalto implantados fueron MultiLink Vision (Abbott Vascular, Abbott Park, Illinois) y Driver (Medtronic CardioVascular, Santa Rosa, California). El comité local de ética aprobó el protocolo del estudio y todos los pacientes firmaron el consentimiento informado.

#### *Determinaciones bioquímicas*

Las muestras de sangre venosa periférica fueron obtenidas de los pacientes de forma previa a la IPTC. El procedimiento de obtención se llevó a cabo mediante la colección de la sangre en tubos de citrato trisódico (utilizado como anticoagulante) que inmediatamente se mantuvieron en hielo. En un periodo máximo de 1 hora tras la obtención de la sangre, las muestras fueron centrifugadas (4000 rpm durante 20 min), el plasma fue recogido y conservado a -80°C hasta el momento de análisis. Los niveles plasmáticos de colesterol total, colesterol-HDL (fracción asociada a lipoproteínas de alta densidad, del inglés "*High Density*

*Lipoprotein*”), colesterol-LDL (fracción asociada a lipoproteínas de baja densidad, del inglés “*Low Density Lipoprotein*”) y triglicéridos fueron determinados mediante técnicas enzimáticas. El índice de filtrado glomerular estimado (eGFR del inglés “*Estimated Glomerular Filtration Rate*”) fue calculado mediante la fórmula derivada del estudio MDRD (del inglés “*Modification of Diet in Renal Disease*”). Se consideró enfermedad crónica renal cuando el eGFR era menor a 60 mL (mililitros)/min (minutos)/1.73m<sup>2</sup>. Las características clínicas de los pacientes se resumen en **Resultados Apartado 1, Tabla 11**.

### *Angiografía coronaria*

Los pacientes recibieron dinitrato de isosorbida (0.1-0.3 mg) intracoronario antes de los angiogramas inicial y final para conseguir la vasodilatación máxima. Las medidas angiográficas se realizaron con un sistema automatizado y computerizado (QCA-CMS version 3.0, MEDIS). El seguimiento de la reestenosis se realizó mediante la determinación del diámetro luminal mínimo (MLD, del inglés “*Minimum Luminal Diameter*”) por diferentes observadores independientes y utilizando un ciego. Además, se analizaron las siguientes variables: ganancia aguda, definida como la diferencia de MLD después de la intervención menos el MLD antes de la intervención; pérdida tardía, definida como el MLD después de la intervención menos el MLD en el tiempo de seguimiento; e índice de pérdida, definido como el cociente medio entre la pérdida tardía y la ganancia aguda. Los pacientes se clasificaron como no afectados (sin reestenosis) o afectados (con reestenosis) según el grado de estenosis en el tiempo de seguimiento. La determinación de la reestenosis, establecida como reestenosis angiográfica binaria, se definió como el engrosamiento > 50% del diámetro del lumen en el segmento de interés (definido como todas las porciones del vaso que recibieron tratamiento en la zona de localización del *stent* o dentro de los márgenes de 5 mm proximal o distal al *stent*). Las características angiográficas y los principales eventos cardiacos adversos (MACE, del inglés “*Major Adverse Coronary Events*”) de la cohorte de pacientes se resumen en **Resultados Apartado 1, Tablas 12 y 13**.

---

### *Análisis estadístico*

Las variables continuas se representan como media±desviación estándar (SD, del inglés “*Standar Desviation*”). Las diferencias en valores continuos en los dos grupos (con o sin reestenosis) se analizaron mediante el test de la *t* de Student o el test de la U de Mann-Whitney cuando fue apropiado. Las variables categóricas se analizaron mediante el test  $\chi^2$ . Los tests fueron realizados de forma bilateral y los datos fueron analizados mediante el programa SPSS para Windows, versión 13.0 (SPSS Inc.).

#### **1.1.2 Cohorte GEISHA**

El análisis de los polimorfismos rs350099, rs350104 y rs164390 en la cohorte de pacientes correspondiente al estudio *GE*netic risk factors for *I*n-Stent *H*yperplasia study *A*msterdam (**GEISHA**) se realizó en colaboración con la Dra. Carlie de Vries de la Universidad de Amsterdam.

GEISHA es un estudio monocéntrico, prospectivo y observacional, con un período de inclusión de pacientes que abarcó desde 1997 hasta 2001. Los protocolos de estudio se ajustan a la Declaración de Helsinki y fueron aprobados por los médicos de los comités de ética de las instituciones participantes. Todos los pacientes dieron por escrito el consentimiento informado antes de su inclusión en los estudios. Los pacientes incluidos fueron intervenidos con éxito para revascularizar una arteria coronaria nativa mediante IPTC con colocación de *stent* metálico no farmacológico, procedimiento realizado por operadores experimentados utilizando un abordaje radial o femoral. Las indicaciones para la colocación del *stent* fueron rescate o resultados poco satisfactorios después de angioplastia con balón sin colocación de *stent*, oclusión total crónica, enfermedad ostial, o haber sufrido reestenosis tras angioplastia con balón. Se excluyeron pacientes con ISR y lesiones complejas, tales como lesiones de la vena safena tras bypass coronario, lesiones con bifurcaciones, lesiones con diámetro >25 mm, diámetro de referencia del vaso <2,5 mm, así como pacientes que habían sufrido un infarto de miocardio y fueron tratados mediante IPTC primaria. El tratamiento con estatinas se registró en el momento del procedimiento y en el seguimiento. Los

pacientes fueron tratados con aspirina (100 mg) y triclopídina (250 mg) o clopidogrel (75 mg) durante 1 mes después de la IPTC y con 100 mg de aspirina a partir de entonces. Se recogió sangre de los participantes para aislar ADN genómico a partir de leucocitos.

El seguimiento angiográfico a los 6-10 meses tras la IPTC y el estudio de los puntos finales se ha descrito previamente (van Tiel, Bonta et al. 2009; Bonta, Pols et al. 2010). En resumen, los puntos finales primarios del estudio fueron obtenidos a partir de la angiografía de seguimiento, y consistieron en reestenosis binaria (estenosis >50%) y pérdida tardía de lumen en el MLD. Los puntos finales secundarios fueron la revascularización de la lesión diana (TLR, del inglés “*Target lesion revascularization*”), repetición de la angioplastia, infarto de miocardio no mortal, revascularización coronaria, muerte o una combinación de MACE. TLR se definió como la necesidad de nueva revascularización del segmento con *stent* o dentro de los márgenes de 5 mm proximal o distal al *stent*, realizada bien mediante angioplastia o cirugía de bypass coronario. Las características clínicas y angiográficas de los pacientes se describen en (van Tiel, Bonta et al. 2009; Bonta, Pols et al. 2010).

El análisis coronario cuantitativo se realizó tal y como se describe en (Rittersma, de Winter et al. 2004). En resumen, todos los angiogramas fueron analizados por un laboratorio central local. La angiografía se realizó en al menos 2 proyecciones después de la inyección intracoronaria de dinitrato de isosorbida (0,2 mg). El MLD se midió en el punto más estrecho de la lesión o dentro del *stent*. La ganancia aguda se definió como la diferencia entre el diámetro mínimo de la luz antes y después de la IPTC (en mm). La pérdida tardía del lumen se definió como la diferencia entre el diámetro mínimo de la luz en el seguimiento y después de la IPTC (en mm). Todas las variables continuas se calcularon promediando dos vistas ortogonales obtenidas al final de la diástole.

La influencia del genotipo de cada individuo en la relación entre la tasa de supervivencia de los pacientes y el tiempo se determinó mediante el análisis por el Modelo de regresión de Cox y las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (con el test log-rank para comparar la probabilidad de supervivencia entre grupos).

## 1.2. Estudio Genético

### 1.2.1 Cohorte Mediterránea

El estudio genético realizado en la cohorte Mediterránea fue llevado a cabo por Felipe Javier Chaves de la Unidad de Genotipado y Diagnóstico Genético de la Fundación Investigación Clínica de Valencia-INCLIVA y el CIBER de Diabetes y Enfermedades Metabólicas Asociadas (CIBERDEM), España.

El genotipado de las muestras sanguíneas de la cohorte de pacientes se llevó a cabo mediante el uso del sistema SNplex, de acuerdo con las recomendaciones de uso del fabricante (Applied Biosystems). La identificación de los polimorfismos se realizó mediante el genotipado por curvas de fusión de alta resolución utilizando el *software* LightCycler 480 Scanning y el kit LightCycler 480 High Resolution Melting Master (Roche Applied Science). La mezcla del kit contenía el fluoróforo LightCycler 480 ResoLight, que se une de forma homogénea a la doble cadena de ADN y gracias a sus características químicas puede ser utilizado en altas concentraciones sin inhibir la reacción de amplificación. Durante los ciclos de la reacción de PCR (del inglés "*Polymerase Chain Reaction*") se monitorizó la formación de los fragmentos amplificados. Las muestras con variaciones en su secuencia se distinguieron por discrepancias en las curvas de fusión. Al utilizar esta técnica fue posible diferenciar muestras homocigotas y heterocigotas e incluso entre homocigotas salvajes y mutantes.

El diseño de cada pareja de cebadores, empleados en la reacción de PCR por gen, se realizó con el programa *Primer 3* (Howard Hughes Medical Institute and National Institutes of Health, National Human Genome Research Institute [http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)) (**Tabla 1**). En el diseño de los cebadores la temperatura de fusión se estableció alrededor de 62°C y el tamaño de los amplicones entre 100-250 pbs.

**Tabla 1. Cebadores diseñados para el genotipado de los polimorfismos asociados con el riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario**

Gen	SNP	GeneBank	Cebadores	
CCNB1	SNP1	rs350099	Sentido	AATAACGATCCAAAGAAACCAAATG
			Antisentido	CCCATAGAGCAACGGTATAAGAGC
CCNB1	SNP2	rs350104	Sentido	CCCCGTTGCTAATGTGTGA
			Antisentido	GACATTCTTTCATTTGATCGTTGC
CCNB1	SNP3	rs164390	Sentido	GAGGCTAGGCTGGCTCTTCTC
			Antisentido	CATGGCTTCCTCTTCACCAG
CCNB1	SNP4	rs875459	Sentido	CCAAAGTGCTGGGATTACAGG
			Antisentido	CAATTATTCATATGGTCAACCACAAAC
CCNA1	SNP5	rs2282411	Sentido	GTATGCCGCGTGATTTCTAGG
			Antisentido	CTGTGGGAAGAAAAGTAAAAGG
CDKN1A	SNP6	rs733590	Sentido	CTGGGCAGAGATTTCCAGACTC
			Antisentido	AAAATTGCAGAGGATGGATTGTTC

<sup>a</sup> Comenzando a contar a partir del primer nucleótido del primer codón del gen.

El análisis estadístico para identificar aquellos polimorfismos que pueden aumentar el riesgo de desarrollar reestenosis se realizó mediante regresión logística utilizando el programa SNPStat (Sole, Guino et al. 2006). El número de pacientes incluidos en el análisis de los distintos polimorfismos es variable en función de los errores de genotipado. El análisis de las posibles desviaciones de la distribución de genotipos dentro de la población respecto a la esperada de una población en equilibrio de Hardy-Weinberg se realizó con el test  $\chi^2$ . La asociación genética fue estudiada primero considerando un modelo de codominancia y luego se utilizó un modelo dominante o recesivo si existía un efecto similar en ambos genotipos.

### **1.2.1 Cohorte GEISHA**

El genotipado de los polimorfismos se realizó mediante el sistema Taqman (Applied Biosystems) y las reacciones se llevaron a cabo utilizando el lector LC480 (Roche Diagnostics) tal y como se describe en (van Tiel, Bonta et al. 2009; Bonta, Pols et al. 2010).

## **2. Modelos animales**

### **2.1. Ratón deficiente en apoE.**

Colonias de ratones apoE-KO y salvajes (ambos de la cepa C57BL/6J suministrados por Jackson Laboratory), se criaron de acuerdo a las premisas e indicaciones del *Internacional Council of Laboratory Animal Science* (ICLAS) en las instalaciones del Instituto de Biomedicina de Valencia del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IBV-CSIC) y en el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC). Mediante cruces se generaron camadas de edades similares que, tras un mes de edad, se destetaron, se separaron por géneros y se comenzaron a alimentar con pienso estándar para ratones (dieta control: 2,8% grasa; Panlab). En los estudios de aterosclerosis espontanea, los ratones apoE-KO y salvaje (control) se mantuvieron con esta dieta hasta su sacrificio cuando alcanzaron 7-11 meses de edad. En los estudios de aterosclerosis inducida por dieta, y una vez las camadas de los ratones apoE-KO cumplieron la edad establecida en cada experimento, el pienso estándar se reemplazó por pienso rico en grasa y colesterol (dieta aterogénica: 10,8% grasa total, 0,75% colesterol; S4892- E010, Ssniff). Esta dieta se mantuvo durante 2 meses hasta el sacrificio de los animales una vez estos alcanzaron los 4 meses de edad. La manipulación y sacrificio de los ratones se realizó cumpliendo la normativa vigente y por un investigador que desconocía el genotipo.

## **2.2. Modelo de angioplastia con balón en arteria carótida de rata**

Las muestras y cortes histológicos de arteria carótida de rata en el modelo de daño mecánico por angioplastia con balón fueron obtenidas en el laboratorio del Dr. Ciro Indolfi en el Departamento de Medicina Experimental y Clínica de la Unidad de Cardiología de la Universidad Magna Græcia (Catanzaro, Italia) y el laboratorio del Dr. Vicente Andrés García en el Departamento de Medicina del Centro Médico St Elizabeth's de la Universidad de Medicina (Boston, USA).

### Reactivos y material:

- Material de cirugía de precisión.
- Catéter de balón tipo Fogarty 2F (Edwards Laboratory).
- Quetamina (Ketalar, Parker Davis) y xilacina (Rompun, Bayer AG).
- Hilo de sutura.
- Paraformaldehído al 4%.
- Jeringa y aguja de 25G.
- Suero Salino.

Procedimiento: El modelo de angioplastia con balón en arteria carótida de rata se realizó en ratas Wistar (400 g de peso y 14 semanas de edad) como se describe en (Indolfi, Avvedimento et al. 1995). Las ratas fueron anestesiadas por inyección intramuscular de quetamina (100 mg/kg) y xilacina (5 mg/kg). La intervención se realizó por introducción de un catéter de balón tipo Fogarty 2F a través de la arteria carótida externa. El balón se infló a 1.5 atmósferas de presión y movió adelante y atrás 3 veces a través del punto de entrada del catéter (arteriotomía), denudando la capa endotelial de la arteria.

## **2.3. Modelo de daño endoluminal de la arteria femoral común de ratón**

El modelo de daño endoluminal de la arteria femoral común de ratón fue llevada a cabo en colaboración con Vanesa Esteban del Laboratorio de Vicente Andrés García en el Departamento de Epidemiología, Aterotrombosis e Imagen

Cardiovascular del CNIC (Madrid). A continuación se describe el protocolo adaptado para los experimentos de terapia génica con vectores adenovirales.

Reactivos y material:

- Material de cirugía de precisión.
- Catéter de 0.25 mm (Advanced Cardiovascular Systems).
- Hilo de sutura.
- Cánula.
- Paraformaldehído al 4%.
- Jeringa y aguja de 25G.
- Suero Salino.

Procedimiento: El modelo de daño endoluminal fue realizado en la arteria femoral común de ratones machos (C57BL/6J) mediante una única introducción de un catéter de 0.25 mm. El catéter fue introducido a través de la arteria femoral hasta alcanzar la bifurcación aórtica donde previamente se había introducido una ligadura temporal para impedir el flujo sanguíneo y permitir la incubación con el adenovirus. El grupo de animales control fue infectado por adenovirus que expresan la proteína fluorescente verde (GFP, del inglés "Green Fluorescent Protein", Ad-GFP) y el grupo experimental fue infectado con un adenovirus que expresa tanto la proteína GFP como el mutante dominante negativo NF-YA13m29 (Ad-GFP-NF-YAdn) (Mantovani, Li et al. 1994). Tras la ligación temporal, el catéter fue extraído y se procedió a la liberación intraluminal del virus (10  $\mu$ L conteniendo  $10^{10}$  pfu/mL, partículas formadoras de calvas, del inglés "Plaque Forming Units") mediante una cánula, justo tras lo cual se realizó una ligación permanente en la ateriotomía. Tras una incubación de 20 min, la ligación distal al lugar de la ateriotomía se eliminó, restableciendo el flujo sanguíneo en la región dañada del vaso.

9 días tras el daño, los animales fueron sacrificados en la cámara de CO<sup>2</sup> y el tejido limpiado de sangre mediante la perfusión de suero salino a través del ventrículo izquierdo del corazón tras haber seccionado la aurícula derecha previamente, permitiendo el drenaje de la sangre. Posteriormente el tejido fue fijado en paraformaldehído al 4% o bien ultracongelados para estudios posteriores. Los tejidos fijados se incluyeron en parafina y fueron posteriormente cortados en

secciones de 5 µm de grosor. Las secciones fueron teñidas mediante una tinción de hematoxilina-eosina y aquellas libres de trombos fueron incluidas en el estudio. El análisis de la estenosis se realizó sin conocer el grupo experimental al cual pertenecían los ratones mediante el programa informático ImageJ (National Institutes of Health).

El porcentaje de estenosis fue calculado mediante la fórmula:

$$\% \text{ estenosis} = \frac{\text{Área de la íntima}}{(\text{Área de la íntima} + \text{Área del lumen})} \times 100$$

El resultado final para cada animal se obtuvo de la media de todas las secciones analizadas.

### **3. Muestras de tejido humano**

#### **3.1. Muestras de tejido reestenótico**

Las muestras de tejido reestenótico fueron cedidas por el Dr. Randolph Hutter y el Dr. Valentín Fuster del Instituto Cardiovascular de Zena y Michael A. Wiener del Mount Sinai School of Medicine (Nueva York, USA).

Las muestras fueron obtenidas por aterectomía direccional percutánea en pacientes con angina estable atribuida a la presencia de lesiones reestenóticas tras haber sido intervenidos mediante angioplastia de balón (9 pacientes) o aterectomía (1 paciente), tal y se describe en (Bauriedel, Schluckebier et al. 1998).

#### **3.2. Muestras de arteria coronaria y mamaria interna**

Las muestras de arteria coronaria y mamaria interna fueron cedidas por el Dr. José Martínez González del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (Barcelona, España).

Las arterias coronarias y mamarias internas se obtuvieron de pacientes intervenidos de cirugía de trasplante de corazón o bypass de arteria coronaria, respectivamente. Las muestras fueron inmediatamente procesadas tras la escisión quirúrgica, las arterias diseccionadas e inmersas en medio de cultivo celular. Las arterias se limpiaron de tejido conectivo y grasa con la ayuda de un microscopio SZH10 (Olympus). Las muestras fueron fijadas durante toda la noche en paraformaldehído al 4% y tampón fosfato salino, (PBS, del inglés "*Phosphate Buffer Saline*" (0.1M, pH 7.4) y luego incluidas en parafina y cortadas en secciones mediante un micrótopo (Jung RM2055). La presencia o ausencia de lesiones ateroscleróticas se evaluó mediante tinción de tricrómica Masson y hematoxilina-eosina (Garcia-Ramirez, Martinez-Gonzalez et al. 2005). Los estudios fueron aprobados por el comité de ética de acuerdo con la Declaración de Helsinki.

#### **4. Obtención y conservación de órganos**

##### Reactivos y material:

- Material de cirugía de precisión.
- Suero Salino.
- Jeringuilla y aguja 25G.
- Lupa de aumento (Stemi 2000-C; Carl Zeiss).

Procedimiento: Una vez sacrificados los ratones, se extrajeron rápidamente los órganos y tejidos de interés en las condiciones de máxima limpieza e higiene posible. Posteriormente se llevó a cabo la eliminación de la sangre acumulada en el interior del corazón y aorta evitando la formación de coágulos sanguíneos. Para ello, se realizó una escisión a nivel de la aorta abdominal que permite el drenaje de la sangre y el suero salino estéril que se inyectará directamente a nivel del ventrículo derecho mediante una aguja de 25G. Una vez limpiadas las aortas y corazón se procedió a su escisión y rápidamente se introdujeron en suero salino estéril. Los órganos destinados a la obtención de proteína se limpiaron de la grasa adherida al tejido con ayuda de material quirúrgico de precisión y bajo lupa de

aumento. Tras la limpieza, las muestras se ultracongelaron inmediatamente por inmersión en nitrógeno líquido y se guardaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

## **5. Cultivo y mantenimiento de células eucariotas**

El cultivo celular consiste en el mantenimiento de células fuera del organismo de origen en un ambiente que aporta las condiciones adecuadas para la conservación de sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas. La utilización de células en cultivo permite el análisis de una población relativamente homogénea de células, lo cual tiene grandes ventajas en la investigación biomédica.

El trabajo con cultivos celulares requiere el mantenimiento de unas estrictas condiciones de esterilidad, ya que las células de mamífero se cultivan en un medio muy rico en nutrientes, sales y vitaminas, lo que hace que sea óptimo para el crecimiento de otros organismos eucariotas y procariotas no deseados. Para evitar dichas situaciones, todos los experimentos realizados se llevan a cabo en una cabina de flujo laminar de tipo II-A previamente esterilizada con radiaciones ultravioletas y todo el material y superficies se desinfecta con etanol al 70%. Todas las soluciones, medios de cultivo y material de trabajo se utilizan en condiciones de esterilidad.

### **5.1. Cultivos de líneas celulares**

El mantenimiento de las líneas celulares requiere del uso de medios de cultivo que contienen los nutrientes necesarios para mantener las características bioquímicas, fisiológicas y genéticas de las células. La capacidad de crecer y dividirse requiere del mantenimiento de los niveles adecuados de nutrientes en el medio mediante la adición rutinaria de suero.

Con el objetivo de evitar la depleción de nutrientes, la acumulación de células apoptóticas, necróticas o el arresto celular que se produce cuando las células

alcanzan la confluencia, se procede al replaqueo de las células. La técnica del replaqueo consiste en pasar una parte de las células de una placa a una nueva con medio fresco. El proceso de replaqueo puede generar una acumulación de mutaciones y la entrada de la célula en un proceso de senescencia, por lo que es conveniente la congelación de alícuotas de células de pase bajo manteniendo un stock de cada línea celular.

### 5.1.1 *Tripsinización y replaqueo*

Las líneas celulares utilizadas en la presente tesis son células adherentes a la superficie de crecimiento. La separación de las células de su soporte se lleva a cabo mediante la incubación con tripsina y EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). La tripsina es una enzima proteolítica que permite la rotura de las uniones intercelulares y las uniones de la célula al soporte, mientras que el EDTA quelata el  $\text{Ca}^{2+}$  del que depende la adhesión célula-célula.

#### Reactivos:

- PBS estéril: 140 mM NaCl; 2.7 mM KCl; 1.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 8.1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .
- Tripsina-EDTA (0.25 % tripsina - 1mM EDTA, Gibco, Invitrogen).
- Medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino (FBS, del inglés "Fetal Bovine Serum").

Procedimiento: Una vez que el cultivo celular haya llegado a la confluencia deseada según el tipo celular (normalmente 75-80%) se procede a la tripsinización. En una campana de flujo laminar y en condiciones de esterilidad, se aspira el medio de la placa de cultivo donde se mantenían las células y se lava con PBS estéril con el fin de eliminar cualquier resto de suero, ya que éste puede inhibir la actividad de la tripsina. Se retira el PBS y se añade el mínimo volumen de tripsina necesario para asegurarnos que se cubre toda la monocapa, y ésta se dejará actuar entre 1 y 5 min a temperatura ambiente o a  $37^\circ\text{C}$ , dependiendo del tipo celular. Una vez que comprobamos en el microscopio óptico que la monocapa se ha desenganchado completamente, resuspendemos las células en 10 mL de medio suplementado con 10% de suero para inhibir la actividad enzimática de la tripsina. A continuación se procede a una disgregación mecánica con la ayuda de una

pipeta automática mediante agitación arriba-abajo con el fin de obtener una suspensión homogénea.

A partir de este punto, el procedimiento varía según lo que se pretenda realizar. Se pueden congelar diferentes alícuotas de esta suspensión celular para generar un stock. O si lo que se pretende es el mantenimiento de la línea celular, se traspan entre 0.5 y 2 mL de la suspensión celular a una nueva placa de 10 cm<sup>2</sup> o frasco de 75 cm<sup>2</sup> y se añaden hasta 10 o 12 mL de medio fresco, respectivamente. En el caso que se quieran realizar ensayos con estas células, se cuentan con la cámara de Neubauer y se siembran a la densidad adecuada en placas de diferentes medidas en función del diseño experimental y del número de células que se necesite ensayar.

### **5.1.2 Congelación y descongelación de células**

Durante el trabajo con líneas celulares o células primarias es importante minimizar el número de pases del cultivo celular con el fin de evitar la acumulación de mutaciones que pueden conllevar cambios fenotípicos respecto a las células originales. Para evitar estos efectos negativos, se procede a la conservación en el laboratorio mediante la congelación de alícuotas de cada línea celular a pases bajos manteniendo, así, las características fenotípicas de origen.

El proceso de congelación de células requiere del uso de agentes crioprotectores como el glicerol o el DMSO (dimetilsulfóxido) que ayudan a mantener la viabilidad celular. La composición del medio de congelación varía según el tipo de línea celular o cultivo primario. Durante esta tesis se han utilizado diferentes medios de congelación: Las líneas celulares U2OS, HeLa, o E19P se congelaron en un medio con 80% de suero, 10% de medio de cultivo y 10% de DMSO. Por otro lado, los cultivos primarios fueron congelados en medio con 90% de suero y 10% de DMSO.

#### **Reactivos y material:**

- DMSO estéril.
- Contenedor de células con isopropanol.

- Congelador a  $-80^{\circ}\text{C}$ .
- Tanque de nitrógeno líquido.
- Centrífuga de tubos de 15 y 50 mL.
- Medio de congelación.
- Crioviales de 2 mL.
- Baño termostatzado a  $37^{\circ}\text{C}$ .

Procedimiento: Las células adherentes han de ser tripsinizadas previamente al proceso de congelación, preferentemente durante la fase de crecimiento exponencial. Tras desenganchar las células y la posterior inactivación de la tripsina, el homogeneizado celular se centrifuga a 1200 rpm durante 5 min. Tras eliminar el medio, el pellet celular se resuspende en un volumen de medio de congelación que dependerá de la cantidad de células que tengamos, así por ejemplo resuspenderemos en 1.5 mL de medio congelación por cada 5-10 millones de células. Dichas alícuotas se realizarán en crioviales de 2 mL. Rápidamente se introducen los viales en el contenedor de células que contiene isopropanol y que permite la congelación lenta y gradual de las mismas (aproximadamente  $1^{\circ}\text{C}/\text{hora}$ ), favoreciendo la conservación ya que evita la formación de cristales en el interior celular que puedan perjudicar la viabilidad de las células. El contenedor se guarda a  $-80^{\circ}\text{C}$  un mínimo de 4 horas y un máximo de 1 mes y luego se almacenan los crioviales a  $-196^{\circ}\text{C}$  en un tanque de nitrógeno líquido. El proceso de descongelación ha de ser rápido. Seleccionamos los crioviales de interés del tanque de nitrógeno líquido y lo sumergimos en el baño de  $37^{\circ}\text{C}$  hasta el momento justo en que se descongelan los últimos cristales. El medio descongelado se vierte rápidamente gota a gota sobre un tubo con 10-20 mL de medio de cultivo fresco, lo que nos permite diluir el DMSO y por tanto su efecto tóxico sobre las células. Tras esto, se centrifuga el tubo a 1200 rpm durante 5 min y se aspira el medio, eliminando así el DMSO procedente del medio de congelación. Finalmente, se resuspende el pellet celular y se siembre en una nueva placa.

## 5.2. Líneas celulares utilizadas

### 5.2.1 Línea celular HeLa

Las células HeLa son una línea celular aneuploide (American Type Culture Collection (ATCC), número: CCL-2™) derivada de adenocarcinoma de cérvix obtenida de Henrietta Lacks, paciente que murió en 1951. Se caracteriza por una elevada capacidad de proliferación debida principalmente a la expresión de una telomerasa muy activa que evita el acortamiento de los telómeros, implicado en envejecimiento y muerte celular. Su crecimiento es en forma de monocapa continua.

#### Reactivos:

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) high glucose (Invitrogen).
- 10 % FBS (Invitrogen).
- 1% de penicilina y estreptomina (Gibco, Invitrogen)
- 1% L-Glutamina 200 mM (Gibco, Invitrogen).

Procedimiento: Debido a su elevada capacidad proliferativa, el mantenimiento del cultivo celular se realiza sembrando bajos números de células y haciendo pase de células 1:10 cada 48-72 horas.

### 5.2.2 Línea celular U2OS

Las células U2OS (originalmente denominadas línea celular 2T, número ATTC: HTB-96™) se obtuvieron a partir de una paciente de 15 años que sufría de osteosarcoma. Establecidas en 1964, las células originales se tomaron de un sarcoma moderadamente diferenciado de la tibia. Se caracterizan por una elevada capacidad proliferativa debido principalmente a la ausencia del inhibidor del ciclo celular p16<sup>Ink4a</sup>, mientras que la expresión de otros reguladores del ciclo celular como p53 y RB es normal. Su crecimiento es en forma de monocapa continua.

#### Reactivos:

- DMEM high glucose (Invitrogen).
- 10 % FBS (Invitrogen).
- 1% de penicilina y estreptomicina (Gibco, Invitrogen).
- 1% L-Glutamina 200 mM (Gibco, Invitrogen).

Procedimiento: Presentan una elevada capacidad proliferativa por lo que requieren un mantenimiento rutinario ya que llegan a confluencia cada 48-72 horas tras una pase celular 1:10.

### **5.2.3 Línea celular E19P**

La línea celular E19P procede de CMLVs generada a partir del cultivo de explantes de aorta embrionaria a día 19 de ratas Fisher. La línea celular fue cedida por C. Shanahan de la Universidad de Cambridge (UK).

#### Reactivos:

- DMEM high glucose (Invitrogen).
- 10 % FBS (Invitrogen).
- 1% de penicilina y estreptomicina (Gibco, Invitrogen).
- 1% L-Glutamina 200 mM (Gibco, Invitrogen).

Procedimiento: Presentan una elevada capacidad proliferativa por lo que el mantenimiento del cultivo celular se realiza sembrando bajos números de células y haciendo pase de células 1:10 cada 72 horas. Durante el desarrollo de esta tesis, la línea celular E19P se utilizó por ser una línea celular de CMLV que presenta una elevada capacidad proliferativa.

## **5.3. Cultivos primarios utilizados**

### **5.3.1 CMLV de aorta de rata**

El cultivo primario se caracteriza por mantener las características propias del tejido de origen, preservando las propiedades fisiológicas, bioquímicas y

morfológicas de las células. El trabajo con cultivos primarios es más complicado de realizar respecto a las líneas celulares pues su aislamiento a partir del órgano de origen requiere de técnicas invasivas que pueden dañar las células primarias que queremos obtener. En concreto, en el caso de las CMLVs de aorta de rata la escisión de la aorta, su limpieza y el tratamiento de digestión enzimática que se le realiza son puntos críticos para obtener un cultivo primario puro que mantenga las características propias del tejido de origen.

El aislamiento de CMLVs de aorta de rata se realizó a partir de una aorta o un acervo de al menos 3 aortas procedentes de ratas de tipo Wistar-Kyoto de 100-200 gramos de peso mediante el método de digestión con la enzima colagenasa (Ruiz-Ortega, Lorenzo et al. 2000).

#### Reactivos y Material:

- Hank's Balanced Salts (HBBS) (Cambrex, Lonza).
- Medio DMEM completo: DMEM high glucose (Invitrogen) suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina, 1% de fungizona, 1% L-Glutamina 200 mM y 20% de FBS.
- 1% de penicilina y estreptomicina (Gibco, Invitrogen).
- Solución 1,2 mM de CaCl<sub>2</sub> (Sigma, formato en polvo).
- 1% de fungizona (Gibco, Invitrogen).
- 0,04% v/w (>125 CDU/mg) de Colagenasa Tipo II (Sigma).
- 20% FBS (Invitrogen).
- 1% L-Glutamina 200 mM.
- PBS estéril.
- Aguja de 25G.
- Filtros de 0,2 µm de tamaño de poro.
- Pinzas y tijeras de microcirugía.

Procedimiento: Tras la eutanización de la rata mediante exposición a dosis letales de CO<sub>2</sub>, se procedió a la apertura de la caja torácica del animal utilizando el material quirúrgico pertinente. Posteriormente se llevó a cabo la eliminación de la sangre acumulada en el interior del corazón y aorta evitando la formación de coágulos sanguíneos que pudieran provocar contaminaciones o perjudicar el

aislamiento de las CMLVs. Para ello, se realizó una escisión a nivel de la aorta abdominal que permite el drenaje de la sangre y el PBS estéril que se inyectará directamente a nivel del ventrículo derecho mediante una aguja de 25G. Una vez realizada la limpieza de las aortas y corazón se procedió a su escisión y rápidamente se introdujeron en PBS estéril.

Los siguientes pasos del protocolo se llevan a cabo en condiciones de esterilidad en cabina de flujo laminar bajo lupa de aumento y con ayuda de pinzas de microcirugía. Tras separar el corazón de la aorta a nivel de la base de las bifurcaciones de la aorta se procedió a la eliminación de la capa adventicia y de la grasa periférica adherida a la aorta. Seguidamente, al aorta se abrió longitudinalmente y con ayuda de unas pinzas de microcirugía de punta roma se eliminó la capa endotelial mediante rascado. La aorta, una vez limpia, se introdujo en medio HBBS estéril suplementado con 1% de penicilina/estreptomicina, 1,3 mM de CaCl<sub>2</sub>, 1% de fungizona y 0,04% v/w (>125 CDU/mg) de Colagenasa Tipo II y se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante un periodo de tiempo que varió entre 30-60 min según la eficiencia de la reacción enzimática. Este medio se preparó inmediatamente antes de su utilización esterilizándola mediante filtración con filtros de 0,2 µm de tamaño de poro. Una vez pasado el tiempo de incubación, se detuvo la reacción enzimática mediante la adición de medio DMEM completo. La capa muscular de la aorta se disgregó mecánicamente mediante aspiración arriba y abajo con ayuda de la pipeta automática y la solución resultante se centrifugó a 1500 rpm durante 5 min. El pellet obtenido se resuspendió en medio DMEM completo y se plaqueó en placas de cultivo de 6 cm de diámetro. Las células se mantuvieron en el incubador de células a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 48 horas sin ningún tipo de agitación para favorecer la adherencia de las células y la migración desde los restos de tejido hacia la superficie de la placa. Tras este tiempo, se le cambió el medio por medio DMEM completo fresco cada 4-5 días hasta alcanzar la confluencia, momento en el cual se tripsinizaron y se plaquearon en placas de cultivo de 10 cm<sup>2</sup> de diámetro. Este procedimiento se repitió hasta alcanzar la cantidad de células necesarias para la realización del experimento, siempre trabajando con células de pases no superiores a 10.

### **5.3.2 CMLV de arteria coronaria humana**

Las células de musculo liso aórtico humanas fueron cedidas por el Dr. José Martínez González del Centro de Investigación Cardiovascular (CSIC, Barcelona), y se obtuvieron de pacientes sometidos a endarterectomia.

#### Reactivos y material:

- Medio de cultivo M199 (Gibco, Invitrogen).
- 20 % FBS (Invitrogen).
- 2% suero humano.
- 1% L-Glutamina 200 mM.
- 1% de penicilina y estreptomycin (Gibco, Invitrogen).

Procedimiento: El aislamiento de las CMLV de aorta coronaria humana se llevó a cabo según se detalla en (Martinez-Gonzalez and Badimon 1996). El mantenimiento de las células de músculo liso aórtico humanas se realizó en medio M199 con 20% FBS, 2% suero humano, 1% L-glutamina y 1% de penicilina/estreptomycin cada dos días. El replaqueo de las células se realizó cuando alcanzaban la confluencia, siendo normalmente pases 1:2 o 1:3 cada dos a tres días.

### **5.3.3 Linfocitos humanos de sangre periférica**

El reclutamiento de voluntarios, el aislamiento y cultivo de linfocitos humanos de sangre periférica fue llevado a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Dr. Fernando Civeria en el Hospital Universitario Miguel Servet (I+CS) (Zaragoza, España).

Se estudiaron 32 voluntarios, 8 hombres y 24 mujeres de acuerdo con el genotipo previamente analizado para el gen que codifica para la ciclina B1. Los voluntarios fueron sometidos a un examen rutinario (Merino-Ibarra, Artieda et al. 2005) y se excluyeron aquellas personas con una edad menor de 25 y mayor de 65 años, excesivo consumo de alcohol, enfermedad aguda, enfermedad inflamatoria crónica y uso de fármacos que modifican el metabolismo lipídico o de la glucosa,

incluyendo fármacos antidiabéticos e hipolipidémicos o sustitución de estrógenos. Los voluntarios que se encontraban en ese momento haciendo uso de fármacos anti-inflamatorios también fueron excluidos del estudio. El comité científico local aprobó el estudio y todos los voluntarios dieron su consentimiento informado. Las características de los pacientes incluidos en el estudio se resumen en la **Tabla 2**. Los voluntarios fueron genotipados de acuerdo a la metodología descrita previamente (**Véase Materiales y Métodos**).

**Tabla 2. Características clínicas de los individuos incluidos en el estudio de los niveles de ARNm de ciclina B1 en linfocitos aislados de sangre periférica**

	-975TT-475CC+102GG n=14	-975CC-475TT+102TT n=17	p-valor
Edad	46.6±4.33	47.88±3.71	0.82
Sexo	Hombres: 42.80% Mujeres: 57.14%	Hombres: 11.76% Mujeres: 88.23%	0.09
Hipertensión sistémica	7.14%	17.64%	0.60
IPC	24.84±0.97	25.12±0.93	0.83
Fumadores activos	14.28%	5.88%	0.57
Lípidos plasmáticos (mg/dL)			
Colesterol-LDL	153.40±14.26	153.6±15.08	0.99
Colesterol-HDL	49.46±4.03	60.06±3.62	0.06
Triglicéridos	121.10±38.64	101.80±22.79	0.65

IPC: Índice de peso corporal. HDL: lipoproteínas de alta densidad; LDL: lipoproteínas de baja densidad.

Reactivos y material:

- Solución de Ficol-Plaque (GE Healthcare).
- Medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) completo: RPMI con GlutaMAX I (Invitrogen), 10% FBS (Gibco), 1% penicilina/estreptomicina.
- 5 µg/mL PHA-M.

Procedimiento: Los linfocitos humanos de sangre periférica fueron aislados mediante centrifugación en gradiente de densidad en una solución de Ficoll (Ge Healthcare) a partir de 20 mL de sangre periférica con 10 U/mL de heparina con litio. Las células mononucleares de sangre periférica se lavaron dos veces con medio RPMI-1640 y se resuspendieron en medio completo RPMI con GlutaMAX I y 5 µg/mL PHA-M. Las células se sembraron a una densidad de  $2 \times 10^6$  células/mL en dos frascos de 75 cm<sup>2</sup>. Pasadas 24 horas a 37°C y 5% de CO<sup>2</sup>, se eliminaron las células adherentes y los linfocitos humanos de sangre periférica se crecieron en medio RPMI completo durante 7 días más.

## **5.4. Tratamiento de cultivos celulares**

A lo largo de la tesis las células han sido sometidas a diferentes tratamientos para abordar diferentes procedimientos experimentales o bien responder a hipótesis planteadas durante el desarrollo de este trabajo.

### **5.4.1 Tratamiento con citoquinas/quimioquinas**

En diversos experimentos realizados durante la presente tesis se trató a los cultivos celulares con la citoquina PDGF-BB, factor de crecimiento compuesto por dos cadenas -B caracterizado por ser un potente inductor de la proliferación y migración celular. El stock se preparó en 4 mM de HCl a 50 µg/mL y 100 µg/mL para el PDGF-BB de rata (Sigma) y humano (R&D Systems), respectivamente. La concentración de uso final fue de 10 ng/mL y 20 ng/mL para el PDGF-BB de rata y humano, respectivamente.

### **5.4.2 Tratamiento con Inhibidores específicos de rutas de transducción de señal**

Durante los ensayos donde se realizó el tratamiento de las células con la citoquina PDGF-BB se trató a las células con los siguientes inhibidores de rutas de transducción de señales:

- U0126 (Promega): Inhibidor específico de las quinasas MEK 1 y MEK 2, pertenecientes a la familia de las MAP/ERK quinasas. El stock se preparó a 10 mM disuelto en DMSO y se guardó a -20°C. La concentración de uso fue 5 µM y se añadió 1 hora antes de iniciarse el experimento y se mantuvo durante el mismo.
  
- AKT inhibitor X (Calbiochem, EMD Chemicals, Inc): Inhibidor específico y reversible de la fosforilación de Akt y de su actividad quinasa *in vitro*, con un efecto mínimo sobre las quinasas PI3-K (del inglés "Phosphatidylinositol 3-Kinases", PDK1 (del inglés "Pyruvate Dehydrogenase Lipoamide Kinase isozyme 1" o SGK1 (del inglés "Serine/threonine-protein Kinase"). Su modo de inhibición es independiente del pH del medio. El stock se preparó en agua a una concentración de 2.6 mM y se guardó en nevera a 4°C. La concentración de uso fue 5 µM y se añadió 1 hora antes de iniciarse el experimento y se mantuvo durante el mismo.
  
- SB203580 (Calbiochem, EMD Chemicals, Inc.): Inhibidor específico y reversible de la unión de ATP a las quinasas MAP p38α, p38β and p38β2. No produce inhibición de las actividades de las quinasas ERK, JNK, p38γ o p38δ. El stock se preparó en DMSO a una concentración de 10 mM y se guardó a -20°C. La concentración de uso fue 10 µM y se añadió 1 hora antes de iniciarse el experimento y se mantuvo durante el mismo.

## 5.5. Transfección transitoria con vectores plasmídicos

Las técnicas de transfección transitoria se utilizaron durante la presente tesis para la realización de los ensayos de medición de la actividad promotora mediante el gen reportero de la luciferasa. El sistema de transfección utilizado en la línea celular U2OS fue la técnica del fosfato cálcico. Esta técnica fue descrita por F.L. Graham y A. J. van der Eb (Graham and van der Eb 1973) y se basa en la formación de estructuras de fosfato cálcico junto con el ADN plasmídico. Dichas estructuras se adhieren a la pared celular y luego son internalizadas por las células.

El tamaño de dichas estructuras es crítico en la capacidad de entrada hacia el interior de la célula y por tanto en la eficiencia de transfección del ADN de interés.

Reactivos y material:

- Tampón HBS 2x: 280 mM NaCl; 50 mM HEPES; 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH 7,05).
- Solución de CaCl<sub>2</sub> 2M.
- Plásmido de interés en solución acuosa.
- DMEM completo (1% penicilina/estreptomicina, 1% L-Glutamina y 10% de FBS).

Procedimiento: Para la realización de las transfecciones, la línea celular U2OS se sembró en placas de 6 pocillos (2 cm) para alcanzar una confluencia óptima del 80-85%. 6 horas antes de realizar la transfección se cambió el medio a las células por medio DMEM completo fresco. A continuación se preparó una solución que contiene 100 µL de tampón HBS 2x y 0.1 a 1 µg de ADN plasmídico, para seguidamente añadir gota a gota 10 µl de CaCl<sub>2</sub> 2M. La solución final se dejó incubar a temperatura ambiente durante 20 min permitiendo la formación de los precipitados. La adición gota a gota de CaCl<sub>2</sub> 2M o bien el agitado rápido con vórtex de la solución completa constituyen los pasos críticos para la formación de precipitados de pequeño tamaño y en consecuencia para la eficiencia de la transfección. Tras este tiempo la solución se distribuyó por la placa de cultivo y se dejó incubando en condiciones normales a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 16 horas. Transcurrido este tiempo desde la transfección, se cambió nuevamente el medio y las placas se incubaron 24 horas más para que se expresaran los plásmidos en las células que los hubieran internalizado.

## **5.6. Transducción genética mediante el uso de vectores virales**

Durante la presente tesis nos hemos valido del uso de vectores virales como sistema de transducción genética en cultivos primarios debido a la baja eficiencia obtenida mediante los sistemas de transfección transitoria. Los experimentos realizados se han llevado a cabo con el uso de vectores de tipo adenoviral.

Los adenovirus presentan un genoma formado por un ADN lineal de doble cadena de aproximadamente 36 kilobases (Kb). El ciclo infectivo consiste en la interacción de las pentonas de la cápside con las integrinas  $\alpha_v\beta_3$  y  $\alpha_v\beta_5$  presentes en la membrana citoplasmática de la célula huésped. Tras introducirse mediante endocitosis el adenovirus escapa de los endosomas al citoplasma y se transloca al núcleo donde se producirá la transcripción y replicación viral. Dependiendo del momento temporal de expresión respecto al inicio de la replicación del ADN, las unidades transcripcionales del adenovirus se denominan como genes tempranos (E1a, E1b, E2, E3 y E4), intermedios (Proteínas IX e Iva2) y tardíos (L1-L5). La generación de los vectores adenovirales se basa en la introducción del gen de interés en el genoma del adenovirus sustituyendo a genes del mismo y permitiendo la introducción del mismo durante el ciclo infectivo del adenovirus. Los vectores adenovirales de primera generación reemplazan el gen de interés por los genes E1 y/o E3, permitiendo hasta 8 Kb de inserto. Se caracterizan por presentar una baja capacidad de empaquetamiento y una elevada inmunogenicidad. Con el objetivo de reducir inmunogenicidad se desarrollaron los vectores de segunda generación eliminando proteínas como E2a, E2b y/o E4. Sin embargo, su uso es limitado debido a que los resultados no han sido los esperados. Finalmente encontramos los llamados “*gutless*” donde se elimina el total del genoma excepto las secuencias en *cis* ITRs (repeticiones invertidas terminales, del inglés “*Inverted Terminal Repeat*”) y la secuencia de encapsidación. En los tres casos, la propagación del vector viral se realiza en las células empaquetadoras (HEK 293A), que contienen aquellos genes eliminados del genoma del virus y que son necesarios para completar correctamente el ciclo infectivo. En los experimentos realizados en la tesis se han utilizado vectores adenovirales con una delección de las proteínas E1 y E3 (Luo, Deng et al. 2007). Los adenovirus se caracterizan por presentar un tropismo amplio, una elevada capacidad de producción y una elevada capacidad de transducción. A diferencia de los lentivirus y retrovirus su material genético no se integra en el genoma de la célula hospedadora y se mantiene episomal, lo que hace que se transmita a ambas células hijas durante la división celular pero de forma limitada en el tiempo. Esto provoca que la expresión del transgén se mantenga durante 7-14 días dependiendo de la capacidad de división de la célula hospedadora.

El trabajo con vectores virales requiere una serie de medidas de precaución como el trabajo con campana de flujo de Nivel de Bioseguridad de tipo II. Además, es necesario el uso de descontaminantes para la inactivación de los virus tanto de residuos sólidos como líquidos.

### **5.6.1 Producción y titulación de adenovirus**

La producción y titulación fue realizada por la Unidad de Vectores Virales del CNIC tal y como se describe en (Luo, Deng et al. 2007). Los títulos obtenidos varían entre 3 y  $5 \times 10^9$  pfu/mL.

### **5.6.2 Infección de los cultivos primarios**

Durante los experimentos donde utilizamos CMLVs primarias de rata y humanas se llevó a cabo la infección con 200 MOI (de inglés "Multiplicity Of Infection") que representa la adición de 200 partículas víricas por cada célula presente en el cultivo. Las células se incubaron con medio sin suero y los virus durante 6 horas, tras las cuales se cambió el medio por medio completo. La expresión del transgén se produjo a las 16-24 horas, visualizado gracias a la presencia en el vector viral de la proteína GFP.

## **6. Técnicas de análisis de la expresión de proteína**

### **6.1. Obtención de extractos proteicos**

#### **6.1.1. Obtención de lisados celulares**

Para la obtención de lisados celulares se ha partido de placa de cultivo de 6-10 cm<sup>2</sup> sembradas a una densidad que variaba entre el 70% y el 90%. La obtención del lisado celular se ha realizado tras tratar las células con diferentes

estímulos según el experimento realizado. En la presente memoria se ha utilizado el Tampón de homogeneizado de aorta.

Reactivos y material:

- Tampón de homogeneizado de aorta: 50 mM HEPES (pH 7,5); 100mM NaCl; 2,5 mM EGTA; 10%  $\beta$ -Glicerolfosfato; 10% Glicerol; 0,1% Tween<sup>®</sup> 20; 0,1 mM NaVO<sub>3</sub>, *Complete* 1X (solución con una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas; Roche).
- Rascador celular.
- Tanque con nitrógeno líquido.
- Baño termostatzado a 37°C.
- Microcentrífuga termostatzada.
- Sonicador.

Procedimiento: Para la obtención del lisado celular aspiramos el medio de cultivo de placa de cultivo celular y lavamos con PBS para eliminar los restos de medio que queden. A partir de este punto trabajaremos sobre hielo con el objetivo de evitar la degradación de las proteínas por parte de las proteasas liberadas al romper la célula. Seguidamente, añadimos un volumen de Tampón de homogeneizado de aorta que variará según la cantidad de células (100-500  $\mu$ L) y rascamos la monocapa celular con el rascador. Para producir la rotura de las membranas celulares y permitir la salida de las proteínas contenidas en éstas, se llevó a cabo procesos de congelación y descongelación. Este proceso consiste en congelar rápidamente el lisado celular en nitrógeno líquido y posteriormente descongelar en un baño previamente calentado a 37°C. Justo después de descongelarse el último cristal se realiza una agitación en vórtex durante 30 segundos (seg). El proceso se repitió durante 3 veces.

Finalmente, se llevó a cabo un proceso adicional de rotura mecánica de las membranas celulares tras el proceso previo de congelación/descongelación mediante sonicación con 5 ciclos de 10 seg a 60 Hz. Seguidamente el lisado celular se centrifugó a 16000 rpm durante 30 min a 4°C para precipitar los restos celulares y se recogió el sobrenadante que contendrá la proteína total.

### **6.1.2 Obtención de lisados de tejido**

Durante el proyecto se procesaron diferentes tejidos murinos para la obtención de extractos proteicos totales que se utilizaron en los Ensayos de Movilidad Electroforética Retardada (EMSA, del inglés "Electrophoretic Mobility Shift Assay"). Para la obtención de dichos extractos proteicos se procesaron órganos previamente obtenidos de los animales sacrificados.

#### Reactivos y material:

- Mortero metálico.
- Tampón de homogeneizado de aorta.
- Tanque con nitrógeno líquido.
- Baño termostatzado.
- Microcentrífuga termoregulable.

Procedimiento: Para la obtención de los extractos proteicos a partir de tejido se procesó una cantidad variable del órgano de interés previamente conservado a -80°C tras su obtención procedente del animal. Se llevó a cabo una pulverización del tejido congelado mediante el uso del mortero metálico mantenido a muy baja temperatura mediante adición de nitrógeno líquido en el interior del mortero. Una vez tuvimos el tejido pulverizado, se le añadió una cantidad variable de Tampón de homogeneizado de aorta (100-500 µL) dependiendo de la cantidad de tejido procesado y se recogió en un eppendorf. A continuación se llevó a cabo la rotura de las membranas celulares y estructuras del tejido mediante procesos de congelación y descongelación (3 veces). Seguidamente el lisado se centrifugó a 16000 rpm durante 30 min a 4°C para precipitar los restos celulares y se recogió el sobrenadante que contendrá la proteína total.

### **6.1.3 Obtención de extractos proteicos de la fracción nuclear soluble y fracción citoplasmática.**

Los extractos proteicos procedentes de la fracción soluble del núcleo (nucleosol) y del citoplasma (citosol) se obtuvieron mediante la técnica de

fraccionamiento subcelular. Los extractos proteicos nucleares se utilizaron preferentemente durante los EMSAs, al permitir estudiar la actividad de unión al ADN únicamente de aquellas proteínas contenidas en el núcleo en el momento de realizar el experimento. Por otro lado, los extractos proteicos nucleares y citoplasmáticos se utilizaron también durante los ensayos de Western Blot.

Reactivos y Material:

- Tampón A: 10 mM HEPES (pH: 7,9); 10 mM KCl; 0,1 mM EDTA; 0,1 mM EGTA; 1 mM DTT; 1X *Complete*, 1X (Roche); *PhosphoSTOP* (Roche).
- Tampón B: 20 mM HEPES (pH 7,9); 0,4 M NaCl; 1 mM EGTA; 1mM DTT; 1X *Complete*, 1X *PhosphoSTOP*.
- Nonidet-40 al 10%.
- Rascador celular.
- Microcentrífuga termoregurable.

Procedimiento: Los extractos proteicos procedentes de la fracción nuclear y citoplasmática soluble se obtuvieron a partir de una o dos placas de cultivo de 10 cm<sup>2</sup>. Se aspiró el medio de la placa de cultivo y se lavo 3 veces con PBS para eliminar los restos de medio. A partir de este punto trabajamos sobre hielo con el objetivo de evitar la degradación de las proteínas por parte de las proteasas liberadas al romper la célula. Tras lavar las células se añadieron 400 µL de tampón A frío y se separaron las células de la placa mediante un rascador celular. El contenido se introdujo en un eppendorf y se incubó 15 min en hielo. Tras esto, se añadieron 25 µL de Nonidet-40 al 10% y se agitó en vórtex durante 10 seg. Rápidamente se centrifugó 30 seg a 4°C a máxima velocidad precipitando las membranas citoplasmáticas y los núcleos y dejando en el sobrenadante la fracción citoplasmática soluble. Seguidamente se realizó un lavado del pellet con 400 µL de Tampón A frío, se centrifugó 30 seg a 4°C y máxima velocidad y se eliminó el sobrenadante. El pellet obtenido, formado por los núcleos de las células, se resuspendió en 50 µL de Tampón B frío y se agitó en vórtex a 4°C durante 1 hora. Finalmente, se centrifugó durante 30 min a 4°C y máxima velocidad y recogimos el sobrenadante (fracción nuclear soluble). El pellet obtenido contendrá las membranas nucleares (fracción nuclear insoluble).

## 6.2. Valoración de la concentración de proteínas

La valoración de la concentración de proteínas se realiza mediante el método de Bradford (Bradford 1976). Este método se basa en el hecho de que la unión de proteínas (en medio ácido) al azul brillante de Coomassie provoca un cambio del máximo de absorbancia de 465 a 595 nm, longitud a la cual se efectúa la medición. La valoración de la concentración de proteínas mediante el método Bradford se realizó utilizando la solución comercial “Bio-Rad Protein Assay” (Bio-Rad).

### Reactivos y Material:

- Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad).
- Albúmina sérica bovina.
- Espectrofotómetro.

Procedimiento: La solución comercial “Bio-Rad Protein Assay” (Bio-Rad) se diluye 1:5 en agua destilada y se coloca 1 mL de ésta en cubetas de espectrofotómetro semimicro de plástico. Según el tipo de muestra a valorar, se pipetea entre 1-10  $\mu\text{L}$  de muestra por duplicado y se añaden al mililitro de Bradford que ya tenemos en la cubeta. Paralelamente se prepara una recta patrón que se realiza con albúmina sérica bovina al 0.1% en un rango de concentraciones de entre 0 y 10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ . Mediante esta recta patrón, podremos extrapolar los valores de absorbancia de cada una de las muestras y obtener su concentración. Se agitan las cubetas con un vórtex y pasados 5 min se mide la absorbancia de la recta patrón y de las muestras a 595 nm de longitud de onda.

## 6.3. Electroforesis en SDS-PAGE

La electroforesis es una técnica que permite la separación de las proteínas contenidas en una muestra. En la electroforesis en geles de poliacrilamida (del inglés “*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*”, PAGE) las proteínas migran dentro de un campo eléctrico a través de los poros de la matriz de acrilamida cuyo tamaño dependerá del porcentaje de acrilamida. En conjunto, la combinación del tamaño

de poro, la carga de la proteína, su tamaño y su forma determinaran la velocidad de migración de la misma.

El sistema más clásico es el descrito por Laemmli en 1970, que consiste en una electroforesis discontinua, aniónica, en condiciones desnaturizantes (Laemmli 1970). La adición de 0.1% del detergente aniónico dodecil sulfato sódico (SDS) desnaturiza las proteínas y les confiere carga negativa, manteniendo siempre la relación carga/masa constante. Inicialmente, las muestras deben atravesar el gel concentrador (*stacking*), de baja concentración de acrilamida (5%) y mayor pH, que permite el alineamiento de las muestras antes de entrar en el siguiente gel. En el segundo gel, el separador (*resolving o running*), es donde tiene lugar la separación de las muestras, de forma que la movilidad electroforética de cada proteína dependerá de su tamaño (peso molecular). La concentración de acrilamida de este gel puede oscilar entre el 5 y el 15%, siendo habitualmente elegidas concentraciones mayores de acrilamida cuanto menor tamaño tenga la proteína de interés.

#### Reactivos y materiales:

- Tampón de electroforesis: 250 mM Tris-Base, 1.91 M glicina y 1% SDS.
- Tampón de carga: 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% glicerol, 6% SDS, 0.2 mg/mL azul de bromofenol. En caso de que se desee reducir los puentes disulfuro, se añadirá  $\beta$ -mercaptoetanol a una concentración final de 10% en el momento de su utilización.
- Aparato de PAGE: Sistema *MiniProtean II* (Bio-Rad) equipado con una fuente de voltaje.
- Geles de acrilamida: Se preparan con una disolución comercial de acrilamida-bis-acrilamida al 30% (Bio-Rad). Es necesario prepararlos en el momento en que se realiza el ensayo y siempre utilizar guantes, debido a su toxicidad y su capacidad teratogénica en estado líquido. Las cantidades de cada reactivo dependerán de la concentración de acrilamida del gel y del volumen a preparar:
  - Gel separador: disolución acrilamida-bis-acrilamida, tampón 1.5 M Tris-Base (pH 8.8), 10% SDS, 10% persulfato amónico y TEMED (Bio-Rad), que es el desencadenante de la reacción de polimerización

- Gel concentrador (5%): disolución acrilamida-bis-acrilamida, tampón 1M TRIS 1M (pH 6.8), 10% SDS, 10% persulfato amónico y TEMED.
- Estándar de peso molecular: Precision Plus Protein™ *Dual Color Standards* que contiene marcadores de pesos moleculares preteñidos entre 10 y 250 KDa. Se han utilizado 5 µL por gel.

### **6.3.1 Preparación de las muestras**

Las muestras a analizar pueden tener diferente origen o procesamiento previo y diferente sensibilidad a los diferentes anticuerpos primarios usados. Por eso, la cantidad necesaria de proteína a cargar en el gel ha de ser determinada experimentalmente en cada caso. Generalmente se cargan entre 5 y 60 µg de proteínas en un volumen total de 20-50 µL, dependiendo de la concentración proteica de la muestra y del volumen que cabe en el pocillo. Es importante que la valoración de proteína de las muestras sea precisa para garantizar una carga homogénea y poder realizar un análisis de carácter cuantitativo. Finalmente se añade el tampón de carga que contiene glicerol para facilitar la entrada de la muestra en su pocillo. Si se desea desnaturalizar la muestra, se llevará a 95°C durante 5 min. En el tampón también se incluye el azul de bromofenol, colorante con carga negativa y con una movilidad electroforética que equivaldría a pequeños polipéptidos. Su función es la de ir por delante de las proteínas para ir marcando el frente de electroforesis y que podamos visualizar como se va realizando el movimiento.

### **6.3.2 Preparación de los geles y electroforesis**

Utilizamos el sistema de electroforesis *MiniProtean II* SDS-PAGE de Bio-Rad siguiendo las instrucciones de montaje del fabricante. Para la preparación de los geles se montan los vidrios sobre el soporte y el separador deseado, en función del grosor del gel que queremos obtener (1 o 1.5 mm). Tras añadir el agente polimerizante TEMED a la solución de acrilamida, se introduce entre los vidrios y se coloca el peine para la formación de los pocillos (el tipo de peine también variará según se necesiten mayor o menor número de pocillos o de un mayor o menor

tamaño). Tras la polimerización del gel, se monta en el sistema de electroforesis, llenaremos la cubeta con el tampón de electroforesis y cargaremos las muestras de interés. La separación de las proteínas la realizaremos en un campo eléctrico con un voltaje (90-120 V) o amperaje (10 mA/gel) constante durante 60 a 90 min.

### 6.3.3 *Western Blot*

Esta técnica consiste en la electrotransferencia de proteínas previamente separadas en un gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa o PVDF donde son detectadas mediante anticuerpos específicos.

#### *Electrotransferencia de proteínas*

##### Reactivos y material:

- Tampón de transferencia: 10% Tampón de transferencia 10X (Tris 100 mM, glicina 1M, 20% metanol y se enrasa con agua destilada).
- Sistema de transferencia Mini-Protean II (Bio-Rad).
- Membrana de PVDF Immobilon-P (Millipore), con poro de 0.45  $\mu\text{m}$ .

Procedimiento: Tras finalizar la electroforesis se extraen los geles de acrilamida del soporte de vidrio y los sumergimos en tampón de transferencia 1X. Previamente, se ha de activar la membrana de PVDF con metanol debido a su hidrofobicidad. El montaje del sistema de transferencia se realiza colocando primero 3 papeles Whatman, el gel, la membrana y otros tres papeles Whatman entre dos esponjas, evitando la formación de burbujas entre el gel y la membrana para evitar una incorrecta transferencia de las proteínas a la membrana. El sándwich se coloca en la cubeta de transferencia y se rellena de tampón de transferencia para permitir la generación de la corriente eléctrica. Para evitar el calentamiento del tampón debido a la corriente eléctrica generada, el tampón de transferencia se prepara con agua a 4°C y se coloca la cubeta de transferencia sobre hielo durante el proceso. Es conveniente el uso de una barra magnética en el interior de la cubeta que permita la agitación constante del tampón para permitir la disipación del calor. La

transferencia se realiza a voltaje constante de 100 V durante 60 min (geles de 1 mm) o 90 min (geles de 1.5 mm).

### *Inmunodetección*

Esta técnica se basa en la detección mediante anticuerpos específicos (anticuerpo primario) de las proteínas de interés inmovilizadas en la membrana de PVDF. El anticuerpo primario, a su vez, será detectado por un anticuerpo secundario que reconocerá la cadena pesada del anticuerpo primario y que al encontrarse ligado a la peroxidasa de rábano permitirá su detección por el método de ECL (Enhanced Chemiluminescence, GE Healthcare). Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados durante la presente tesis en los experimentos de Western Blot se resumen en la **Tabla 3**.

Previamente a la incubación con el anticuerpo primario es necesario bloquear la membrana de PVDF con una solución de bloqueo rica en proteínas (PBS-Tween 0.2% con un 5% de leche desnatada en polvo) evitando las uniones inespecíficas a la membrana. La incubación se realiza 1 hora a temperatura ambiente o bien 16 horas a 4°C. Tras el bloqueo de la membrana se incuba con el anticuerpo primario que se encuentra diluido en la solución de bloqueo. La dilución y el tiempo de incubación utilizado varían según la cantidad de antígeno presente en la muestra así como de la especificidad y sensibilidad de nuestro anticuerpo. Tras esta incubación se procede a eliminar el exceso de anticuerpo mediante 4 lavados de 10 min cada uno con PBS-Tween 0.2%). Seguidamente incubamos la membrana con el anticuerpo secundario durante 1 hora a temperatura ambiente y diluido en la solución de bloqueo (la dilución dependerá de la especificidad y sensibilidad del anticuerpo). Una vez finalizada se realizarán otros 3 lavados de 10 min, en esta ocasión serán 2 lavados con PBS-Tween 0.2% y 2 lavados más con PBS.

### *Revelado por el método de ECL y análisis*

La detección de la proteína inmovilizada en la membrana de PVDF se basa en el reconocimiento secuencial de la proteína por parte del anticuerpo primario y este a su vez por el anticuerpo secundario conjugado con la enzima peroxidasa de

rábano. Por un método químico, mediante el reactivo ECL podremos detectar de forma luminiscente la reacción de la peroxidasa, y por tanto los antígenos conjugados al anticuerpo secundario. Esta quimioluminiscencia se visualiza en una autorradiografía.

Procedimiento: Una vez finalizados los lavados, se expone la membrana durante 1 min al reactivo ECL. Posteriormente, se secan los restos del reactivo y se fija la membrana previamente cubierta por una fina bolsita de plástico en el interior de un casete que no permita la entrada de luz. En una cámara oscura se introduce un film fotográfico dentro del casete para realizar la exposición del mismo, el tiempo de exposición varía en función de la sensibilidad del anticuerpo y la muestra analizada. Pasado este tiempo, el film se revela y se fija.

**Tabla 3. Anticuerpos utilizados en los experimentos de Western Blot**

Anticuerpo	Casa Comercial (Referencia)	Especie de origen	Dilución de uso
Anti-NF-YA	Rockland (200-401-100)	Policlonal de conejo	1:1000
Anti-Lamin A/C	Santa Cruz (sc-6215)	Policlonal de cabra	1:300
Anti-conejo-HRP*	Santa Cruz (sc-2004)	Cabra	1:5000
Anti-cabra-HRP*	Santa Cruz (sc-2020)	Burro	1:5000

\* HRP: (del inglés "*H*orse*a*dish *P*eroxidase").

## **7. Técnicas de manipulación y análisis de ácidos nucleicos**

### **7.1. Aislamiento de ADN**

La extracción de ADN se realiza a partir de bacterias previamente transformadas utilizando los kits de Roche o GE Healthcare que permiten de una manera sencilla y rápida la obtención de ADN plasmídico con un buen grado de purificación. Según la cantidad de bacterias de partida y en consecuencia la cantidad de plásmido a extraer se utilizan diferentes variantes del kit, ordenadas de menor a mayor capacidad de extracción: mini, midi o maxiprep. Las minipreps se utilizan principalmente para la comprobación de los plásmidos donde se ha realizado la clonación, mientras que las midi y maxipreps se han utilizado en los ensayos de transfección transitoria de células eucariotas. El protocolo que se ha seguido ha sido el recomendado por el fabricante.

Para evitar la pérdida del plásmido de interés se procede a la congelación de las bacterias transformadas mediante la adición de un 20% de glicerol estéril y su posterior congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **7.2. Tratamiento enzimático del ADN**

EL ADN se sometió a procesos de digestión y ligación siguiendo las instrucciones de uso de los enzimas utilizados en cada caso. La digestión del ADN se realizó mediante incubación con endonucleasas de restricción que permiten la rotura del ADN en regiones específicas determinadas por la secuencia de reconocimiento específica de cada enzima. La ligación, por la enzima ligasa del bacteriófago T4, permite la reparación de discontinuidades de una sola base en una molécula de ADN de doble cadena al catalizar la formación de un enlace diéster entre un grupo 5'-fosfato y un 3'-hidroxilo. Esta enzima es indispensable en

las técnicas de subclonación en vectores plasmídicos ya que permite la unión de un fragmento de ADN (inserto) y un plásmido con extremos complementarios.

### 7.3. Técnicas de subclonaje en vectores plasmídicos

Las técnicas de clonaje se basan en la generación de ADN recombinante a partir de la unión de fragmentos de ADN con extremos complementarios obtenidos bien por digestión con endonucleasas de restricción o bien mediante amplificación por PCR con cebadores específicos. Durante la presente tesis se han generado vectores plasmídicos a partir de la inserción de un fragmento de interés en un vector “vacío” (plásmido original). Los vectores generados son los plásmidos 3x(-957T), 3x(-957C), 3x(-475C), 3x(-475T), 3x(+102G) y 3x(+102T), utilizados en los experimentos de análisis de la actividad transcripcional mediante el gen reportero de la luciferasa.

#### Reactivos y Materiales:

- Enzimas XhoI y KpnI (New England Biolabs).
- Tampón enzima de restricción (New England Biolabs).
- Ligasa T4 (New England Biolabs).
- Tampón Ligasa 10x (New England Biolabs).
- Columnas de purificación (Ge Healthcare).
- Termobloque.

Procedimiento: Los insertos utilizados en el clonaje fueron sintetizados por Sigma-Aldrich y diseñados con la presencia de secuencias de restricción para los enzimas XhoI y KpnI en ambos extremos. El plásmido (1 µg) fue digerido con los enzimas XhoI y KpnI a nivel de las secuencias de reconocimiento situadas en la Región de Clonaje Múltiple mediante incubación a 37°C durante 1 hora. Tras la digestión, el plásmido se purificó mediante el uso de columnas de purificación siguiendo las instrucciones del fabricante, con el objetivo de eliminar los enzimas y tampones de la incubación anterior. Tras esto procedió a la ligación del inserto y el plásmido digerido incubando con la ligasa T4 durante 2 horas a temperatura ambiente. La ligación se realizó con una relación de 1 molécula de plásmido por 3 de inserto. Finalmente el resultado de la ligación se transformó en bacterias competentes y se

comprobó la formación de colonias. Se introdujo un control de ligación sin inserto y se comparó el número de colonias con éste. La comprobación de la correcta subclonación del inserto se realizó por la técnica de PCR de colonias o por digestión enzimática de los plásmidos obtenidos.

#### **7.4. Transformación de bacterias competentes**

El objetivo de la transformación de bacterias es la amplificación de un fragmento de ADN mediante su introducción en la bacteria, replicación del ADN y su posterior aislamiento y purificación. El procedimiento más habitual de transformación es el choque térmico donde la incubación de las bacterias en frío y la presencia de cationes de  $\text{Ca}^{2+}$  predispone a la membrana a la entrada de moléculas de ADN que se producirá tras un choque rápido de calor. Durante la presente tesis se utilizaron la bacteria *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$  y el protocolo de choque térmico como método de transformación.

##### Reactivos y material:

- Bacterias competentes, 50  $\mu\text{L}$  por reacción.
- Plásmido o producto de ligación.
- Medio LB líquido.
- Baño termostatzado a 42 °C.
- Incubador de agitación horizontal
- Tubos de polipropileno.
- Placas de agar/LB con antibiótico: 1,5 % de agar bacteriológico americano (Pronadisa) (p/v) en LB líquido, y el antibiótico de elección según el plásmido de interés.
- Asa de siembra y etanol 70 %.

Procedimiento: Descongelar la alícuota de bacterias competentes en hielo, sin calentar, y pipetear en un tubo de polipropileno. Se prefieren estos tubos porque el polipropileno, al ser un material buen conductor, garantiza la eficacia del choque térmico. Añadir 50-200 ng de ADN, incubar 30 min en hielo y realizar el choque térmico, consistente en 1 min 45 seg a 42°C seguido de 2 min en hielo. A

continuación, añadir 1 mL de LB sin antibiótico, incubar a 37°C en agitación horizontal durante 1 hora, sembrar en placas de LB con el antibiótico adecuado e incubar a 37°C toda la noche.

## **7.5. PCR de colonias**

La comprobación de las colonias positivas para los vectores plasmídicos donde se ha producido la unión entre el vector digerido y el inserto de interés se realizó por digestión con los mismos enzimas utilizados durante el clonaje y por PCR de colonias mediante cebadores específicos. La PCR de colonias se basa en la amplificación por PCR de la región que contiene el inserto mediante cebadores específicos. Como resultado de la amplificación aquellos vectores con el inserto de interés darán lugar a una banda de un tamaño similar al separarlo en un gel de agarosa.

### Reactivos y material:

- Palillos estériles.
- Taq polimerasa (0,25 µL) y tampón específico con MgCl<sub>2</sub> 10X (2,5 µL, ambos de Biotools).
- Cebadores específicos (sentido y antisentido): 1µL de stock a 10 µM.
- dNTPs (Biotools): 1 µL del stock a 10 mM.
- Agua hasta completar 25 µL.

Procedimiento: A partir de la placa de agarosa donde están las colonias procedentes de la transformación de los productos de ligación se “pican” con los palillos estériles colonias aisladas (6-10) y se introduce el palillo en un tubo de PCR con 5 µL de agua dejando una pequeña cantidad de las mismas. Preparamos una mezcla de Taq polimerasa, tampón, cebadores, dNTPs y agua y se reparte en los diferentes tubos de PCR. La reacción de PCR se lleva a cabo con las siguientes condiciones:

- desnaturalización 30 seg a 95°C.
- anillamiento: 30 seg a 55°C (x35).
- extensión: 1 min a 72°C.
- última etapa de extensión de 7 min a 72°C para la extensión de las cadenas que hayan podido quedar solo parcialmente sintetizadas.

El resultado de la amplificación se comprueba mediante la separación de los productos de la reacción en un gel de agarosa a una concentración entre 1-2%, dependiendo del tamaño del inserto.

## **7.6. Análisis de los niveles de ARNm**

El análisis de los niveles de ARNm de genes específicos respecto al total de los transcritos procedentes de la célula se realiza mediante la técnica de PCR a tiempo real. En comparación con la PCR convencional, la PCR a tiempo real permite la detección del producto de PCR a medida que se acumula. El análisis de los productos de la amplificación en la fase exponencial de la reacción proporciona una información más específica, sensible y reproducible a cerca del número de copias de una muestra o los niveles relativos entre muestras diferentes.

### **7.6.1 Obtención, cuantificación y análisis de calidad del ARN total**

Existen diferentes alternativas a la hora de realizar la purificación del ARNm de una muestra. Durante la tesis se han utilizado la técnica de extracción con fenol-cloroformo (Qiazol, Qiagen) y también kits (RNeasy Mini Kit, Qiagen) , que permiten una extracción más rápida y con un rendimiento equivalente a los métodos clásicos.

A la hora de manipular el ARN es necesario tomar una serie de precauciones debido a su extrema fragilidad y a la presencia de ARNasas endógenas y exógenas en la práctica totalidad de los objetos que entran en contacto con los seres humanos, así como la posibilidad de contaminar nuestra muestra. Se debe trabajar

con guantes y utilizar material específico libre de ARNasas. Por consiguiente, todo el material ha de estar perfectamente limpio y autoclavado. Además, las disoluciones se tienen que preparar con agua libre de ARNasas.

*Aislamiento de ARN total con el método de extracción con fenol-cloroformo*

El aislamiento de ARN por el método clásico de extracción con fenol-cloroformo se realizó utilizando el reactivo comercial Qiazol (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante. El Qiazol (tiocinato de guanidida) permite la lisis celular y permite la desnaturalización de las proteínas (incluyendo las ribonucleasas) y la separación del ARN ribosómico de los ribosomas.

Reactivos y material:

- Qiazol (Qiagen).
- Cloroformo.
- Isopropanol.
- Etanol 75%.

Procedimiento: Los ensayos se realizaron mediante la adición de un volumen de 700  $\mu\text{L}$  de Qiazol sobre la placa de cultivo de 6-10  $\text{cm}^2$  (el volumen de Qiazol puede variar según el número de células utilizados en el ensayo). Tras recoger el lisado celular se añade 1:5 de cloroformo, se agita durante 15 seg y el homogeneizado se deja reposar durante 2-3 min a temperatura ambiente. Después se procede a centrifugar el homogeneizado a 12000 x g durante 15 min a 4°C lo que permitirá la formación de dos fases, una acuosa que contiene el ARN total y una no acuosa que contiene el Qiazol junto con las proteínas. Recogeremos la fase acuosa evitando el contacto de la pipeta con la fase no acuosa para evitar posibles contaminaciones proteicas. Seguidamente procedemos a la precipitación del ARN con isopropanol (50% respecto a la cantidad de Qiazol utilizada inicialmente) durante 10 min a temperatura ambiente. En este paso podemos realizar favorecer la precipitación mediante una incubación durante 16 horas a -20°C junto con la adición de una sal como acetato de sodio a 0.3 M (que permite formar una capa iónica positiva alrededor de la carga negativa del ARN favoreciendo su

precipitación). Tras la precipitación se centrifugan las muestras 12000 x *g* durante 15 min a 4°C y se elimina con cuidado el sobrenadante. El pellet se resuspende en un volumen de etanol al 75% y se centrifuga a 7500 x *g* durante 5 min a 4°C. Las trazas de etanol restantes se eliminan por evaporación dejando secar el pellet al aire libre. Finalmente se resuspende el pellet en agua libre de ribonucleasas.

#### *Aislamiento de ARN total con el kit de extracción*

Durante la tesis se utilizó el kit de extracción de ARN total RNeasy Mini Kit (Qiagen) que permite obtener de una forma más rápida y sencilla cantidades similares de ARN y con el mismo nivel de pureza. La extracción se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **7.6.2 Cuantificación de ARN total**

El ARN obtenido se ha de cuantificar y verificar su calidad e integridad. Esto se realiza con un aparato llamado Nanodrop® (ND-1000 v3.1.0 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies, Inc.). Se coloca una gota del ARN eluido en agua en el menisco del aparato y mediante un método espectrofotométrico, obtenemos la concentración de la muestra y la curva de absorbancia de la misma, lo cual nos permite saber la calidad y la integridad de la muestra.

#### **7.6.3 Retrotranscripción o síntesis de ADNc**

Una vez aislado el ARN se procede a la síntesis del ADN complementario (ADNc) que servirá como molde en la reacción de PCR. La retrotranscripción se lleva a cabo con la transcriptasa reversa, una enzima de origen viral. Las más usadas son la del virus de la leucemia murina de Moloney (M-MLV) o del virus de la mieloblastosis aviar (AMV).

En nuestro caso se utilizó el kit de retrotranscripción High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) para la retrotranscripción de 0,5-2 µg de ARN total. Este kit se basa en la utilización de hexanucleótidos aleatorios

("random primers") para la amplificación del ARN, además de los dNTPs, la retrotranscriptasa y el inhibidor de ribonucleasas. Para la retrotranscripción del ARN se siguieron las instrucciones del fabricante. La retrotranscripción del ARN procedente de las muestras de linfocitos de individuos sanos se realizó utilizando la SuperScript III RNase H reverse transcriptase (Invitrogen).

#### **7.6.4 PCR a tiempo real (qPCR)**

En la PCR convencional solamente se puede detectar el producto de amplificación en el punto final de la reacción, en cambio la qPCR permite la detección del producto de PCR a medida que se acumula. Actualmente existen dos tipos de tecnología que permiten la detección de productos de qPCR basados todos ellos en la generación de una señal fluorescente que será proporcional a la cantidad de ADN amplificado. Los sistemas de detección por fluorescencia pueden ser agentes intercalantes o sondas específicas marcadas con fluorocromos. Los agentes intercalantes son fluorocromos que aumentan la emisión de fluorescencia cuando se unen al ADN de doble cadena. Este método tiene las ventajas de ser un proceso rápido, fácil y barato, aunque como inconveniente muestra una baja especificidad, ya que se pueden unir a productos generados inespecíficamente o a dímeros de *primers* (ejemplo *SYBER Green*). En cuanto a las sondas específicas, encontramos dos tipos, las de hidrólisis y las de hibridación. Ambas se basan en el principio de transferencia de energía por resonancia de fluorescencia, que es una interacción que ocurre sólo a muy corta distancia entre dos estados de excitación electrónica de dos moléculas fluorescentes en la que la longitud de onda de emisión de una de ellas coincide con la de excitación de la otra (ejemplo *TaqMan*).

Durante la presente tesis se han utilizado ambos métodos, *SYBER Green* (*SYBR Green PCR Master mix*, Applied Biosystems) y *TaqMan*. El primero se utilizó en los ensayos con CMLVs, mientras que el segundo se utilizó en los ensayos con linfocitos, ambos siguiendo las instrucciones del fabricante. En el caso de los cebadores tipo *Taqman* se utilizaron los siguientes: *RPLP0*, Hs99999902\_m1 y *CYCLIN B1*, Hs00259126\_m1, Assay-on-Demand. Los

cebadores utilizados mediante la técnica de *SYBER Green* se muestran en la **Tabla 4**.

**Tabla 4. Cebadores utilizados en los experimentos de qPCR.**

Gen	Cebador en sentido (5' a 3')	Cebador en antisentido (5' a 3')	TM
<b>NF-YA</b> <b>Rata</b>	GGAGCCTCTGATTGGGTTTC	GCCACGTTGTGTCCTGAAG	60°C
<b>CYCLIN B1</b> <b>Rata</b>	ATGCAGCACCTGGCTAAGAAC	GCATGCTTAGATGTTGCATACTTGT	58°C
<b>18S</b> <b>Rata</b>	CGGCTACCACATCCAAGGAA	AGCTGGAATTACCGCGGC	60°C
<b>CYCLIN B1</b> <b>Humana</b>	AGCTGCTGCCTGGTGAAGAG	GCCATGTTGATCTTCGCCTTA	60°C
<b>HPRT1</b> <b>Humano</b>	AATTGACACTGGCAAAACAATGC	ATGGTCAAGGTCGCAAGCTT	60°C

TM: Temperatura de melting. La eficiencia de los cebadores diseñados es de 2 o cercana a 2.

#### *Cuantificación relativa de la expresión génica*

La reacción de qPCR se basa en la determinación del ciclo en el que se detecta la amplificación de un determinado producto, y no en la cantidad del producto acumulado después de un determinado número de ciclos. Cuantas más copias del gen de interés hubiera inicialmente, antes se detectará un incremento de la fluorescencia. En los primeros ciclos de la PCR, hay pocos cambios en la fluorescencia y ésta es más inestable, a esta fase se le llama línea base ("*baseline*"). Se considera que hay amplificación de un producto cuando se detecta un incremento en la fluorescencia a partir de la línea base. Por otro lado, fijamos un umbral ("*threshold*") por encima de la línea base y común para todas las muestras que se encuentre en la región lineal de la curva de incremento de fluorescencia. El parámetro  $C_T$  (ciclo umbral o "*threshold cycle*") se define como el ciclo en el que la fluorescencia supera el umbral fijado y éste será el parámetro que nos permita realizar la cuantificación. Cuanto menor sea la  $C_T$  de una muestra, mayor será la

cantidad de producto inicial de la misma, ya que habrá alcanzado el umbral de fluorescencia en un menor número de ciclos.

Durante la presente tesis los cambios de expresión entre las condiciones estudiadas se analizaron mediante la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  que se representa de la siguiente manera:

$$\text{Ratio} = 2^{-[(Ct_{\text{Gen interés}} - Ct_{\text{Gen housekeeping}})] \text{ condición 2} - [(Ct_{\text{Gen interés}} - Ct_{\text{Gen housekeeping}})] \text{ condición 1}}$$

El  $\Delta Ct$  se define como el Ct de nuestro gen de interés – el Ct del gen endógeno o *housekeeping* (control interno). El  $\Delta\Delta Ct$  se define como la diferencia entre el  $\Delta Ct$  de una condición problema (2) y la control (1).

Los cebadores han sido diseñados manualmente mediante el software Primer Express o bien obtenidos en la literatura científica. En ambos casos se ha procedido a la comprobación de la correcta eficiencia de amplificación de los cebadores, así como la posibilidad de formación de dímeros.

Para el análisis de la eficiencia de los cebadores se procede a la generación de una curva patrón utilizando diluciones seriadas de un ADNc de interés. Tras el aislamiento de ARN y la posterior retrotranscripción de 1  $\mu\text{g}$  de ARN se procedió a diluir el ADNc obtenido obteniendo las siguientes muestras:

Muestra original (no diluida), 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10000

Tras la reacción de qPCR, se representó el logaritmo de la concentración de ADNc respecto a los Ct obtenidos para cada par de cebadores, y se realizaron curvas de regresión obteniéndose la ecuación de la recta calculándose la eficiencia para cada gen a partir de la pendiente de la recta según la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia} = 10^{-1/\text{pendiente de la recta}}$$

Además, para discriminar si las muestras con curva de amplificación positivas correspondieron a productos específicos o a dímeros de oligonucleótidos o

productos inespecíficos, se realizaron curvas de desnaturalización o disociación (“*melting curve*”) una vez finalizada la reacción. Durante las curvas de desnaturalización la reacción se calienta lentamente desde 50°C hasta 95°C monitorizando continuamente la fluorescencia. La temperatura a la cual el ADN se desnaturaliza ( $T_m$  o “*Temperature melting*”), se observa como una drástica caída de la fluorescencia debido a la disociación del SYBR Green, pudiéndose representar la derivada de la fluorescencia con respecto a la temperatura ( $-dT/dF$ ) frente a la temperatura. Los productos de PCR de diferente longitud y diferentes secuencias se desnaturalizan a diferentes temperaturas, observándose en el gráfico tantos picos como productos de PCR obtenidos. Así pues, con los pares de cebadores que resulten específicos y en cuya reacción de PCR se produzca un único producto, se observara un único pico en sus curvas de disociación.

## 8. Técnicas de análisis de interacciones ácido nucleico-proteína

Las técnicas de análisis de interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos utilizadas en esta tesis doctoral nos han permitido estudiar las interacciones entre factores de transcripción de interés y una secuencia de ADN específica, tanto *in vitro* (EMSA) como *in vivo* (Inmunoprecipitación de Cromatina (ChIP, del inglés “*Chromatine Immunoprecipitation*”)).

### 8.1. EMSA

El EMSA es una técnica rápida y sensible para la detección de interacciones ácido nucleico-proteína. Se basa en el principio de que el retraso electroforético producido al formarse un complejo proteína-ácido nucleico es menor respecto al ácido nucleico sólo, al ser separado en un gel en condiciones no desnaturalizantes. Esta técnica fue inicialmente descrita por Fried y colaboradores (Fried and Crothers 1981) y Garner y Revzin (Garner and Revzin 1981), aunque anteriormente encontramos algunos antecedentes en la literatura (Eisinger 1971; Varshavsky, Bakayev et al. 1976; Chelm and Geiduschek 1979).

### **8.1.1 Anillamiento de las cadenas de ADN**

Existen múltiples variantes asociadas al EMSA, permitiendo analizar las interacciones de proteínas sencillas o complejos proteicos a los ácidos nucleicos, así como estudiar la interacción de proteínas con diferentes tipos de ácidos nucleicos como ADN o ARN con diferentes estructuras (secundarias, terciarias, cuaternarias o incluso ADN circulares) (Hellman and Fried 2007). En los experimentos de EMSA realizados se incubaron oligonucleótidos de doble cadena con nuestros extractos proteicos de interés.

#### Reactivos y Material:

- Tampón de anillamiento: 100 mM Tris-HCl (pH: 8); 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 500 mM NaCl. Preparamos un stock a concentración 10x.
- Oligonucleótidos de cadena sencilla (cadena en sentido y cadena en antisentido, Sigma-Aldrich) a 100 pmol/μL.
- Termobloque.

Procedimiento: Se lleva a cabo la reacción de anillamiento mezclando Tampón de anillamiento 1x, 250 pmoles de cada oligonucleótido de cadena sencilla (en sentido y antisentido) y agua destilada hasta completar el volumen. La solución se calienta durante 10 min en un termobloque a 95°C permitiendo la separación de los anillamientos previos formados por los oligonucleótidos. Tras este tiempo se apaga el termobloque y se deja enfriar hasta temperatura ambiente permitiendo el anillamiento entre cadenas complementarias y formando así oligonucleótidos de doble cadena. Esta solución se encuentra a 10 pmol/μL (10x).

### **8.1.2 Generación de sondas mediante marcaje radiactivo del oligonucleótido**

La detección de los complejos ácido nucleico-proteína separados según su movilidad electroforética en geles nativos (no desnaturizantes) se puede realizar mediante el marcaje del ácido nucleico por distintos métodos. Dependiendo de la concentración de proteína y ácido nucleico de nuestra solución, así como de la

eficiencia de unión entre ambas moléculas será necesario el uso de técnicas de detección con mayor o menor sensibilidad. La técnica de detección más sensible es el marcaje del ácido nucleico con radioisótopos, mientras que otras menos sensibles aunque de menor riesgo para el manipulador son los marcajes fluorescentes, quimioluminiscentes o inmunohistoquímicos (Hellman and Fried 2007). Durante los experimentos realizados en la presente tesis se utilizó el marcaje radiactivo de los ácidos nucleicos con  $P^{32}$ , localizado en el fosfato en posición  $\gamma$  del ATP.

#### Reactivos y Material:

- $P^{32}$ - $\gamma$ -ATP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ L, Perkin Elmer).
- Polinucleótido quinasa (PNK, del inglés "*Polynucleotide Kinase*", New England Biolabs).
- Tampón de la PNK 10X.
- Oligonucleótido de doble cadena (10 pmol/ $\mu$ L).
- Sephadex G-50 (GE healthcare).
- Cuentas de cristal (Sigma-Aldrich).
- Termobloque.
- Microfuga.
- Contador de centelleo.

Procedimiento: El marcaje radiactivo del oligonucleótido de doble cadena se produce al unirse un ATP marcado con  $P^{32}$  al extremo de cada oligonucleótido gracias a la acción de la enzima PNK. Los oligonucleótidos de doble cadena utilizados durante la presente tesis se muestran en la **Tabla 5**. Inicialmente se mezcla 1 pmol de oligonucleótido de doble cadena junto con el tampón de la PNK 1X y se incuba a 65°C durante 5 min para eliminar posibles estructuras secundarias del ADN. Tras esto se incuba la solución con el oligonucleótido con 5-10  $\mu$ Ci de  $P^{32}$ - $\gamma$ -ATP y 1  $\mu$ L de PNK a 37°C durante 45 a 60 min. Durante este periodo de tiempo procedemos a generar columnas de Sephadex G-50 para eliminar el exceso de nucleótidos radiactivos no incorporados. Las columnas se generan con una base de cuentas de cristal y una solución de Sephadex G-25 previamente autoclavada sobre un eppedendor de 0.5 mL. Una vez hechas las columnas de purificación y terminada la incubación, se coloca la solución radiactiva en el centro

de cada columna que a su vez se encontrará situada en el recipiente recolector (eppendorf de 2 mL) y se centrifuga durante 5 min a 700 g. La solución recogida y purificada (aproximadamente 10  $\mu$ L) se lleva a un volumen de 100  $\mu$ L obteniendo una concentración final de 10 fmol/ $\mu$ L. Finalmente, tomamos 1  $\mu$ L de cada sonda marcada y la colocamos en un vial lleno con líquido de centelleo y procedemos a la lectura en el contador de centelleo. El conteo de las cuentas por min (cpm) de los viales en el contador de centelleo debe encontrarse entre 50000-100000 cpm/ $\mu$ L.

**Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en EMSA**

Sondas	Secuencia
-957T	5'-GAGTCTCTATTGGCTCTTATACC-3'
-957C	5'-GAGTCTCTATCGGCTCTTATACC-3'
NF-Y (-25/-7)	5'-GGCAGCCGCCAATGGGAAGG-3'
NF-Y(-26/-1) (NF-Y consenso)	5'-CCGCAGCCGCCAATGGGAAGGGAGTGA-3
NF-Y(-26/-1) mutante (NF-Y mutante)	5'-CCGCAGCCG <u>TT</u> AATGGGAAGGGAGTGA-3'
-475C	5'-TAATGTGTGACCCTGGCAAAG-3'
-475T	5'-TAATGTGTGATCCTGGCAAAG-3'
+102G	5'-TCTGCTGGGTGTAGGTCCTTGGCTGGT-3'
+102T	5'-TCTGCTGGTTGTAGGTCCTTGGCTGGT-3'
AP-1 consenso	5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGAA-3'
SP1 consenso	5'-ATTCGATCGGGGCGGGGCGAGC-3'

Únicamente se muestra la hebra positiva del oligonucleótido de doble cadena. Los oligonucleótidos -957T y -957C son portadores de las variantes polimórficas T y C del SNP rs350099, respectivamente. Los oligonucleótidos NF-Y(-25/-7) y NF-Y(-26/-1) contienen el sitio de unión a ADN de NF-Y (caja CCAAT) presente en el promotor del gen humano *CCNB1* en la posición -17/-13. El oligonucleótido NF-Y(-26/-1) mutante porta una mutación CC→TT que elimina la caja CCAAT del oligonucleótido NF-Y(-26/-1) (los nucleótidos mutados se muestran subrayados). Los oligonucleótidos -475C y -475T son portadores de las variantes polimórficas C y T del SNP rs350104, respectivamente. El oligonucleótido AP-1 consenso es portador del sitio de unión consenso a ADN de AP-1 (caja TGAG). Los oligonucleótidos +102G y +102T son portadores de las variantes polimórficas G y T del SNP rs164390, respectivamente. El oligonucleótido SP1 consenso es portador del sitio de unión consenso a ADN de SP1 (caja GC).

### 8.1.3 Reacción de unión, electroforesis, secado y revelado

La reacción de unión es el proceso que permite la unión de nuestra proteína de interés y el oligonucleótido de doble cadena marcado radiactivamente (sonda). Esta reacción requiere de la incubación de la proteína purificada o bien un extracto proteico que contenga dicha proteína y la sonda de interés. Existen diversos factores que influyen en la realización del EMSA y que varían en función de la/s proteína/s y el ácido nucleico de interés, como la selección del ácido nucleico diana, las condiciones de la reacción de unión o las condiciones de la electroforesis.

#### Reactivos y materiales:

- Tampón de unión: 4% glicerol; 3mM MgCl<sub>2</sub>; 60 mM KCl; 20 mM Tris-HCl (pH 7.8), 0.5 mM EDTA y 0.1 mM DTT.
- Poli-[dl-dC] 1 mg/mL (Sigma).
- Extracto proteico.
- Sonda (10 fmol/μL).
- Tampón TBE 5X (Tris Base 54 g/L, Ácido Bórico 27.5 g/L, EDTA 2.92 g/L a pH: 8).
- Tampón de carga: 1X Tampón de unión y xileno de cianol.
- Poliacrilamida 80:1 (para 100 mL: 46.9 mL de acrilamida-Bisacrilamida 37:1 (BioRad) y 53.1 mL de Acrilamida 30:0 (BioRad)).
- Persulfato amónico al 10%.
- TEMED.
- Sistema de electroforesis Protean II xi Cell (Bio-Rad).
- Secador de geles (Bio-Rad).
- Metamorph y ImageQuant v5.2 (GE healthcare).

Procedimiento: La reacción de unión se lleva a cabo incubando en hielo cantidades variables de extracto proteico (3-5 μg en extractos proteicos de la fracción nuclear soluble, 10 μg en lisados celulares totales o 15-20 μg para lisados totales de tejido), 1-2 μg de poli-[dl-dC] y 1X de Tampón de unión durante 10 min. Esta primera incubación con el poli-[dl-dC] permite reducir las interacciones inespecíficas al ser un substrato general de las proteínas de unión a ADN. La solución obtenida se

incuba con 1-2  $\mu$ L de sonda radiactiva durante 30-45 min en hielo. Es muy importante realizar una incubación sin extracto proteico que nos permite determinar si las bandas visualizadas posteriormente son específicas o no de las proteínas presentes en el extracto. Finalizada esta segunda incubación, se añade el tampón de carga y se cargan las muestras en un gel nativo de poliacrilamida al 5% (80:1). Los geles de poliacrilamida al 5% se preparan con poliacrilamida 80:1, TBE 1X, persulfato amónico al 10%, y TEMED como desencadenante de la reacción de polimerización en un soporte de vidrio adaptado al sistema de electroforesis Protean II xi Cell. La electroforesis se lleva a cabo en TBE 0.5X a 200V durante 2 horas con refrigeración, bien en cámara fría a 4-5°C o bien haciendo pasar un flujo de agua continuo a través del sistema de electroforesis. La duración de la electroforesis es un paso crítico del ensayo pues una separación demasiado larga puede dar lugar a que los complejos ácido nucleico-proteína formados se rompan y no observemos un retraso en la movilidad electroforética. Tras la separación de los complejos ácido nucleico-proteína se procede al secado del gel. Sacamos el gel de los vidrios donde se polimerizó, se coloca sobre 3 hojas de papel Whattman y los secamos en el secador de geles durante 2 horas a 80°C. Una vez secados los geles se procede al revelado por autoradiografía. Para ello colocamos, en condiciones de oscuridad, el gel radiactivo y una película de fotografía en un casete que no permita la entrada de luz. El tiempo de exposición varía desde horas a días hasta conseguir la visualización óptima de los complejos ácido nucleico-proteína formados. La intensidad de las bandas obtenidas se cuantificó mediante los *softwares* Metamorph y ImageQuant v5.2.

#### **8.1.4 Experimentos de competición y supershift**

En la presente memoria se han realizado variantes dentro del propio EMSA, como los ensayos de competición y de *supershift*.

Los **ensayos de competición** se basan en evitar la unión de la proteína de interés y la sonda radiactiva mediante la adición de un exceso del oligonucleótido de doble cadena sin marcar radiactivamente, también llamado “sonda fría”. En los experimentos realizados se han utilizado como sondas frías tanto los mismos como

diferentes oligonucleótidos utilizados como sondas radiactivas, según el objetivo del ensayo.

Procedimiento: Tras la primera incubación de la reacción de unión y previo a la incubación con la sonda radiactiva se añade un exceso (10-300 veces) de oligonucleótido de doble cadena y se incuba en hielo durante 10-15 min. Esta incubación permitirá la unión de las proteínas al oligonucleótido disminuyendo la posibilidad de unión a la sonda radiactiva que añadimos posteriormente. Como resultado observaremos una disminución o desaparición de la banda que representa el complejo formado por la proteína y la sonda radiactiva.

Los **ensayos de supershift** se basan en la identificación de las proteínas que forman parte de los complejos ácido nucleico-proteína mediante la adición de anticuerpos específicos frente a proteínas que pensamos forman parte de dichos complejos. La unión del anticuerpo a la proteína, que a su vez se haya unida a la sonda, resulta en una menor movilidad electroforética respecto a los complejos formados únicamente por la proteína y la sonda provocando lo que se denomina un “súper-retraso” o “*supershift*”.

Procedimiento: Durante los ensayos de *supershift* existen dos posibilidades dependiendo de si la adición del anticuerpo se realiza tras haber incubado el extracto proteico con la sonda radiactiva o bien antes de la incubación con ésta. Preferentemente durante esta tesis se ha optado por la adición del anticuerpo posteriormente a la incubación entre extracto proteico y sonda radiactiva. En ambas situaciones se añaden de 1-2 µg de anticuerpo y se incuba en hielo durante 20 min. En los ensayos de *supershift* se incorporó un control de la especificidad del anticuerpo que consiste en la utilización de un anticuerpo con el mismo isotipo que el anticuerpo de interés.

## 8.2. Ensayo de ChIP

El ensayo de ChIP es una técnica que permite la investigación de las interacciones *in vivo* proteína-ADN en el contexto celular. Esta técnica se ha

utilizado para el análisis de modificaciones post-traduccionales y variantes de histonas, sitios de unión a ADN de factores de transcripción o proteínas asociadas a cromosomas.

El principio del ChIP es la inmunoprecipitación selectiva de la proteína de interés en una muestra de cromatina y la posterior detección de las secuencia de ADN asociadas a ella. Existen múltiples variantes de la técnica, sin embargo, la principal se basa el uso de formaldehído que permite la fijación reversible (termosensible) entre la proteína y el ADN mediante la formación de enlaces covalentes entre ambos. El uso del formaldehído para el estudio de las interacciones ADN-histona se inició en la segunda mitad de 1970 y junto con el desarrollo de anticuerpos frente a histonas permitió el desarrollo del ensayo de ChIP por Solomon y colaboradores (Solomon, Larsen et al. 1988). Esta técnica ha sido posteriormente refinada y mejorada (Orlando 2000), apareciendo múltiples variantes de la misma (Collas 2009).

En la presente tesis se ha desarrollado la técnica de ChIP basada en la utilización del agente fijador formaldehído. El uso de esta técnica se ha centrado en el análisis de la interacción de factores de transcripción con su secuencia consenso de unión a ADN.

### **8.2.1 Fijación de las células**

#### Reactivos y Material:

- Formaldehído 37.5% (Sigma).
- 1M Tris-HCl (pH: 8.8).
- Rascador celular.
- Microcentrífuga termostaticada.

Procedimiento: Las células ( $6-8 \cdot 10^8$ ) en placa de cultivo con medio completo se fijan con la adición de formaldehído a una concentración final del 1% durante exactamente 10 min. La fijación del formaldehído se detiene con 1:20 de Tris-HCl a pH 8.8. Tras esto se lavan las células con PBS frío 3 veces durante 5 min cada uno y se recogen las células con un rascador celular. Las células se transfieren a un

tubo de 15 mL y se centrifugan a 1400 rpm durante 5 min en frío. En este punto podemos congelar el pellet a -80°C durante un máximo de 1 mes.

### 8.2.2 Lisis celular y sonicación

#### Reactivos y Material:

- Tampón LB1: 50 mM Hepes-KOH (pH 7.5), 140 mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glicerol, 0.5% NP-40, 0.25% Tritón X-100. Añadir coctel de inhibidores de proteasas *Complete* 1x (en el momento de uso).
- Tampón LB2: 10 mM Tris-HCl (pH 8), 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA. Añadir *Complete* 1x (en el momento de uso).
- Tampón LB3: 10 mM Tris-HCl (pH 8), 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, 0.1% deoxicolato sódico y 0.5% N-lauroilsarcosina. Añadir *Complete* 1x (en el momento de uso).
- Sonicador Bioruptor (Diagenode).

Procedimiento: El pellet celular se resuspende en 5 mL de LB1 y mantiene en hielo durante 10 min, produciendo la lisis de la membrana citoplasmática y liberando los núcleos. Seguidamente se centrifuga a 1350 g durante 5 min a 4°C. El pellet nuclear obtenido se resuspende en 5 mL de LB2 y se agita suavemente durante 10 min a temperatura ambiente. El tampón LB2 eliminará los detergentes que quedan procedentes del tampón LB1. Tras esta incubación se centrifuga a 1350 g durante 5 min a 4°C. Finalmente se resuspende el nuevo pellet en 3 mL de tampón LB3.

Las muestras resuspendidas en tampón LB3 se sonicarán en el BioRuptor (sonicador de baño) a máxima intensidad durante 90-120 min. La suspensión sonicada se centrifuga a máxima velocidad durante 10 min a 4°C tras haber añadido Tritón X-100 a una concentración final del 1%. El contenido de la suspensión será la cromatina junto con las proteínas asociadas a esta y estará lista para realizar la inmunoprecipitación. Es necesario guardar una cierta cantidad de cromatina sin inmunoprecipitar (WCE, del inglés "Whole Cell Extract") como control positivo del CHIP.

### **8.2.3 Bloqueo, unión del anticuerpo a las bolas magnéticas e inmunoprecipitación**

#### Reactivos y Material

- Proteína G unida a bolas magnéticas (Invitrogen).
- Gradilla magnética.
- Solución de Bloqueo: PBS 1X y 0.5% de Albúmina sérica bovina.
- Anticuerpo policlonal de conejo anti-NF-YA (sc-10779X, Santa Cruz) y Control de isotipo, Igg de conejo (sc-202, Santa Cruz).

Procedimiento: Utilizando la gradilla magnética se procede al lavado y bloqueo de la proteína G con las bolas magnéticas resuspendiendo en la solución de bloqueo al menos 5 veces. La unión del anticuerpo a la proteína G-bolas magnéticas se consigue mediante incubación durante 16 horas a 4°C en rotación. Tras la incubación se lava 3 veces más con la solución de bloqueo. Para la inmunoprecipitación de la cromatina se incuban los complejos anticuerpo-proteína G-bolas magnéticas con los extractos de cromatina durante 16 horas a 4°C y en rotación.

### **8.2.4 Lavado, elución, separación de la unión proteína-ADN y purificación del ADN**

#### Reactivos y Material:

- Tampón de lavado (RIPA): 50 mM Hepes-KOH (pH: 7.6); 500 mM LiCl; 1 mM EDTA, 1% NP-40 y 0.7% deoxicolato sódico.
- Tampón TE: 10 mM Tris-Cl (pH: 7.5); 1 mM EDTA.
- Tampón de elución: 1X Tris-EDTA, 2% SDS.
- Termobloque.

Procedimiento: Utilizando la gradilla magnética se realizan 5 lavados de 5 min cada uno de los complejos anticuerpo-Proteína G-bolas en tampón RIPA seguidos de un lavado de 5 min con tampón TE. Tras una centrifugación a 960g durante 3 min a 4°C recuperamos las bolas que resuspendemos en tampón de elución. La elución

se realiza incubando a 65° durante 15 min en el termobloque y tras este tiempo se recuperan las bolas centrifugando a máxima velocidad durante 1 min.

Finalmente se procede a la rotura de los enlaces covalentes que mantienen unidos la proteínas y ADN incubando a 65°C durante 16 horas. Se procede de igual manera con la muestra no inmunoprecipitada, WCE.

El ADN obtenido se purifica mediante el uso de las columnas de purificación Qiaquick (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y las secuencias fueron analizadas mediante la técnica de qPCR. Las secuencias de los cebadores utilizados en la identificación de la secuencia CCAAT localizada en el promotor del gen *CCNB1* se describen en la **Tabla 6**.

**Tabla 6. Cebadores utilizados en los experimentos de ChIP.**

Gen	Cebador en sentido (5' to 3')	Cebador en antisentido (5' to 3')	TM
<b><i>CYCLIN B1</i></b> <i>Rata</i>	GCTCTGCCATTTATCATCACT	TGACTGCCAAGCAAGGAAGC	67°C
<b><i>CYCLIN B1</i></b> <i>Humana</i>	CGATCGCCCTGGAAACGCATT	CCAGCAGAAACCAACAGCCGT	72°C

TM: Temperatura de melting.

## 9. Análisis de la actividad transcripcional mediante el gen reportero de la luciferasa

El análisis de la actividad transcripcional de un promotor específico se ha realizado mediante la medición de la luminiscencia emitida por la enzima luciferasa de la luciérnaga, *Photinus pyralis*. La luciferasa es una enzima oxidativa que produce la oxidación del substrato, luciferina, en oxiluciferina más luz. La técnica se basa en la generación de una construcción plasmídica que contenga el gen de la luciferasa bajo el control de un promotor de interés. La transfección de este plásmido en el interior de células vivas permite la expresión de la luciferasa de forma dependiente a la actividad transcripcional del promotor bajo el cual se

encuentra regulada. Durante la presente tesis los promotores de interés se subclonaron en el plásmido pGL3 promoter (Promega) que se caracteriza por presentar un promotor mínimo que controla la expresión del gen de la luciferasa y una región previa donde insertaremos nuestra región reguladora. El actividad luciferasa se analizó mediante el kit Dual Luciferase Reporter Assay (Promega) y el luminómetro Wallac 1420 Victor (Perkin Elmer, Waltham, MA).

Los plásmidos reporteros utilizados en la presente tesis contienen las siguientes secuencias reguladoras del gen reportero de la luciferasa, detalladas en la **Tabla 7**.

**Tabla 7. Secuencia del tándem de secuencias repetidas que controlan la expresión del gen reportero de la luciferasa.**

<b>Construcción</b>	<b>Secuencia en sentido*</b>
3x(-957T)	5'-CGAGTCTCTATTGGCTCTTATAC/CGAGTCTCTAT TGGCTCTTATAC/CGAGTCTCTATTGGCTCTTATAC/CC-3'
3x(-957C)	5'-CGAGTCTCTATCGGCTCTTATAC/CGAGTCTCTATC GGCTCTTATAC/CGAGTCTCTATCGGCTCTTATAC/CC-3'
3x(-475T)	5'-CTAATGTGTGATCCTGGCAAAG/TAATGTGTGA TCCTGGCAAAG/TAATGTGTGATCCTGGCAAAG/C-3'
3x(-475C)	5'-CTAATGTGTGACCCTGGCAAAG/TAATGTGTGA CCCTGGCAAAG/TAATGTGTGACCCTGGCAAAG/C-3'
3x(+102G)	5'-TCTGCTGGGTGTAGGTCCTTGGCTGGT/TCTGCTGGGTGTA GGTCCTTGGCTGGT/TCTGCTGGGTGTAGGTCCTTGGCTGGT-3'
3x(+102T)	5'-TCTGCTGGTTGTAGGTCCTTGGCTGGT/TCTGCTGGTTGTA GGTCCTTGGCTGGT/TCTGCTGGTTGTAGGTCCTTGGCTGGT-3'

\*Únicamente se muestra la hebra positiva del oligonucleótido de doble cadena.

**Reactivos:**

- Tampón TEN: 0.1 M Tris-Cl (pH 8.0); 0.01 M EDTA (pH 8.0); 1 M NaCl.
- Rascador celular.
- Dual Luciferase Reporter Assay (Promega).
- Placa de 96 pocillos opaca.
- Luminómetro Wallac 1420 Victor (Perkin Elmer).

**Procedimiento:** Células U2OS en crecimiento asincrónico con medio completo se co-transfectaron mediante el método de fosfato cálcico con 1 µg de las

construcciones (**Tabla 7**) más 0.1 µg de pRL-TK-Renilla (Promega). El plásmido pRL-TK-Renilla se utiliza como control de la eficiencia de transfección y se encuentra controlado por el promotor de la timidina quinasa. Tras 24 horas de expresión, eliminamos el medio de cultivo, lavamos con tampón TEN frío y levantamos las células con un rascador celular y centrifugamos a 1500 rpm durante 5 min a 4°C. A partir de este punto se continuó el análisis de la actividad luciferasa mediante el kit Dual Luciferase Reporter Assay siguiendo las instrucciones del fabricante. El pellet celular se lisa con el tampón de lisis suministrado PLB 1x y los lisados se colocan en una placa de 96 pocillos opaca. Primero medimos la actividad de la luciferasa de luciérnaga mediante la adición del reactivo LAR II en el luminómetro. Tras esto se añade el reactivo Stop and Glo que detendrá la primera reacción y activará la reacción de oxidación de la luciferasa de *Renilla*, volviendo a medir la luminiscencia. Los datos obtenidos se reflejan como la relación entre la luminiscencia producida por la luciferasa de luciérnaga y la producida por la luciferasa de *Renilla*.

## 10. Estudios histológicos

Los tejidos murinos a partir de los que se obtuvieron cortes histológicos para su estudio fueron inicio de la aorta y válvulas. Los estudios histológicos tanto para inmunohistoquímica como inmunofluorescencia de tejido se realizaron en tejidos incluidos en parafina como método de conservación. La inclusión en parafina requiere un proceso de fijación del tejido para evitar modificaciones respecto a las condiciones normales del tejido. Tras la fijación se realiza una fase de deshidratación que permita la eliminación del agua del tejido y su posterior sustitución por la parafina, permitiendo el posterior corte en secciones.

### Reactivos:

- 4% de Paraformaldehido (PFA).
- Etanol: 50, 70, 80, 95 y 99,9%.
- Xileno.
- Parafina (McCormick Scientific).
- Sistema de inclusión (AP280-1, AP280-2 y AP280-3).

- Microtomo (Microm International GmbH).

### **10.1. Fijación de los tejidos**

Tras la perfusión del animal con suero salino se continúa con una segunda perfusión *in situ* con 4% PFA en PBS, lo que permitirá una primera fijación del tejido. Tras la extracción de los tejidos del animal se procede a una segunda fijación mediante la inmersión de éstos en una solución de 4% de PFA durante 16-24 horas a 4°C. Después se conservaron en una solución de 0.02% de acida sódica en PBS a 4°C hasta su utilización.

### **10.2. Deshidratación de los tejidos**

Después de fijar los tejidos se sitúan los tejidos en casetes de histología y se procede a la deshidratación por inmersión durante 30 min en soluciones de etanol de gradación creciente: 50, 70, 80, 95 y 99,9% etanol (los lavados con 95 y 99,9% etanol se realizan por duplicado). Seguidamente se procedió a dos incubaciones de 15 min en xileno.

### **10.3. Inclusión en parafina y obtención de cortes**

Los tejidos se incluyeron en parafina previamente licuada a 56°C. A continuación se trasvasaron a un nuevo baño de parafina y se dejaron aproximadamente 16 horas para un correcto embebido del tejido. Los tejidos en parafina se montaron en bloques de parafina mediante un proceso de enfriamiento de la parafina con una adecuada orientación de los tejidos. Los bloques de parafina se cortaron en secciones con ayuda del micrótopo.

## 10.4. Preparación de los cortes histológicos

Previo a la realización de los ensayos de inmunohistología de tejido es necesario el tratamiento de los cortes histológicos. Primero se procede a la eliminación de la parafina en la cual se encuentran embebidos mediante un proceso de rehidratación siguiendo el proceso contrario a la deshidratación realizada anteriormente: primero se realizan 3 lavados de 5 min cada uno en xileno, 2 lavados de 5 min en etanol 99.9% y 95% y finalmente 2 lavados de 2 min en etanol 70% y 50%. Tras este proceso se lava durante 5 min en agua destilada y se deja en PBS a 4°C (el tiempo de conservación en este punto es de un máximo de una semana).

## 10.5. Tinción tricrómica de Masson

El contenido en colágeno se determinó mediante la tinción tricrómica de Masson en la cual la hematoxilina de Weigert tiñe los núcleos de negro, la solución de fucsina tiñe las fibras musculares y la solución verde luz tiñe las fibras de colágeno.

### Reactivos y material:

- Hematoxilina de Weigert: solución 1% de hematoxilina (Panreac) en etanol absoluto; solución que, una vez madura, se mezcla en una proporción 1:1 con una solución de 4% de cloruro férrico al 30% y 1% de ácido clorhídrico.
- Solución de fucsina: 1% fucsina ácida (Sigma); 0,2% ácido acético glacial (Panreac).
- Solución de verde luz: 1% verde luz (Fisher Scientific); 0,5% ácido acético glacial (Panreac).
- Medio de montaje Eukitt®.

Procedimiento: Tras la preparación de la hematoxilina de Weigert, se debe utilizar inmediatamente incubando los cortes histológicos durante 5 min, seguido de un lavado en agua durante 10 min. Transcurrido el tiempo se incuba con solución de fucsina diluida 1:10, seguido de tres lavados de 2 min en agua acética (1% ácido

acético glacial) e inmersión de las muestras en solución de ácido fosfotúngstico 5%. Tras lo cual realizamos un nuevo lavado en agua acética durante 5 min e incubamos con solución verde luz. Tras nuevos lavados en agua acética durante 2 min, procedemos al montaje de los portas con medio Eukitt® reduciendo el tiempo de incubación de los alcoholes de 2 min a 30 seg para evitar el desteñido del Verde Luz.

## 10.6. Inmunohistología

Tras la preparación de los cortes histológicos podemos proceder con el protocolo de la inmunohistología que se compone de forma general de los siguientes pasos:

### 10.6.1 *Desenmascaramiento de antígeno*

El desenmascaramiento de antígeno consiste en la rotura de los enlaces formados por la fijación con el formaldehído dejando accesible regiones antigénicas antes escondidas. Existen diferentes métodos de desenmascaramiento como el enzimático (tratamiento con proteinasa K, tripsina, pepsina, etc.) o térmico. El desenmascaramiento térmico se lleva a cabo mediante incubación de la muestra a elevadas temperaturas durante un corto periodo de tiempo. Esta incubación se puede realizar en diferentes tipos de tampones para favorecer el desenmascaramiento del antígeno. Durante la presente tesis se llevó a cabo el protocolo de desenmascaramiento de antígeno mediante calor en tampón citrato para todos los anticuerpos utilizados.

Procedimiento: Los cortes histológicos se introdujeron dentro de una olla a presión con tampón citrato 10 mM a pH 6.5 precalentado y se cerró hasta alcanzar una temperatura de 95°C, deteniendo la incubación pasados 3 min. Los cortes se dejaron enfriar hasta temperatura ambiente y se guardaron posteriormente en PBS.

### **10.6.2 Bloqueo de la actividad peroxidasa endógena**

Los cortes histológicos se incubaron en una solución de peróxido de hidrógeno al 3% en PBS durante 30 min. Transcurrido este tiempo se lavaron en PBS 3 veces durante 5 min cada uno. Este paso se realizó únicamente cuando se reveló el complejo antígeno/anticuerpo utilizando la solución 3,3' Diaminobenzidina (DAB) como sustrato cromogénico de la actividad peroxidasa.

### **10.6.3 Bloqueo de las uniones inespecíficas antígeno/anticuerpo**

Para evitar la unión inespecífica del anticuerpo al antígeno se procedió al bloqueo del tejido mediante saturación de las uniones del anticuerpo con proteínas presentes en las células. Para ello se incubaron las muestras en una solución de suero al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Preferiblemente se utilizará suero del animal que se inmunizó para obtener el anticuerpo secundario.

### **10.6.4 Incubación con anticuerpo primario**

Los cortes histológicos se incubaron con una solución de PBS con 5 % de suero del animal donde se produjo el anticuerpo primario (solución de bloqueo) y el anticuerpo primario. Los anticuerpos utilizados se detallan en la **Tabla 8**.

### **10.6.5 Incubación con anticuerpo secundario**

Tras la incubación con el anticuerpo primario se eliminó el exceso de anticuerpo mediante lavados sucesivos con PBS + 0.02% Tween 20 de 5 min cada uno. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario diluido en solución de bloqueo a una concentración, tiempo y condiciones de incubación que variaron según el anticuerpo secundario utilizado. Los anticuerpos utilizados se detallan en la **Tabla 9**.

**Tabla 8. Anticuerpos primarios utilizados en los experimentos de inmunohistología**

Anticuerpo	Casa Comercial (Referencia)	Especie de origen	Dilución de uso	Técnica
Anti-NF-YA	Santa Cruz (SC-10779X)	Policlonal de conejo	1:500-1:2000	IHC, IF
Anti-cyclin B1	Santa Cruz (SC-752)	Policlonal de conejo	1:100	IHC
Anti-PCNA	Santa Cruz (SC-7907)	Policlonal de conejo	1:200	IHC
Anti-Ki67	Vitro (Clone SP6, MAD-000310QD)	Policlonal de conejo	Sin dilución	IHC
Anti-GFP	Abcam (ab290)	Policlonal de conejo	1/100	IHC
Anti-Mac3	Santa Cruz (SC-19991)	Policlonal de rata	1/500	IF
Anti-cyclin B1	Santa Cruz (SC-245)	Monoclonal de ratón	1/100	IF
Anti-smooth muscle $\alpha$ -actin-Cy3	Sigma (C6198)	Monoclonal de ratón	1/1000	IF (conjugado a fluorocromo Cy3)

**Tabla 9. Anticuerpos secundarios utilizados en los experimentos de inmunohistoquímica**

Anticuerpo	Casa Comercial (Referencia)	Especie de origen	Dilución de uso	Técnica
Anti-conejo-HRP	Santa Cruz (sc-2004)	Cabra	1:500	IHC (tejido de ratón/rata)
Anti-conejo-biotinilado	Vector Labs (BA-100)	Cabra	1:500	IHC (tejido aterosclerótico humano)
Anti-conejo-biotinilado	Jackson Immunoresearch (111-060-003)	Cabra	1:500	IHC (tejido restenótico de ratón y humano)

#### **10.6.6 Revelado de los complejos antígeno-anticuerpo y montaje para microscopía**

Los anticuerpos secundarios utilizados se encuentran conjugados directamente a la enzima de peroxidasa de rábano se revelaron mediante incubación con el substrato cromogénico DAB. El DAB es oxidado por la peroxidasa dando lugar a un color marrón oscuro. La reacción se detiene mediante

inmersión del tejido en agua destilada. El montaje de los portaobjetos se realizó utilizando el medio de montaje Eukitt, para lo cual se deshidrataron los tejidos mediante inmersiones en alcoholes de gradación ascendente (70, 80, 95 y 99.9%) durante 2 min cada uno seguido de una inmersión en xileno.

#### **10.6.7 Inmunohistoquímica de tejido humano**

La inmunohistoquímica de secciones de arteria de especímenes humanos se realizó con variantes respecto al protocolo general. Las muestras no fueron tratadas para el proceso de desenmascaramiento de antígeno y se sustituyó el anticuerpo secundario utilizado por uno biotinilado. El revelado se realizó mediante la incubación con Vectastatin ABC reagent (Vector) siguiendo las instrucciones del fabricante y previo a la incubación con DAB.

#### **10.6.8 Inmunofluorescencias de tejido**

Las inmunofluorescencias en tejido se llevan a cabo siguiendo el mismo protocolo general de inmunohistología con la excepción de que los anticuerpos secundarios utilizados se encuentran conjugados a un fluoróforo, permitiendo la detección mediante el uso de un microscopio de fluorescencia. Los anticuerpos secundarios utilizados se detallan en la **Tabla 10**.

En todos los experimentos de inmunofluorescencia se realizaron los siguientes controles:

1) Muestras sin incubar, ni con anticuerpo primario ni con anticuerpo secundario, para poder determinar el nivel de fluorescencia basal de la muestra para cada canal de recogida de la fluorescencia emitida.

2) En caso de que el anticuerpo primario no estuviera directamente conjugado a fluorocromo y fuese necesaria la incubación con un anticuerpo secundario fluorescente, se incluirá una muestra control incubada únicamente con anticuerpo

secundario (para poder detectar uniones inespecíficas del anticuerpo secundario a algún antígeno presente en la muestra).

**Tabla 10. Anticuerpos secundarios utilizados en los experimentos de inmunofluorescencia**

Anticuerpo	Casa		Especie de origen	Dilución de uso	Técnica
	Comercial (Referencia)	Fluorocromo			
Anti-conejo	Invitrogen (A11034)	Alexa 488	Cabra	1:500	IF
Anti-conejo	Invitrogen (A21429)	Alexa 555	Cabra	1:500	IF
Anti-ratón	Invitrogen (A11029)	Alexa 488	Cabra	1:500	IF
Anti-rata	Invitrogen (A21094)	Alexa 633	Cabra	1:500	IF

IF: Inmunofluorescencia

3) En los casos en los que se realizó una inmunofluorescencia doble se realizaron otros dos tipos de controles:

- Realizar cada inmunofluorescencia por separado para poder determinar que la fluorescencia recogida en el canal correspondiente al anticuerpo de la inmunofluorescencia 1, no sea visible en el canal de recogida de la fluorescencia del anticuerpo de la inmunofluorescencia 2; y viceversa. De esta manera evitamos solapamientos entre el ancho de banda de la longitud de onda emitida por cada uno de los fluoróforos.
- Cada anticuerpo primario de la inmunofluorescencia 1 se incubara con el anticuerpo secundario de la inmunofluorescencia 2 para detectar posibles uniones inespecíficas.

Los portaobjetos se montaron sobre un cubreobjetos utilizando el medio de montaje *SlowFadeR Gold antifade reagent* (Invitrogen).

Para las imágenes de microscopia confocal se tomaron utilizando el microscopio TCS/SP2 (Leica Microsystems) y Nikon A1R (Nikon). La toma de imágenes se realizó de modo secuencial para evitar las interferencias entre las fluorescencias emitidas. La colocalización de las imágenes se evaluó mediante el uso del programa informático MetaMorph (Danaher Corporate Office).

### **10.6.9 Inmunofluorescencias de isolectina B4**

En el estudio de las células endoteliales a partir de la detección del antígeno isolectina B4 el protocolo de inmunofluorescencia se realizó con las siguientes modificaciones: el tejido fue incubado con isolectina B4-biotinilada (dilución 1:20, L2140, Sigma) en PBS que contiene 1% de Triton X-100, 0.1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1 mM MgCl<sub>2</sub> y 0.1 mM MnCl<sub>2</sub>. Tras esto, se procedió a la incubación del tejido con estreptavidina conjugada al fluorocromo Alexa 647 (S21374, Invitrogen).

## **11. Ensayo de incorporación de 5'-Bromodeoxiuridina**

La Bromodeoxiuridina (BrdU, del inglés “5’ *Bromo-2’-DeoxyUridine*”) es un nucleósido sintético análogo de la timidina. El BrdU se incorpora durante la fase replicación (fase S del ciclo celular) en células vivas utilizándose como marcador de proliferación. La detección de las moléculas de BrdU incorporadas se realiza mediante la incubación con anticuerpos específicos. Durante la presente tesis se utilizó el ensayo de incorporación de BrdU para el análisis del efecto de NF-Y sobre la proliferación celular y se detectó mediante ensayos de inmunofluorescencia de células.

### **Reactivos y material:**

- PFA 4%.
- Solución de permeabilización: 0.5% Tritón X-100; 2M HCl.
- Tampón Borato: 24.6 g/L Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 4.36 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.
- Solución de bloqueo: Suero de caballo al 5% en PBS.

- Bloqueo Avidina/Biotina (Vector).
- Anticuerpos primarios: anti-BrdU (11-286-c100, clon MoBu-1, ExBio, dilución 1:200); anti-GFP (A6455, Invitrogen, 1:500).
- Anticuerpos secundarios: Anti-ratón biotinilado (BA-9200, Vector Labs, 1:500); anti-conejo conjugado a Alexa 488 (A11034, Molecular Probes, Invitrogen, 1:500); Estreptavidina conjugada al fluoróforo Cy3 (016-160-084, Jackson ImmunoResearch, 1:500).
- Hoechst 33342 (Sigma, 1:1000).
- Microscopio de fluorescencia Axiovert 200M (Zeiss).

Procedimiento: Las condiciones del tratamiento con BrdU varían según el experimento realizado, así, los ensayos realizados con CMLVs en crecimiento asincrónico estimuladas con suero las células se incubaron con 50  $\mu$ M de BrdU durante 16 horas (**Resultados, Apartado 3, Figura 25**). Los ensayos de proliferación inducidos por la estimulación con PDGF-BB en células ayunadas por privación de suero se realizaron incubando las células con 50  $\mu$ M de BrdU durante las últimas 2 horas (células E19P) o 24 horas (CMLVs de rata y humanas) tras la estimulación con el mitógeno (**Resultados, Apartado 3, Figura 24**). Tras la incubación con BrdU las células se fijaron con 4% de PFA durante 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se permeabilizaron 0.5% de Tritón X-100 y 2 M de HCL. La adición de esta solución permite la permeabilización de las membranas celulares y la apertura de la cromatina favoreciendo el acceso del anticuerpo a las moléculas de BrdU incorporadas. Las células se lavaron intensamente con tampón borato (permite tamponar la solución ácida de permeabilización) y con PBS. Las células fueron posteriormente incubadas durante 1 hora con una solución de bloqueo para evitar las uniones inespecíficas antígeno/anticuerpo. Debido a la utilización de un anticuerpo secundario biotinilado se realizó un bloqueo avidina/biotina siguiendo las instrucciones del fabricante. La incubación con el anticuerpo anti-BrdU se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se eliminó el exceso de anticuerpo primario mediante 3 lavados de 5 min de PBS y se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón biotinilado durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, tras 3 lavados de PBS de 5 min cada uno, se incubó con estreptavidina conjugada al fluoróforo Cy3 durante 45 min a temperatura ambiente. Los núcleos se tiñeron con el

marcador Hoechst durante 15 min. Los portaobjetos se montaron con el medio de montaje SlowFade y se analizaron las imágenes en un microscopio de fluorescencia Axiovert 200M.

Los ensayos de proliferación en células expresando GFP se analizaron mediante el protocolo de inmunofluorescencia de BrdU con modificaciones. Debido a la desnaturalización de la proteína GFP por las características ácidas de la solución de permeabilización, la detección de la GFP se realizó mediante incubación con el anticuerpo primario anti-GFP durante 16 horas a 4°C previo a la incubación con el anticuerpo anti-BrdU. La detección del anticuerpo anti-GFP se realizó mediante incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Alexa 488 durante 1 hora a temperatura ambiente.

## 12. Análisis *in silico*

Los estudios del impacto funcional de los polimorfismos presentes en el promotor del gen humano de la ciclina B1 se realizó mediante un análisis *in silico* utilizando el programa informático MatInspector™ (Genomatix) (Cartharius, Frech et al. 2005). El análisis de las regiones promotoras se basa en la predicción de potenciales sitios de unión a ADN para factores de transcripción. Este programa ha generado librerías de matrices de secuencias de ADN como sitios consenso de unión teóricos para familias de factores de transcripción. De esta manera, por comparación de una secuencia problema con estas matrices podemos predecir que familias de factores de transcripción son capaces de unirse a dicha secuencia.

Durante la presente tesis se realizó una comparación con matrices de secuencias de unión de factores de transcripción del genoma de *Homo sapiens* considerando un grado de similitud de superior al 85% ( $>0.85$ ).

### 13. Análisis estadístico

Los resultados se expresan como media $\pm$ error estándar de la media. Las diferencias entre grupos experimentales fueron evaluadas mediante análisis estadístico test *t-student* no pareado de dos colas para comparaciones entre dos grupos, o análisis de varianza (ANOVA) para comparaciones entre más de dos grupos. La homogeneidad de varianzas se determinó con el test de Levene, y los test post-hoc utilizados para la comparación entre subgrupos tras el ANOVA fueron de *Dunnet* o *Bonferroni* para los datos que presentaban homogeneidad de varianzas, o de *Games-Howell* para los datos que no presentaban homogeneidad de varianzas. La significatividad estadística se delimitó en p-valor $<$ 0,05. El programa informático utilizado para el análisis de los datos fue SPSS v15.0 y 17.0 y GraphPad-Prism (GraphPad Software).



## **RESULTADOS**



**1. Identificación de polimorfismos de base única en genes reguladores del ciclo celular como biomarcadores del riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario**



## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Los resultados de estudios pre-clínicos en modelos animales de daño vascular inducido por daño mecánico y de ensayos clínicos con *stents* farmacoactivos liberadores de drogas anti-proliferativas demuestran la importancia de la proliferación celular en la patofisiología de la reestenosis. A diferencia de la aterosclerosis nativa, la ausencia de biomarcadores en la enfermedad reestenótica que puedan predecir el riesgo individual de sufrir la enfermedad hace necesario de ampliar el número de estudios dirigidos a la búsqueda de nuevos factores de riesgo inherentes al propio individuo.

El objetivo concreto de este **Apartado 1**, es la identificación de polimorfismos de base única (SNPs) localizados en genes reguladores del ciclo celular como marcadores genéticos del riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario.



## RESULTADOS

**Los polimorfismos de base única rs350099, rs164390, rs350104, rs875459, rs2282411 y rs733590 se asocian con el riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario**

Los estudios genéticos se realizaron en 284 pacientes de la cohorte Mediterránea a los que se les realizó un seguimiento clínico y angiográfico entre los 6 y 9 meses tras la IPTC. Los datos clínicos de los pacientes se muestran en la **Tabla 11**. Tras el seguimiento angiográfico los pacientes se clasificaron como reestenóticos o no reestenóticos en base a los criterios descritos en **Materiales y Métodos**. Las características angiográficas y MACE de la cohorte de pacientes se resumen en las **Tablas 12 y 13**.

Los criterios de selección de los SNPs en genes reguladores del ciclo celular se basaron primero en su localización dentro de la estructura del gen, interesándonos por aquellos localizados en regiones reguladoras de la actividad transcripcional del gen, por ejemplo región promotora, región 3' y 5' UTR (no traducible, del inglés "*UnTranslated Region*") o regiones intrónicas. El segundo criterio utilizado es una frecuencia del alelo menos frecuente en la población global (MAF, del inglés "*Minor Frequency Allele*") superior al 20%. Este parámetro es importante en el análisis estadístico pues cuanto menor sea la MAF, mayor deberá ser el tamaño muestral utilizado y por tanto la potencia estadística, para evitar obtener falsos positivos. Además serán necesarios un mayor número de SNPs a analizar para representar la variación existente en una región génica determinada. Finalmente, el último criterio tomado en la selección de SNPs fue la ausencia de trabajos previos donde hubieran sido descritos. Con estos criterios se seleccionaron 47 SNPs en 8 genes reguladores del ciclo celular (**Tabla 14**: reguladores positivos; **Tabla 15**: reguladores negativos).

La distribución de los genotipos en la población control se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0.05$ ). La variación existente en el número de pacientes de la cohorte analizada para cada polimorfismo varió dependiendo del porcentaje de error en el genotipado de los mismos.

**Tabla 11. Características clínicas de los pacientes con o sin reestenosis angiográfica tras IPTC con implantación de *stent* coronario (cohorte Mediterranea)**

	No reestenosis (n= 168)	Reestenosis (n= 116)	p-valor
Edad	59 ± 11	63 ± 9	0.002
Sexo	V: 75%; M: 25%	V: 77%; M: 23%	0.71
Angina de pecho *			
Clase I	20.7%	13.6%	
Clase II	61.9%	66.2%	0.33
Clase III	17.4%	20.2%	
Diabetes mellitus	36.4%	35.8%	0.85
Fracción de eyección del ventrículo izquierdo	56±10%	56±9%	0.81
Infarto de miocardio previo	48.5%	47.8%	0.91
Historial familiar de EAC	31.5%	38.2%	0.64
Hipertensión sistémica	64.6%	57.5%	0.15
Hipercolesterolemia	51.2%	49.1%	0.30
Fumadores activos	23.1%	20%	0.70
Estatinas	89.4%	89.1%	0.96
TFG estimada, ml/min/1.73 m <sup>2</sup>	67.5 ± 17.4	67.6 ± 17.6	0.93
Lípidos plasmáticos, mg/dL			
Colesterol total	181±43	163±38	<0.001
Colesterol-LDL	99±34	89±31	0.035
Colesterol-HDL	46±12	46±15	0.84
Triglicéridos	147±74	156±73	0.84

\* Clasificación establecida de acuerdo con la Sociedad Cardiovascular Canadiense  
**V:** Varón; **M:** Mujer; **EAC:** enfermedad de las arterias coronarias; **TFG:** tasa de filtración glomerular; **HDL:** “*high-density lipoprotein*”, lipoproteínas de alta densidad; **LDL:** “*low-density lipoprotein*”, lipoproteínas de baja densidad.

**Tabla 12. Características angiográficas de los pacientes reestenóticos y no reestenóticos tras IPTC con implantación de *stent* coronario (cohorte Mediterranea)**

	No reestenosis (n= 168)	Reestenosis (n= 116)	p-valor
Extensión de enfermedad de las arterias coronarias			
1 vaso	29.9%	27.2%	0.79
2 vasos	42.1%	41.2%	
3 vasos	28%	31.6%	
Arteria coronaria diana			
Descendente anterior izquierda	45%	44%	0.21
Circunfleja izquierda	26%	26.3%	
Coronaria derecha	29.5%	29%	
Principal izquierda	0.5%	0.7%	
Localización de la lesión			
De ostium	8%	5%	0.73
Proximal	40%	46%	
Media	46%	44.5%	
Distal	6%	4.5%	
Tipo de lesión			
A	12%	13%	0.48
B1	24%	22%	
B2	36%	36%	
C	28%	29%	
Diámetro estenosis, %			
Basal	86 ± 10	86 ± 12	0.57
Post-procedimiento	1 ± 3	1 ± 3	0.39
Seguimiento	25 ± 14	78 ± 15	<0.001
Diámetro vaso de referencia, mm			
Basal	3.20 ± 0.58	3.20 ± 0.51	0.79
Post-procedimiento	3.34 ± 0.59	3.32 ± 0.58	0.82
Seguimiento	3.31 ± 0.47	3.24 ± 0.46	0.08
Diámetro luminal mínimo, mm			
Basal	0.48 ± 0.37	0.45 ± 0.37	0.35
Post-procedimiento	3.32 ± 0.56	3.31 ± 0.54	0.80
Seguimiento	3.01 ± 0.70	0.88 ± 0.95	<0.001
Ganancia inicial, mm	2.93 ± 0.50	2.98 ± 0.45	0.74
Pérdida Tardía, mm	0.55 ± 0.31	2.31 ± 0.15	<0.001
Cociente pérdida/ganancia	0.19 ± 0.11	0.91 ± 0.23	<0.001
Tamaño lesión, mm	18.6 ± 9.8	17.3 ± 9.0	0.26

**Tabla 13. Eventos coronarios adversos tras 12 meses en pacientes con o sin reestenosis angiográfica tras IPTC con implantación de *stent* coronario (cohorte Mediterranea)**

	No reestenosis (n= 168)	Reestenosis (n= 116)	p-valor
Eventos coronarios adversos acumulados tras 12 meses	20 (12%)	103 (89%)	<0.001
Muerte (cualquier causa)	2 (1.2%)	2 (1.7%)	1.00
Infarto de miocardio	3 (2.0%)	3 (2.6%)	0.69
Repetición de IPTC	16 (9.5%)	97 (83.5%)	<0.001
TLR	0	93 (80%)	<0.001
Nuevas lesiones	16 (9.5%)	11 (9.4%)	1.00

Los números mostrados para cualquier evento coronario adverso en el análisis acumulativo no representan la suma de los números mostrados para cada evento individual (muerte, infarto de miocardio, repetición de ICPT) debido a que algunos pacientes presentan más de un evento coronario adverso. El infarto de miocardio tras la intervención se definió como el desarrollo de ondas Q patológicas de una duración de al menos 0.4 seg en al menos dos derivaciones contiguas con un nivel elevado de isozima MB de la creatina quinasa, o bien, en ausencia de ondas Q patológicas, se define como una elevación de los niveles totales de creatina quinasa por encima del doble del límite superior normal del nivel elevado de creatina quinasa MB. El TLR se definió como la repetición de la revascularización para tratar una isquemia recurrente debido a una estenosis de al menos el 50 % del diámetro luminal en cualquier posición dentro del *stent* o dentro de los márgenes de 5 mm proximal o distal al *stent*. Las nuevas lesiones se definen como la estenosis crítica (>70%) producida en un mismo vaso (sin el criterio de reestenosis post-*stent*) o en otros vasos con signos clínicos o síntomas de isquemia.

El resultado del análisis mostró que los SNPs rs350099 (-957[T/C]), rs350104 (-475[T/C]), rs164390 (+102[G/T]) y rs875459 (+7010[G/T]) (localizados en el gen *CCNB1*, que codifica para la proteína ciclina B1), rs2282411 (+7733[T/C], localizado en el gen *CCNA1*, que codifica para la proteína ciclina A1) y el polimorfismo rs733590 (-1284[T/C]), localizado en el gen *CDKN1A*, que codifica para la proteína p21<sup>Cip1</sup>) se asocian con un riesgo aumentado de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario (Tabla 16).

**Tabla 14. Polimorfismos de base única en reguladores positivos del ciclo celular genotipados en pacientes tratados con IPTC y *stent* coronario (cohorte Mediterranea)**

Gen (proteína)	Polimorfismo Número acceso GeneBank	Posición en gen	Localización
<i>CCNA1</i> (ciclina A1)	rs3814805	-1917C→G	Región promotora
	rs3814803	-1669 C→T	Región promotora
	rs7985423	-170C→G	Región promotora
	rs7998324	+3910C→T	Región intrónica
	rs2282411	+7733(G)C→T	Región intrónica
<i>CCNE1</i> (ciclina E1)	rs7257330	-1078A→G	Región promotora
	rs3218026	+237A→C	Región intrónica
	rs3218027	+451C→T	Región intrónica
	rs3218028	+484 -→G	Región intrónica
	rs3218068	+10443C→T	Región intrónica
	rs1406	+12211G→T	Región 3' UTR
<i>CCNB1</i> (ciclina B1)	rs8192258	-1055-→A	Región promotora
	rs350099	-957C→T	Región promotora
	rs352626	-710C→T	Región promotora
	rs350104	-475C→T	Región promotora
	rs2069429	-160A→G	Región promotora
	rs164390	+102G→T	Región 5' UTR
	rs875459	+7010G→T	Región Intrónica
	rs1128761	+8334A→G	Exón
<i>CCND1</i> (ciclina D1)	rs1944129	-1938A→G	Región promotora
	rs3212860	-766A→T	Región promotora
	rs3862792	+6983C→T	Exón
	rs603965	+7037A→G	Exón
	rs3212892	+9987A→G	Región intrónica
	rs7177	+10242A→C	Región 3' UTR

**Tabla 15. Polimorfismos de base única en reguladores negativos del ciclo celular genotipados en pacientes tratados con IPTC y *stent* coronario (cohorte Mediterranea)**

Gen (proteína)	Polimorfismo Número acceso GeneBank	Posición	Localización
<i>CDKN1A</i> (p21 <sup>Cip1</sup> )	rs3829963	-2101A→C	Región promotora
	rs733590	-1284C→T	Región promotora
	rs762623	-1021A→G	Región promotora
	rs3176337	+2433A→C	Región Intrónica
	rs3176345	+4078C→G	Región Intrónica
	rs3176352	+5852C→G	Región Intrónica
	rs3176356	+6990C→T	Región Intrónica
	rs1059234	+7110C→T	Región 3' UTR
	rs3176358	+7475A→G	Región 3'UTR
<i>CDKN1B</i> (p27 <sup>Kip1</sup> )	rs3759217	-1857C→T	Región promotora
	rs34330	+386C→T	Región 5'UTR
	rs2066827	+790G→T	Exón
	rs34329	+2924C→G	Región Intrónica
<i>CDKN1C</i> (p57 <sup>Kip2</sup> )	rs3741341	+1147C→T	Exón
	rs452338	+378174G→T	Región 5' cercana al gen
	rs431222	+378378C→T	Región 5' cercana al gen
	rs928656	*A→G	-
	rs450563	*A→G	-
<i>TP53</i> (p53)	rs1042522	+7958C→G	Exón
	rs17883323	+8105A→C	Región Intrónica
	rs17551157	+7233-→C	Región Intrónica
	rs2287498	+21046A→G	Exón

La asociación estadística fue significativa al estudiar la incidencia de reestenosis binaria en la población de estudio. El análisis estadístico se realizó tanto en crudo como considerando los factores edad y sexo. El análisis estadístico incluyendo el factor de riesgo diabetes, además de los factores edad y sexo, mantuvo la significatividad estadística para los SNPs -957[T/C], -475[T/C], +102[G/T] y -1284[T/C]. Por otro lado, el análisis estadístico considerando la variable antecedentes de enfermedad cardiovascular, además de los factores edad y sexo, mostró una asociación significativa con el riesgo de reestenosis de los SNPs -957[T/C], -475[T/C], +102[G/T], +7010[G/T] y -1284[T/C].

El análisis estadístico realizado mostró asociación estadísticamente significativa en 4 polimorfismos localizados en el gen *CCNB1*. De los 4 SNPs, 3 de ellos -957[T/C], -475[T/C] y +102[G/T], se localizan en la región promotora del gen, bien antes del inicio de la transcripción (establecido como +1) o bien en la región 3' UTR (**Resultados, Apartado 2, Figura 9**).

Con el objetivo de comprobar si se validan las asociaciones genéticas identificadas en la cohorte Mediterránea establecimos una colaboración con la Dra Carlie de Vries de la Universidad de Amsterdam para el estudio del potencial valor predictivo de los SNPs -957[T/C], -475[T/C] y +102[G/T] en la cohorte *GENetic risk factors for In-Stent Hyperplasia study Amsterdam* (GEISHA). Los pacientes incluidos en el estudio cumplen los criterios establecidos en nuestra cohorte previa, como por ejemplo haber sido tratados con un *stent* convencional para el tratamiento de una angina estable en una arteria coronaria nativa y su posterior seguimiento angiográfico a los 6 a 12 meses tras la intervención. De un total de 715 pacientes incluidos en el estudio GEISHA se obtuvo ADN en condiciones óptimas de 688 pacientes. Los porcentajes de fallo en el genotipado de los polimorfismos fueron: -957[T/C]: 9%, -475[T/C]: 1.9% y +102[G/T]: 1.5%. Además, el análisis de las frecuencias de los genotipos estudiados mostró que la distribución de los mismos se haya en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p$ -valor>0.05). Los resultados del análisis mostraron significación estadística de la variante polimórfica C y G de los polimorfismos -475[T/C] y +102[G/T], respectivamente, con un riesgo aumentado de sufrir reestenosis clínica (basado en la frecuencia de TLR) tras implantación de *stent* coronario (**Tabla 17**). El análisis del polimorfismo -957[T/C] mostró un

aumento del riesgo en los pacientes -957TT respecto a los pacientes -957(TC+CC) (Razón de Odd=1.88) con una asociación enfermedad-genotipo cercana a la significatividad estadística (p-valor=0.07, **Tabla 17**). Los resultados se obtuvieron corrigiendo por los factores edad, sexo, hipertensión, tabaquismo, diabetes e historial familiar de enfermedad cardiovascular.

Un año después del primer seguimiento se llevó a cabo un segundo seguimiento en la que estudiaron diferentes eventos cardíacos adversos (**Véase Materiales y Métodos, Apartado 1.1.2 y en (van Tiel, Bonta et al. 2009)**). Con el objetivo de estudiar la potencia de las asociaciones observadas, investigamos si estas asociaciones se mantienen tras una regresión de Cox incluyendo las variables edad, sexo, hipertensión, tabaquismo, diabetes e historial familiar de enfermedad cardiovascular. El análisis mostró una asociación estadísticamente significativa o muy cercana a la significatividad entre los polimorfismos -957[T/C] (p-valor=0.055), -475[T/C] (p-valor=0.057) y +102[G/T] (p-valor=0.047) cuando se consideró el intervalo de tiempo entre la implantación del *stent* y el TLR (**Tabla 18**). Además, el análisis de Kaplan-Meier reveló una supervivencia menor libre de TLR en los pacientes portadores de los genotipos de riesgo de ISR con diferencias significativas (+102[G/T]: Log-rank p-valor=0.04) o muy cercanas a la significatividad (-957[T/C]: Log-rank p-valor=0.057; -475[T/C]: Log-rank p-valor=0.056) (**Figura 7, Tabla 18**).

En conjunto, nuestros resultados de asociación genética en la cohorte italiana de 284 pacientes y su posterior validación (para los SNPs -957[T/C], -475[T/C], +102[G/T]) en la cohorte GEISHA identifican a los polimorfismos -957[T/C], -475[T/C], +102[G/T], +7010[G/T], +7733[T/C] y -1284[T/C] como potenciales predictores del riesgo de sufrir reestenosis.

**Tabla 16. Polimorfismos de base única que muestran una asociación estadísticamente significativa con el riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario (cohorte Mediterranea)**

Gen	SNP	Modelo Genético		p-valor	Razón de Odd	95% IC
CCNB1	rs350099 (-957[C/T])	DMN	TT respecto a CC + TC	0.028	1.74	1.06-1.74
			CC respecto a TT + TC			
		DMN	GG respecto a TT + GT	0.016	1.81	1.12-2.94
			GG respecto a TT + GT			
CCNA1	rs2282411 (+7733[(G)C/T])	CDMN	TT respecto a CC	0.019	3.10	1.37-7.00
			CT respecto a CC			
		DMN	GG respecto a GT + TT	1.78	1.04-3.03	
CDKN1A	rs733590 (-1284[C/T])	CDMN	TT respecto a CT	0.035	1.92	1.03-3.57
			TT respecto a CC			
		DMN	TT respecto a CC +CT	0.012	2.08	1.17-3.70

\*DMN: Dominancia; CDMN: Codominancia; 95% IC: Intervalo de confianza 95%.

**Tabla 17. Análisis estadístico de la asociación de los polimorfismos rs350099, rs350104, rs164390 y riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario en la cohorte GEISHA**

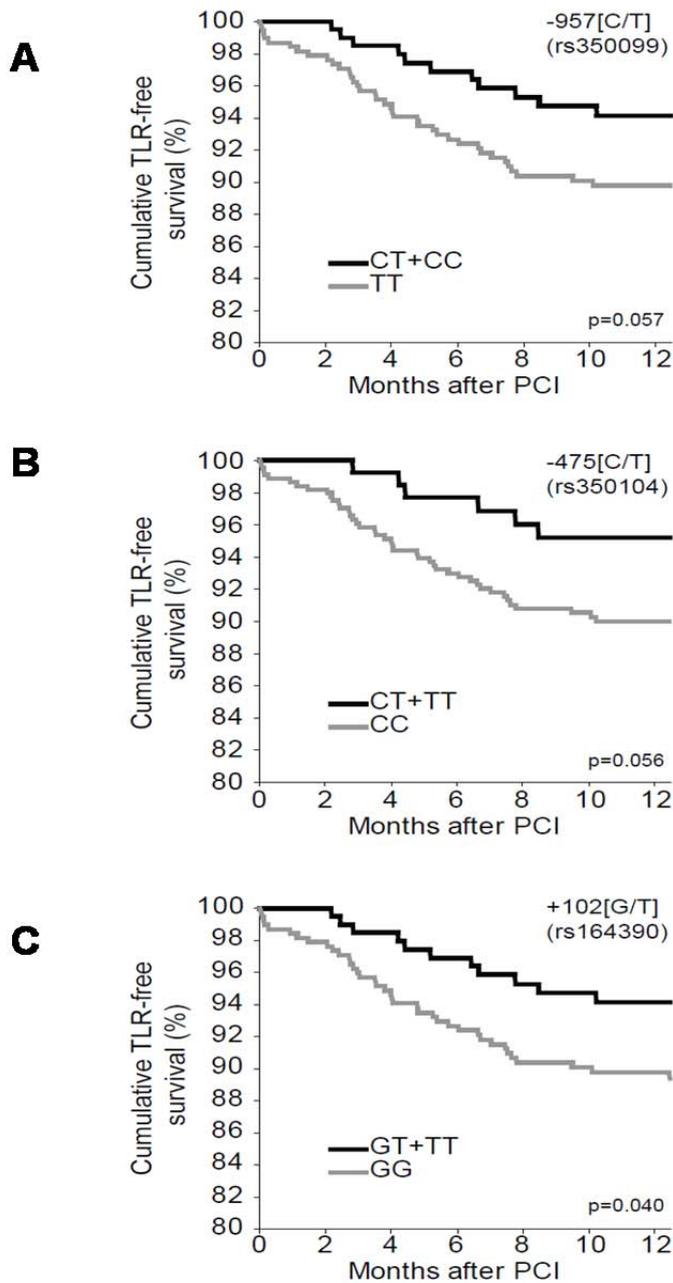
SNP	Genotipo	No reestenosis	reestenosis	p-valor	Razón de Odd	95% IC
rs350099 (-957[T/C])	TT	129 (22.4%)	17 (34.9%)	0.075	1.84 (TT vs CC+TC)	0.95-3.56
	CC+CT	447 (77.6%)	32 (65.1%)			
rs350104 (-475[T/C])	CC	76 (12.3%)	13 (24.2%)	0.024	2.27 (CC vs TT+TC)	1.10-4.63
	CT+TT	545 (87.7%)	41 (75.8%)			
rs164390 (+102[G/T])	GG	140 (22.4%)	19 (36.1%)	0.040	1.94 (GG vs TT+GT)	1.03-3.63
	GT+TT	485 (77.6%)	34 (63.9%)			

95%CI: Intervalo de confianza 95%.

**Tabla 18. Análisis de la regresión proporcional Cox y los eventos de supervivencia Kaplan-Meier en la cohorte GEISHA**

SNP	p-valor	Riesgo relativo	95% IC	Kaplan Meier Log-rank
rs350099 (-957[T/C])	0.055	1.94 (TT vs CC+TC)	0.99-3.80	0.057
rs350104 (-475[T/C])	0.057	2.30 (CC vs TT+TC)	0.98-5.42	0.056
rs164390 (+102[G/T])	0.043	2.01 (GG vs TT+GT)	1.02-3.94	0.040

95%CI: Intervalo de confianza 95%.



**Figura 7. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de TLR en la cohorte GEISHA para los polimorfismos -957[T/C], -475[T/C] y +102[G/T].** Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de TLR en pacientes portadores del genotipo -957TT respecto a los pacientes -957TC+957CC. (B) Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de TLR en pacientes portadores del genotipo -475CC respecto a los pacientes -475TC+475TT. (C) Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de TLR en pacientes portadores del genotipo +102GG respecto a los pacientes +102GT+ +102TT.

**El haplotipo portador de las variantes polimórficas de mayor riesgo (-957T/-475C/+102G) localizado en la región promotora del gen de la ciclina B1 se asocia a un mayor riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario**

Con el objetivo de profundizar en el papel de los polimorfismos -957[T/C], -475[T/C], +102[G/T] como marcadores del riesgo de sufrir reestenosis realizamos un estudio de los haplotipos formados por estos polimorfismos. Su localización en la región promotora del gen que codifica para la ciclina B1 nos llevó a hipotetizar que los SNPs participan de forma cooperativa en la regulación transcripcional del gen modulando el riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario.

El análisis de las frecuencias de los haplotipos en la cohorte Mediterranea reveló 4 haplotipos con una frecuencia mayor del 1% tanto en los pacientes reestenóticos como no reestenóticos (**Tabla 19**), siendo estos los haplotipos incluidos en el análisis estadístico. La determinación del desequilibrio de ligamiento mediante los métodos estadísticos D, D' y R<sup>2</sup> mostró que los polimorfismos -957[T/C], -475[T/C] y +102[G/T] se encuentran en desequilibrio de ligamiento (**Tabla 20**). El haplotipo 1, portador de las variantes alélicas asociadas individualmente con una mayor riesgo de reestenosis, fue el más frecuente en la cohorte Mediterranea (48.8%, **Tabla 19**) y se asoció significativamente con un mayor riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario (**Tabla 21**). Esta asociación se mantuvo significativa tras considerar los factores de edad, sexo, hipertensión, tabaquismo, diabetes mellitus, tipo de angina y antecedentes de enfermedad cardiovascular.

También llevamos a cabo un estudio de asociación de los haplotipos con el riesgo de ISR en la cohorte GEISHA. El resultado del análisis no mostró significación estadística entre el haplotipo 1 respecto al haplotipo 2 (OR=1.05; CI=0.74-1.51; p-valor=0.78) o respecto a todos los otros haplotipos (OR=2.4; CI=0.89-6.45; p-valor=0.084). Sin embargo, el análisis de regresión de Cox mostró asociación estadísticamente significativa con el parámetro TLR cuando comparamos el haplotipo 1 con todos los otros haplotipos (Riesgo relativo=2.51; CI=1.04-6.06; p-valor=0.04). Además las curvas de supervivencia Kaplan-Meier

libres de TLR mostraron una supervivencia disminuida en los pacientes portadores del haplotipo 1 respecto al resto de haplotipos con un p-valor cercano a la significatividad (**Figura 8**).

**Tabla 19. Estimación de la frecuencia de los haplotipos (cohorte Mediterranea)**

Haplotipos	SNP			Total	Frecuencia	
	rs350099 -957[T/C]	rs350104 -475[T/C]	rs164390 +102[G/T]		No reestenosis	Reestenosis
H1	T	C	G	0.4882	0.4567	0.5337
H2	C	T	T	0.3299	0.3647	0.2796
H3	T	T	G	0.1186	0.1106	0.1301
H4	T	T	T	0.0445	0.047	0.042
H5	T	C	T	0.0113	0.0084	0.0146
H6	C	C	G	0.0056	0.0094	ND
H7	C	T	G	0.0019	0.0032	ND
H8	C	C	T	0	0	0

ND: No disponible

Finalmente quisimos investigar el valor funcional de estos polimorfismos estudiando sus efectos sobre la regulación de la expresión de los genes donde se encuentran localizados. En el **Capítulo 2** de la presente tesis, nos centramos en el estudio de la implicación funcional de los polimorfismos rs350099 (-957[T/C]), rs350104 (-475[T/C]) y rs164390 (+102[G/T]), localizados en la región promotora del gen *CCNB1*.

Tabla 20. Análisis del desequilibrio de ligamiento (cohorte Mediterranea)

**Estadístico D**

	<b>rs164390</b>	<b>rs350099</b>	<b>rs350104</b>
<b>rs164390</b>	-	0.1999	0.184
<b>rs350099</b>	-	-	0.1635
<b>rs350104</b>	-	-	-

**Estadístico D'**

	<b>rs164390</b>	<b>rs350099</b>	<b>rs350104</b>
<b>rs164390</b>	-	0.9639	0.9484
<b>rs350099</b>	-	-	0.964
<b>rs350104</b>	-	-	-

**Estadístico R**

	<b>rs164390</b>	<b>rs350099</b>	<b>rs350104</b>
<b>rs164390</b>	-	0.8679	0.7556
<b>rs350099</b>	-	-	0.6915
<b>rs350104</b>	-	-	-

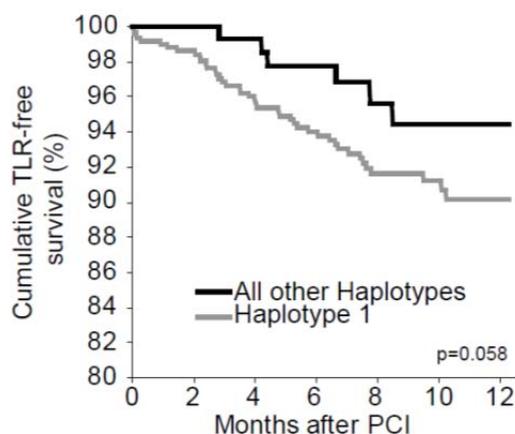
**p-valor**

	<b>rs164390</b>	<b>rs350099</b>	<b>rs350104</b>
<b>rs164390</b>	-	0	0
<b>rs350099</b>	-	-	0
<b>rs350104</b>	-	-	-

**Tabla 21. Análisis estadístico de la asociación de los haplotipos formados por los polimorfismos rs350099, rs350104, rs164390 y el riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario (cohorte Mediterranea)**

Haplotipo	Frecuencia	No reestenosis	Reestenosis	p-valor	Razón de Odd	95% IC
H1: T-C-G	48.79%	45.67%	53.37%	0.015	1.63 (H1 vs H2)	1.09- 2.43
H2:C-T-T	33.15%	36.47%	27.96%			

95%IC: Intervalo de confianza 95%.



**Figura 8. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de TLR en la cohorte GEISHA para pacientes portadores de haplotipos formados por los polimorfismos -957[T/C], -475[T/C] y +102[G/T]. Curvas Kaplan-Meier de supervivencia libre de TLR en pacientes portadores del haplotipo 1 respecto al conjunto de pacientes portadores del resto de haplotipos.**

## DISCUSIÓN

La incidencia de la reestenosis se encuentra fuertemente influenciada por factores clínicos del paciente (diabetes, sexo, edad, hipertensión y antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular), variables anatómicas del vaso afectado o de las características del *stent* (Faxon 2000; Jukema, Verschuren et al. 2012). El uso común de estas variables es aplicado actualmente en la práctica médica. De hecho, Ye y colaboradores han desarrollado un modelo predictivo para la identificación de pacientes en quienes la implantación de un SL-FA puede derivar en un mayor beneficio respecto a la reducción de la probabilidad de sufrir reestenosis y la necesidad de revascularizar el vaso afectado (Yeh, Normand et al. 2011). Basados en este modelo, cuya fiabilidad se ve mejorada respecto al modelo convencional de 3 variables que tiene en cuenta diabetes mellitus, diámetro del *stent* y longitud del *stent*, los autores encontraron predictores estadísticamente significativos de la probabilidad de revascularización de un vaso afectado, incluyendo IPT o bypass coronario previo, IPT de emergencia, enfermedad cardiovascular periférica, diabetes mellitus y las características angiográficas. Pese a la importancia de estos factores clínicos, anatómicos y asociados a la implantación y características del *stent*, existe una falta de biomarcadores de la enfermedad reestenótica que puedan facilitar el diagnóstico de un paciente de riesgo. El valor pronóstico de estos modelos predictivos (Yeh, Normand et al. 2011) pueden ser incrementado mediante la combinación con otras variables inherentes al paciente, como por ejemplo factores de tipo genético. Mediante el análisis de la cohorte Mediterránea de 284 pacientes sometidos a revascularización de un vaso afectado mediante la implantación de *stent* coronario, hemos identificado 6 SNPs que se encuentran asociados con un riesgo aumentado de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario: -957[T/C], -475[T/C], +102[G/T] +7010[G/T] localizados en el gen *CCNB1* (que codifica para la proteína ciclina B1), +7733[T/C] localizado en el gen *CCNA1* (que codifica para la proteína ciclina A1) y el polimorfismo -1284[T/C] localizado en el gen *CDKN1A* (que codifica para la proteína p21<sup>Cip1</sup>). Además, mediante el genotipado de los polimorfismos -957[T/C], -475[T/C], +102[G/T] en la Cohorte GEISHA (688 pacientes) validamos la

asociación genética obtenida para los SNPs -475[T/C], +102[G/T]. Esta asociación fue cercana a la significatividad estadística para el SNP -957[T/C]. Cabe destacar la relevancia médica de esta asociación genotipo-fenotipo pues los pacientes portadores de los polimorfismos -957[T/C], -475[T/C] y +102[G/T] presentan un mayor riesgo de sufrir eventos cardíacos coronarios de gravedad y muerte, tal y como demuestran los análisis de la supervivencia mediante el modelo de regresión de Cox y las curvas de supervivencia Kaplan-Meyer. Interesantemente, la asociación estadística entre el haplotipo TT-CC-GG con las variantes de mayor riesgo de sufrir ISR de los SNPs -957[T/C], -475[T/C] y +102[G/T] sugiere la contribución coordinada de los polimorfismos en el riesgo a sufrir la enfermedad. Además, dada su localización en la región promotora del gen de la ciclina B1 existe la posibilidad de una posible regulación conjunta de la actividad transcripcional del gen y con ello de los niveles de ciclina B1, afectando en último término a la proliferación celular (proceso esencial durante el desarrollo de la lesión reestenótica).

La identificación de SNPs, como biomarcadores de la predisposición individual a sufrir enfermedades complejas ha sido reconocida durante los últimos años (Lohmueller, Pearce et al. 2003). En el contexto de la enfermedad reestenótica, diversos trabajos han demostrado la existencia de una influencia en el riesgo de sufrir la enfermedad de SNPs localizados en genes asociados a procesos como la activación plaquetaria, reclutamiento leucocitario, respuesta inflamatoria, metaloproteinasas, metabolismo lipídico, estrés oxidativo, proliferación celular y el sistema renina-angiotensina (Marenberg, Risch et al. 1994; Ishiwata, Tukada et al. 1997; Kastrati, Schomig et al. 1998; Mamotte, van Bockxmeer et al. 1998; de Maat, Jukema et al. 1999; Kastrati, Schomig et al. 1999; Kastrati, Koch et al. 2000; Agema, Jukema et al. 2001; Prisco, Fedi et al. 2001; Humphries, Bauters et al. 2002; Rauchhaus, Gross et al. 2002; Wheeler, Braden et al. 2002; Beyzade, Zhang et al. 2003; Burr, Doss et al. 2003; Koch, Tiroch et al. 2003; Lichtinghagen, Bahr et al. 2003; Medley, Kingwell et al. 2003; Diamanti-Kandarakis, Palioniko et al. 2004; Hoppmann, Koch et al. 2004; Volzke, Grimm et al. 2004; Angiolillo, Fernandez-Ortiz et al. 2005; Hamann, Gomma et al. 2005; Kathiresan, Gabriel et al. 2005; Monraats, Pires et al. 2005; Monraats, Pires et al. 2005; von Beckerath, von Beckerath et al. 2005; Asselbergs, Williams et al. 2006; Monraats, de Vries et al. 2006; Wijpkema,

van Haelst et al. 2006; Ye 2006; Giusti, Gori et al. 2007; Lev, Patel et al. 2007; Monraats, Kurreeman et al. 2007; Pons, Monraats et al. 2007; Chorley, Wang et al. 2008; Rudez, Pons et al. 2008; Giusti, Gori et al. 2009; Hardy and Singleton 2009; Hoppmann, Erl et al. 2009; Kullmann, Binner et al. 2009; Manolio, Collins et al. 2009; McDermott and Lloyd-Jones 2009; Neugebauer, Goldbergova-Pavkova et al. 2009; Tiroch, Koch et al. 2009; Abdullah 2010; Bienertova-Vasku, Bienert et al. 2010; Koch, de Waha et al. 2010; Macintyre, Bailey et al. 2010; Oishi, Manabe et al. 2010; Verschuren, Sampietro et al. 2010; Gibson 2011; Jguirim-Souissi, Jelassi et al. 2011; Sofi, Giusti et al. 2011; Visscher, Brown et al. 2012; Visser, Kayser et al. 2012). Nuestro estudio se ha centrado en la identificación de polimorfismos localizados en genes diana reguladores de un proceso fundamental en el desarrollo de la lesión neointima como es la proliferación celular, tal y como se ha demostrado en múltiples estudios preclínicos (Fuster, Fernandez et al. 2010). Otros estudios se han centrado en la identificación de SNPs localizados en genes reguladores del ciclo celular (Hoppmann, Erl et al. 2009; Tiroch, Koch et al. 2009; van Tiel, Bonta et al. 2009), sin embargo únicamente Van tiel y colaboradores demostraron una asociación significativa entre el polimorfismo -838C>A localizado en el gen *CDKN1B* (que codifica para el supresor tumoral p27<sup>Kip1</sup>) y el riesgo de sufrir reestenosis tras implantación coronario (van Tiel, Bonta et al. 2009). Nuestro estudio se restringió a pacientes tratados con *stents* desnudos con el objetivo de evitar un efecto negativo en la asociación estadística entre genes reguladores de la proliferación celular y la enfermedad como consecuencia del efecto anti-proliferativo de los SL-FAs. Este efecto adverso puede ser la causa de la falta de asociación observada en algunos trabajos basados en el estudio de SNPs localizados en genes reguladores del ciclo celular (Hoppmann, Erl et al. 2009; Tiroch, Koch et al. 2009).

Teniendo en cuenta las limitaciones de este tipo de estudios, tales como el tamaño muestral, nuestro estudio basa su potencia estadística en el análisis de dos cohortes independientes (dos cohortes europeas, una de nacionalidad italiana y otra holandesa) que en conjunto representan un tamaño muestral importante (cohorte italiana: 284 pacientes y cohorte holandesa: 688 pacientes). Sin embargo, son necesarios estudios adicionales en cohortes de independientes de mayor tamaño para validar el diseño de posibles kits diagnósticos del riesgo de sufrir

reestenosis tras implantación de *stent* basados en el genotipado de SNPs localizados en genes reguladores del ciclo celular. El uso de estos kits diagnósticos, junto con los factores convencionales, puede ayudar al diagnóstico y tratamiento individualizado de los pacientes, así como su estratificación según el grado de riesgo de sufrir la enfermedad, facilitando la decisión de implantación de un *stent* desnudo (en pacientes de bajo riesgo) o bien un *SL-FA* (en pacientes de alto riesgo), evitando así los posibles problemas tanto socio-económicos (2-3 veces más caros) como clínicos (riesgo aumentado de sufrir trombosis tardía, reestenosis post-*SL-FA*, etc.) asociados a estos últimos.



**2. Estudio funcional de los polimorfismos de base única rs350099, rs350104 y rs164390 asociados con el riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario**



## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

La ciclina B1 es un regulador positivo de la proliferación celular y su delección en el ratón resulta en la muerte durante el desarrollo embrionario. La estricta regulación de sus niveles asegura la correcta progresión del ciclo celular. Cabe destacar que su sobreexpresión desemboca en alteraciones cromosómicas y proliferación descontrolada. De hecho, su desregulación se asocia con diversas patologías que cursan con una proliferación excesiva como el cáncer, siendo un biomarcador de su incidencia y malignidad. En el contexto de la enfermedad vascular, estudios en modelos animales han demostrado su papel fundamental en el desarrollo de la neointima inducida por angioplastia y el análisis de muestras humanas también ha demostrado su expresión abundante en lesiones reestenóticas. Finalmente, los resultados de nuestro análisis genético han demostrado la existencia de 3 SNPs, rs350099, rs350104 y rs164390, localizados en la región promotora del gen *CCNB1* (que codifica para la proteína ciclina B1).

El objetivo del **Apartado 2** es investigar la implicación funcional de los SNPs rs350099, rs350104 y rs164390 en la regulación transcripcional del gen *CCNB1*. Además, se investigará la implicación funcional del haplotipo formado por las variantes de mayor riesgo de reestenosis de estos polimorfismos.

Nuestra hipótesis es que las variantes de mayor riesgo de los SNPs rs350099, rs350104 y rs164390 se asocian con una mayor transcripción del gen *CCNB1* debido al reclutamiento de activadores transcripcionales, lo cual facilita la proliferación celular en la pared arterial tras implantación *stent*.



---

## RESULTADOS

### La variante de riesgo -957T del polimorfismo rs350099 genera un sitio funcional de unión a ADN para el factor de transcripción NF-Y

El posible valor funcional del polimorfismo rs350099 (-957[T/C]) se analizó teniendo en cuenta que se localiza en la región promotora del gen *CCNB1* en la posición -957 respecto al inicio de transcripción considerado (+1, **Figura 9**). En base a esta localización y considerando otros antecedentes similares (Chorley, Wang et al. 2008), se hipotetizó que la presencia de las variantes alélicas T o C del polimorfismo influirá en la generación o interrupción de secuencias genéticas de unión a ADN de factores de transcripción, lo cual afectará a la transcripción del gen y en consecuencia a los niveles de expresión de la proteína.

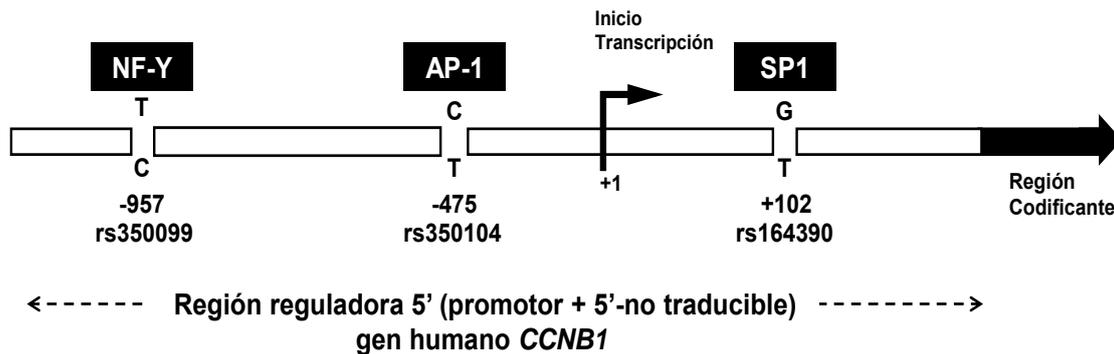
Para comprobar esta hipótesis recurrimos al análisis *in silico* de la región promotora del gen en busca de secuencias consenso para factores de transcripción mediante el programa informático MatInspector™ considerando las secuencias con la variante T o C del polimorfismo -957[T/C]. Teniendo en cuenta un límite de similitud entre las secuencias superior al 85% ("*core similitude treshold*" >85%), el programa predijo la existencia de una secuencia consenso de unión a ADN para el factor de transcripción NF-Y cuando se haya presente la variante polimórfica T del polimorfismo 957[T/C] (-957T) que quedaba eliminada cuando se haya la variante C (-957C) (CCAAT vs CCGAT, respectivamente).

El factor de transcripción NF-Y ha sido descrito como un regulador positivo de la expresión de diversos genes reguladores del ciclo celular, principalmente de la fase G2 y la fase de mitosis de la célula eucariota (Mantovani 1999). En el caso de la ciclina B1, se ha identificado previamente dos secuencias de unión para NF-Y en las posiciones -17/-13 y +16/+20 respecto al inicio de la transcripción esenciales en la regulación transcripcional del gen (Farina, Manni et al. 1999). Considerando dichas evidencias, hipotetizamos que la presencia de un sitio de unión adicional para este factor de transcripción en los individuos portadores de la variante T del SNP -957[T/C] supone un aumento de la actividad transcripcional del promotor y con ello de la expresión de ciclina B1. Teniendo en cuenta el papel de la ciclina B1

**A**

Gen humano <i>CCNB1</i>	SNP	Posición	Variantes	
			Alélicas	MAF
[	rs350099 (-957[T/C])	-957	T/C	0.320
	rs350104 (-475[T/C])	-475	T/C	0.285
	rs164390 (+102[G/T])	+102	G/T	0.427

**B**



**Figura 9. SNPs localizados en el gen *CCNB1* validados mediante ensayos funcionales.** (A) Resumen de los SNPs incluidos en el estudio de validación. La posición de los SNPs es relativa al inicio de transcripción (+1). MAF: “*minor allele frequency*”, frecuencia del alelo menos frecuente. (B). -957T y -957C son las variantes polimórficas T y C del polimorfismo rs350099, respectivamente. -475C y -475T son las variantes polimórficas C y T del polimorfismo rs350104, respectivamente. +102G y +102T son las variantes polimórficas G y T del SNP rs164390, respectivamente. El análisis *in silico* predice que las variantes de mayor riesgo de reestenosis -957T, -475C y +102G generan sitios de unión consenso para NF-Y (caja CCAAT), AP-1 (caja TGAG) y SP1 (GGGGCGGGGC), respectivamente.

como regulador positivo del ciclo celular, un aumento de los niveles de ciclina B1 podría incrementar de la proliferación celular y con ello el riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent*.

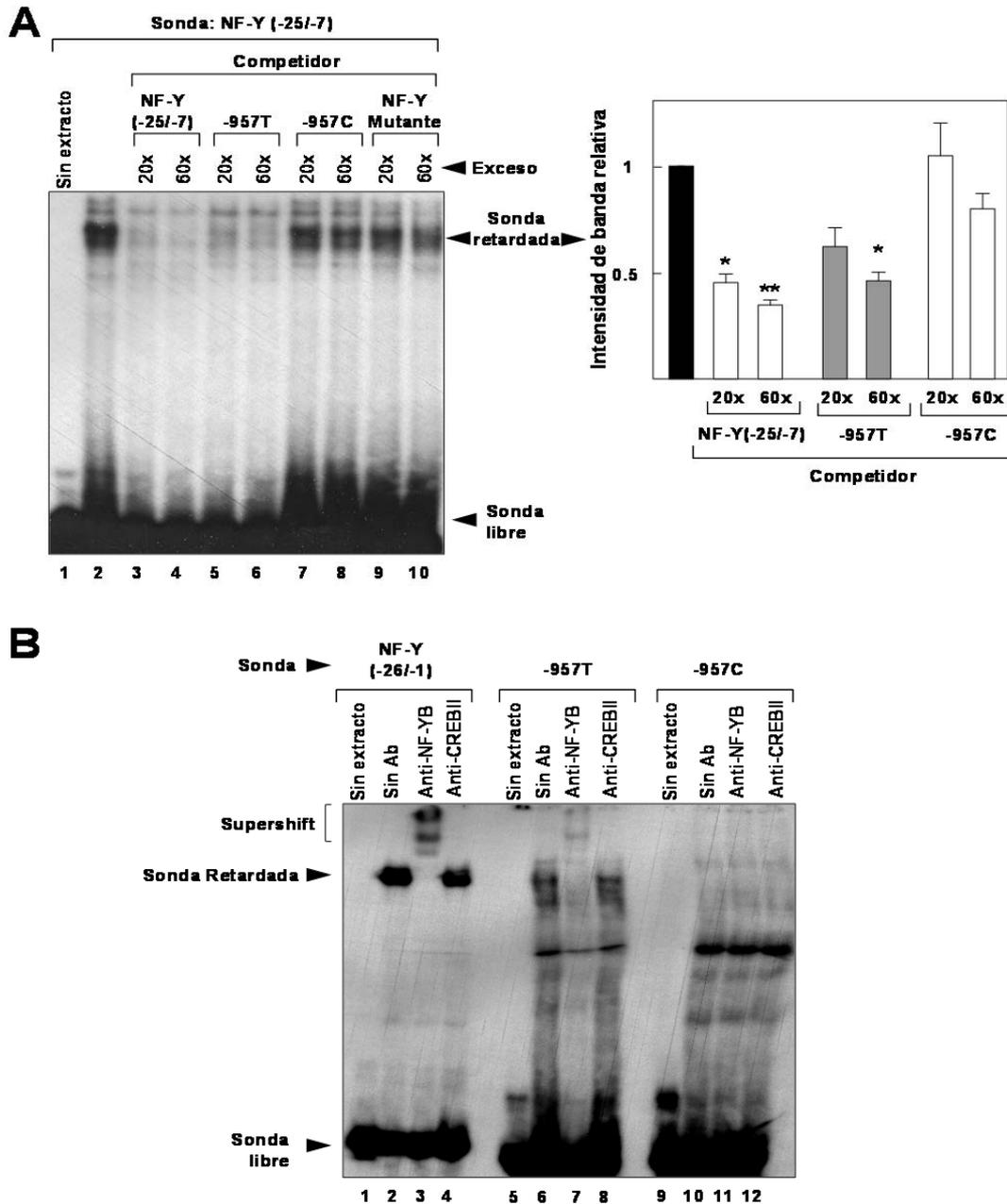
Para evaluar la funcionalidad de esta posible nueva secuencia de unión para NF-Y predicha mediante el análisis *in silico* se llevó a cabo la técnica de EMSA incubando extractos nucleares de células humanas HeLa con la sonda radiactiva NF-Y(-25/-7) que contiene una secuencia consenso para este factor de transcripción (Figura 10A). Mediante ensayos de competición, la banda retardada obtenida de esta incubación (carril 8) fue eficientemente competida por un exceso

del oligonucleótido no marcado radiactivamente NF-Y(-25/-7) (**carriles 3-4**) o de un oligonucleótido portador de la secuencia CCAAT generada por el alelo -957T (**carriles 5-6**). Por el contrario, la banda retardada no fue competida por un exceso de oligonucleótido no marcado radiactivamente portador del alelo -957C (**carriles 7-8**) ni por la secuencia consenso NF-Y(-25/-7) mutada (NF-Y mutante, **carriles 9-10**) utilizada como control. La cuantificación de la intensidad de las bandas se muestra en el panel derecho de la **Figura 10A**.

Por otro lado, la incubación de extractos nucleares con el oligonucleótido -957T marcado radiactivamente produjo una banda con un retraso electroforético (**Figura 10B, carril 2**) equivalente a la obtenida con la sonda consenso NF-Y(-25/-7) (**Figura 10B, carril 6**), mientras que no se observó banda retardada cuando incubamos con la sonda -957C (**Figura 10B, carril 10**).

Finalmente, para comprobar que el complejo ADN-proteína formado contenía el factor de transcripción NF-Y se llevaron a cabo experimentos de “super-retardo” (*supershift*). Para ello se incubaron junto con los extractos nucleares y la sonda radiactiva NF-Y(-25/-7), -957T o -957C, un anticuerpo frente a la subunidad B de NF-Y obteniendo un *supershift* de las bandas electroforéticas utilizando las sondas -957T (**Figura 10B, carril 7**), y consenso NF-Y(-25/-7) (**Figura 10B, carril 3**), pero no con la sonda -957C (**Figura 10B, carril 11**).

Una vez demostrada que la presencia de la variante polimórfica T del SNP -957[T/C] genera un sitio de unión para el factor de transcripción NF-Y, llevamos a cabo ensayos de actividad del gen reportero de luciferasa para evaluar la funcionalidad de esta nueva secuencia. Para ello diseñamos vectores en los que el gen reportero de la luciferasa se encuentra controlado por una región promotora mínima y un tándem de 3 secuencias que contienen el alelo -957T o -957C del polimorfismo rs350099 (3x(-957T) y 3x(-957C), respectivamente) (**Figura 11A**).



**Figura 10.** La variante alélica -957T localizada en el gen *CCNB1* asociada a un riesgo aumentado de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario genera un sitio de unión a ADN para el factor de transcripción NF-Y. EMSAs incubando extractos nucleares obtenidos de células HeLa y las sondas y competidores indicados (Véase Materiales y Métodos, Tabla 5). Las autorradiografías son representativas de 3-5 experimentos. **(A)** Ensayos de competición utilizando la sonda radiactiva consenso NF-Y (-25/-7) y los excesos indicados de oligonucleótido no marcado radiactivamente. La gráfica muestra la media de las intensidades relativas de los complejos retardados sonda:NF-Y de 3 experimentos independientes. Barra negra: control sin competidor (=1). Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de un factor seguido de la corrección mediante el test post-hoc de Dunnet. \*:  $p < 0.01$  y \*\*:  $p < 0.001$  respecto al control sin competidor. **(B)** EMSAs utilizando las sondas radiactivas y los anticuerpos indicados. Sin Ab: control sin anticuerpo.

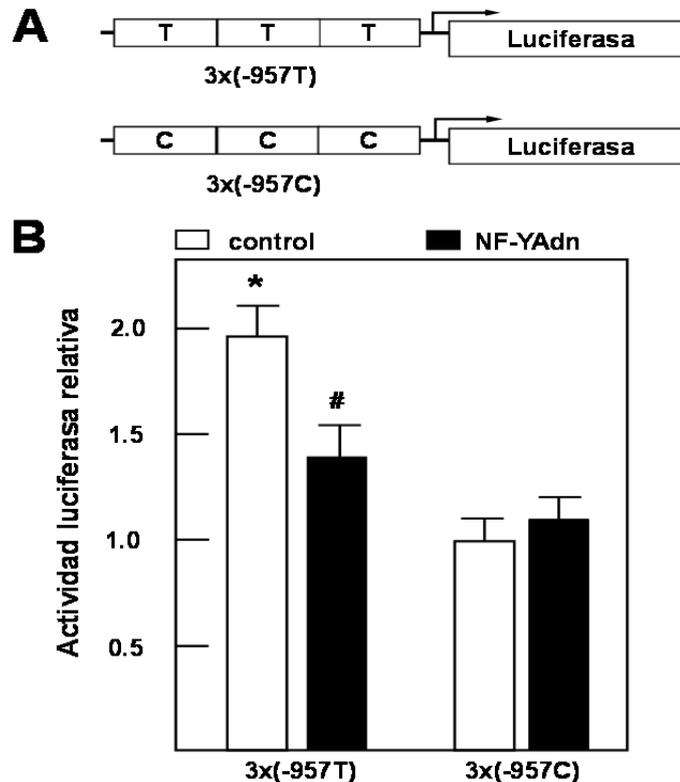
Células humanas U2OS en crecimiento asincrónico fueron transfectadas transitoriamente con las construcciones 3x(-957T), 3x(-957C) o el control *pGL3 promoter* vacío y tras 24 horas se midió la actividad luciferasa. Observamos que el vector controlado por las secuencias portadoras del alelo T (3x-957T) producía una actividad luciferasa 2 veces mayor que el control vacío, mientras que el vector 3x(-957C) no tenía efecto sobre la misma (**Figura 11B**). Además, la sobreexpresión de un mutante dominante negativo de la subunidad NF-YA (NF-YAdn) redujo significativamente la actividad luciferasa asociada a la construcción 3x(-957T) (**Figura 11B**, columnas blancas), pero no afectó la actividad luciferasa dependiente de la construcción 3x(-957C) (**Figura 11B**, columnas negras). En conjunto, estos resultados demuestran que la variante alélica -957T de rs350099 asociada a mayor riesgo de reestenosis genera un sitio de unión específico y funcional para el factor de transcripción NF-Y.

**La variante de riesgo -475C del polimorfismo rs350104 genera un sitio de unión a ADN para el factor de transcripción AP-1 de mayor eficiencia que la variante -475T**

El polimorfismo rs350104 (-475[T/C]) se localiza en la posición -475 de la región promotora del gen *CCNB1*, respecto al inicio de transcripción (+1, **Figura 9**). Considerando su localización en la región promotora del gen se hipotetizó que la presencia de las variantes alélicas T o C del polimorfismo influirán en la generación o interrupción de secuencias genéticas de unión a ADN de factores de transcripción, que afectarían a la actividad transcripcional del gen y en consecuencia a los niveles de expresión de la proteína ciclina B1.

Para comprobar esta hipótesis recurrimos al análisis *in silico* de la región promotora del gen en busca de secuencias consenso para factores de transcripción mediante el programa informático MatInspector™ y Match™, considerando la secuencias con la variante T o C del polimorfismo -475[T/C]. Teniendo en cuenta un límite de similitud entre las secuencias superior al 85% (“*core similitude treshold*” >85%), el programa predijo la existencia de una secuencia de unión a ADN para el factor de transcripción AP-1 (5'-TGTGACCCCTG-3') cuando se haya presente la

variante polimórfica C del polimorfismo 475[T/C] (-475C), pero no cuando se haya la variante T (-475T).



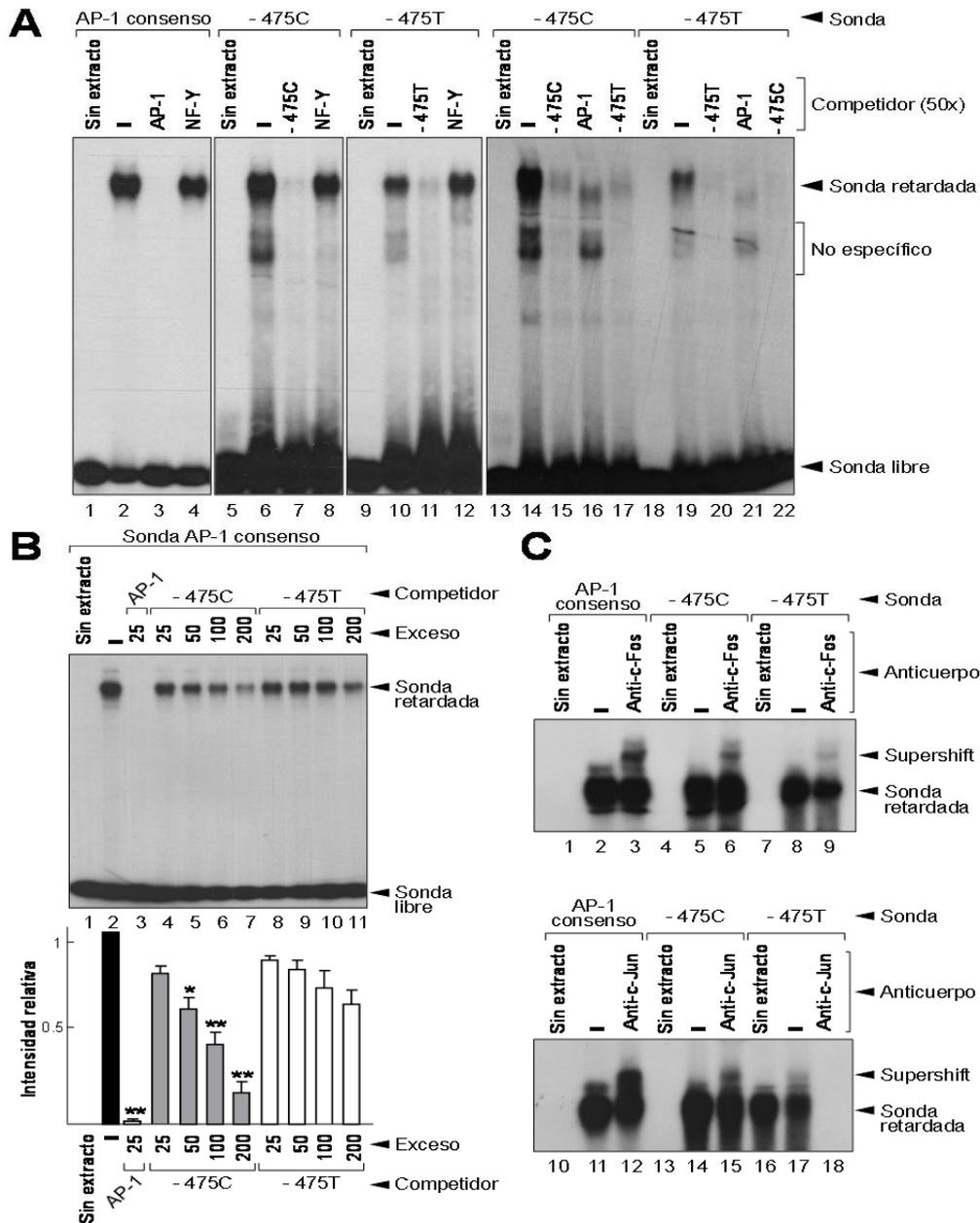
**Figura 11. La variante alélica -957T asociada a un riesgo aumentado de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario induce la expresión de un gen reportero vía NF-Y. (A)** Representación esquemática de los vectores reporteros utilizados en los ensayos de actividad luciferasa. **(B)** Células U2OS fueron co-transfectadas con los plásmidos pRL-Renilla (utilizado como control de la eficiencia de transfección) y los vectores reporteros indicados. Los ensayos fueron llevados co-transfectando sin (barras blancas) o con (barras negras) el vector de expresión que codifica para el mutante dominante negativo NF-YAdn. Los resultados se representan como el ratio luciferasa de luciérnaga/luciferasa de renilla relativizado al control pGL3-luciferasa (=1). Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de un factor seguido de la corrección mediante el test post-hoc de Dunnet (n=12 réplicas en 4 experimentos independientes). \*: p<0.001 respecto a pGL3-luciferasa y 3x(-957C)-luciferasa; #: p<0.01 respecto al control 3x(-957T)-luciferasa.

La funcionalidad de la secuencia de unión a AP-1 generada por la variante polimórfica C (-475C) predicha en los estudios *in silico* se validó mediante EMSA utilizando extractos nucleares de células humanas U2OS. Tal y como se muestra en la **Figura 12A**, la incubación de extractos nucleares con las sondas radiactivas -475C (**carriles 6 y 14**) o -475T (**carriles 10 y 19**) dieron lugar a una banda

retardada con una movilidad electroforética igual que la obtenida con la sonda radiactiva portadora de una secuencia consenso para AP-1 (AP-1 consenso, **carril 2**). Estas bandas fueron eficientemente competidas mediante la adición de un exceso de oligonucleótido no marcado radiactivamente -475C, -475T y AP-1 consenso (**carriles 7, 11 y 3**, respectivamente) pero no con un oligonucleótido no relacionado portador de la secuencia consenso de unión a NF-Y (**carriles 4, 8 y 12**). De forma reproducible, observamos que la sonda -475C produjo un complejo núcleo-proteico de mayor intensidad comparado con la sonda -475T, (**Figura 12A**). De acuerdo con este resultado, la adición de cantidades crecientes de oligonucleótido no marcado radiactivamente mostró una competición significativa de la actividad asociada a la sonda AP-1 consenso al incubarse con cantidades crecientes de -475C, pero no con cantidades equivalentes de -475T (**Figura 12B**).

Con el objetivo de identificar los miembros de la familia AP-1 presentes en los complejos núcleo-proteicos obtenidos se llevaron a cabo ensayos de *supershift* mediante incubación con anticuerpos específicos frente a c-Fos y c-Jun. Tanto la incubación con el anticuerpo anti-c-Fos (**Figura 12C, panel superior**) como el anticuerpo anti-c-Jun (**Figura 12C, panel inferior**) produjeron un retraso al ser incubados con las sondas AP-1 consenso (AP-1cons), -475C o -475T (**carriles 3, 6 y 9** y **carriles 12, 15 y 17**). Apoyando los resultados obtenidos en la figura **Figura 12B**, la intensidad de la banda retrasada fue mayor cuando incubamos con la sonda -475C comparado con la sonda -475T (**Figura 12C, carriles 6** respecto a **9** y **15** respecto a **17**).

Considerando los resultados obtenidos, hipotetizamos que la presencia de la variante polimórfica -475C aumenta la actividad transcripcional en vectores reporteros de forma dependiente de AP-1, comparado con la variante -475T. Para testar esta hipótesis se construyeron plásmidos portadores del gen reportero de la luciferasa, *pGL3 promoter* (pGL3p), bajo el control de un promotor mínimo y un tándem de 3 secuencias portadoras de los alelos C o T del polimorfismo -475[T/C] (**Figura 13A**). La sobreexpresión del factor de transcripción c-Fos en células U2OS transfectadas con los vectores reportero indujo un aumento significativo de la actividad luciferasa asociada a la construcción 3x(-475C) respecto al pGL3p vacío y a la construcción 3x(-475T) (**Figura 13B**).



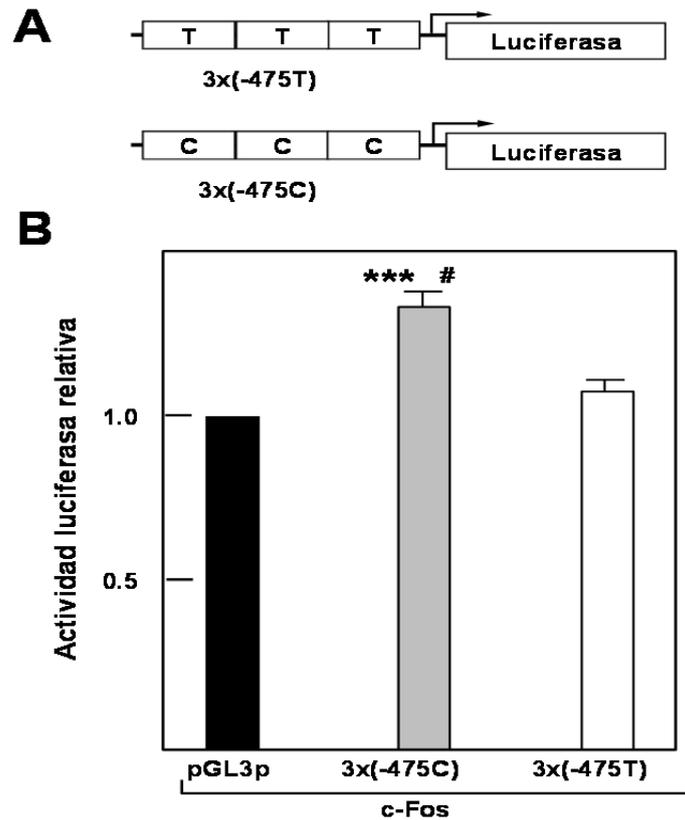
**Figura 12.** La variante alélica -475C localizada en el gen *CCNB1* asociada a un riesgo aumentado de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario genera un sitio de unión a ADN para el factor de transcripción AP-1 de mayor afinidad que la variante -475T. EMSAs incubando extractos nucleares obtenidos de células U2OS y las sondas y competidores indicados (Véase Materiales y Métodos, **Tabla 5**). Las autorradiografías son representativas de 3-5 experimentos. **(A, B)** Ensayos de competición utilizando las sondas radiactivas y los excesos indicados de oligonucleótido no marcado radiactivamente. La gráfica muestra la media de 5 experimentos independientes de las intensidades relativas de los complejos retardados sonda:AP-1. Barra negra: control sin competidor (=1). Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de un factor seguido de la corrección mediante el test post-hoc de Bonferroni. \*:  $p < 0.01$  y \*\*:  $p < 0.001$  respecto al control sin competidor. **(B)** EMSA utilizando las sondas radiactivas y los anticuerpos indicados. Solo se muestran las bandas retardadas.

En conjunto estos resultados demuestran que la variante polimórfica -475C presente en el promotor del gen *CCNB1* genera un sitio AP-1 de mayor eficiencia que el generado por la variante polimórfica -475T.

**La variante de riesgo +102G, pero no la variante +102T, del polimorfismo rs164390 genera un sitio de unión a ADN funcional para el factor de transcripción SP1**

Siguiendo el mismo planteamiento experimental que en el estudio de los polimorfismos -957[T/C] y -475[T/C] se analizó la posible implicación funcional del polimorfismo rs164390 (+102[G/T]), el cual se haya presente en la posición +102 de la región 3' UTR del promotor del gen humano *CCNB1* respecto al inicio de la transcripción (+1, **Figura 9**). Dada la relevancia de esta región en la regulación de la actividad transcripcional del gen, hipotetizamos que la presencia de las variantes alélicas G o T del polimorfismo afectarán a la generación o interrupción de las secuencias genéticas de unión a ADN de factores de transcripción. El reclutamiento diferencial de factores de transcripción sobre la región promotora puede afectar a la actividad promotora y con ello a los niveles de expresión del gen.

El análisis *in silico* de la región promotora mediante los programas MatInspector<sup>TM</sup> considerando las secuencias con la variante T o C del polimorfismo +102[G/T] no mostró diferencias en la unión teórica de factores de transcripción entre ambas secuencias. El análisis se realizó teniendo en cuenta un límite de similitud entre las secuencias superior al 85% (“*core similitude treshold*” >85%). Sin embargo, dada la similitud de la secuencia portadora de la variante G del polimorfismo +102[G/T] con la secuencia consenso del factor SP1, rica en guanina y citosina (GGGGCGGGGC), quisimos estudiar la posible unión diferencial de este factor de transcripción a las variantes alélicas del polimorfismo.



**Figura 13. La variante alélica -475C asociada a un riesgo aumentado de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario induce la expresión de un gen reportero vía AP-1.** Células U2OS fueron co-transfectadas con los plásmidos pRL-Renilla (utilizado como control de la eficiencia de transfección) y los vectores reporteros indicados. **(A)** Representación esquemática de los vectores reporteros 3x(-475C) y 3x(-475T) utilizados en los ensayos de actividad luciferasa. **(B)** Ensayos co-transfectando el vector de expresión que codifica la proteína c-Fos. Los resultados se representan como el ratio la luciferasa de luciérnaga/luciferasa de renilla relativizado al control pGL3p (=1). Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de un factor seguido de la corrección mediante el test post-hoc de Bonferroni (n=10 réplicas en 5 experimentos independientes). \*\*\*: p<0.001 respecto a pGL3-luciferasa y #: p<0.001 respecto 3x(-475T)- luciferasa.

El análisis de la posible unión de SP1 a la variante polimórfica +102G se realizó mediante EMSA utilizando extractos nucleares de células U2OS. Ensayos de competición mostraron que los complejos núcleo-proteicos formados al incubar la sonda radiactiva SP1 consenso con extractos nucleares (**Figura 14A, carriles 2 y 9**) fueron competidos eficientemente por un exceso de oligonucleótido no marcado de SP1 consenso (**Figura 14A, carriles 3 y 10**) y +102G (**Figura 14A, carriles 4-7**) pero no de oligonucleótido +102T (**Figura 14, carriles 11-14**). Además, la incubación de extractos nucleares con la sonda radiactiva +102G, pero

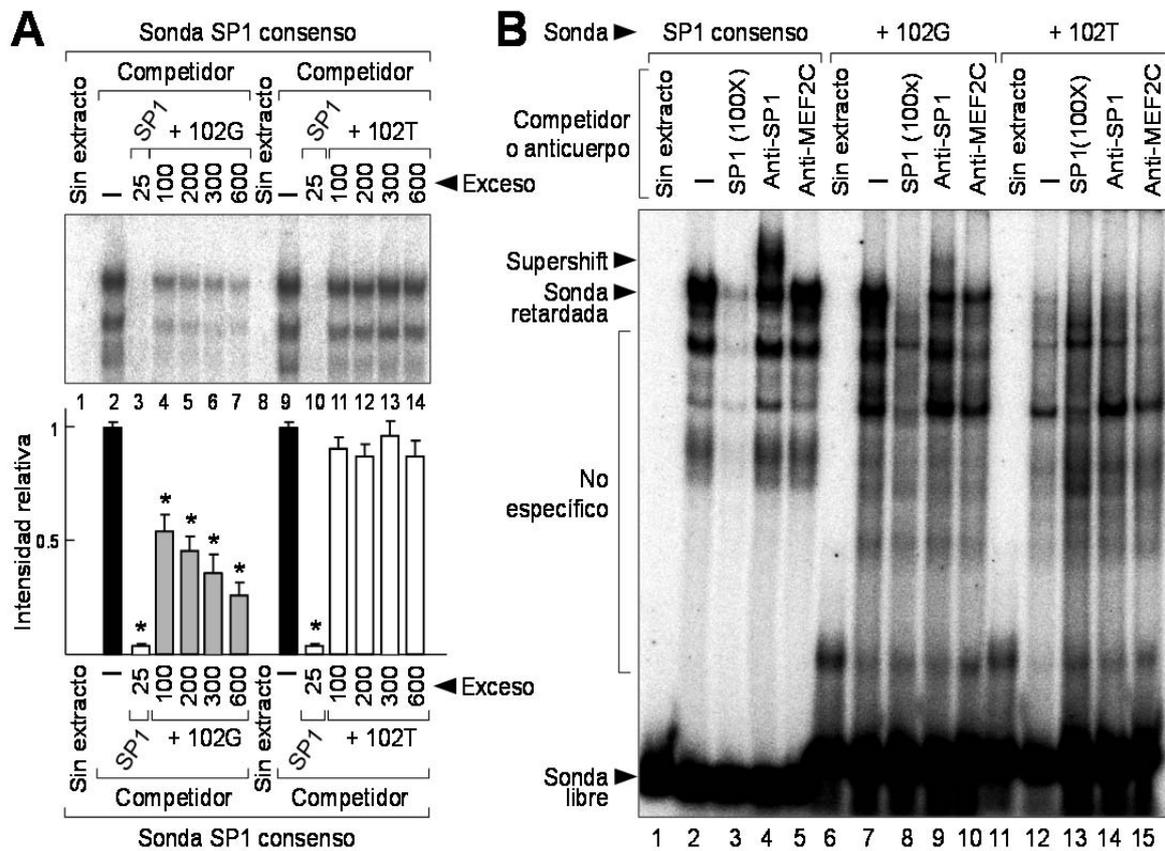
no con la sonda +102T, generó una banda retardada (**Figura 14B, carriles 7 y 12**, respectivamente) con la misma movilidad electroforética que la obtenida al incubar con la sonda SP1 consenso (**Figura 14B, carril 2**). La banda retardada obtenida al incubar con las sondas SP1 consenso y +102T se retardó al incubar con un anticuerpo anti-SP1 (**Figura 14B, carriles 4 y 9**, respectivamente) pero no con el anticuerpo control anti-MEF2C (**Figura 14B, carriles 5 y 10**, respectivamente).

Con el objetivo de estudiar la función de la variante polimórfica +102G en la actividad transcripcional del gen *CCNB1*, llevamos a cabo ensayos de actividad luciferasa bajo el control de las variantes alélicas del polimorfismo. La construcción de los vectores reporteros se realizó mediante la subclonación de un tándem de 3 secuencias portadoras de los alelos G o T del polimorfismo +102[G/T], como secuencias reguladoras de la transcripción en el plásmido pGL3p (**Figura 15A**). La sobreexpresión del factor de transcripción SP1 en células U2OS co-transfectadas con los vectores reportero indujo un aumento significativo de la actividad luciferasa asociada a la construcción 3x(+102G) respecto al pGL3p vacío y a la construcción 3x(+102T), que no mostró actividad superior al control pGL3p (**Figura 15B**).

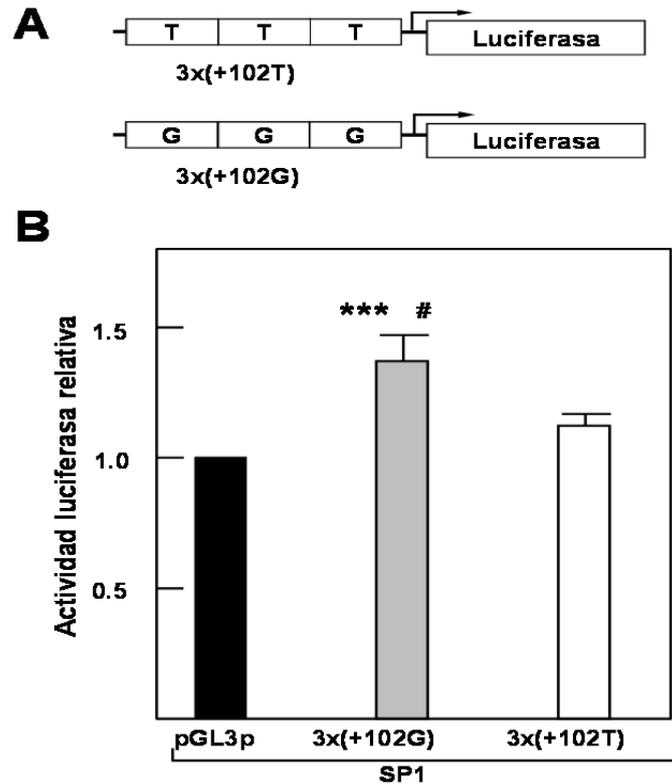
En conjunto, estos resultados sugieren que la variante alélica +102G del polimorfismo +102[G/T] asociada a un mayor riesgo de reestenosis tras implantación de *stent* coronario genera un sitio de unión a ADN funcional para el factor de transcripción SP1 en el promotor del gen *CCNB1* humano.

### **Individuos portadores del haplotipo formado por las 3 variantes polimórficas asociadas a un mayor riesgo de reestenosis presentan niveles aumentados de ARNm de ciclina B1 en linfocitos aislados de sangre periférica**

Como hemos demostrado anteriormente, el haplotipo formado por las variantes de mayor riesgo de sufrir ISR (Haplotipo 1: T-C-G) se asocia con un mayor riesgo de ISR tras implantación de *stent* (**Apartado 1, Tabla 21 y Figura 8**). Además, nuestros estudios moleculares demuestran que existe una actividad diferencial de unión a ADN de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, AP-1 y SP1

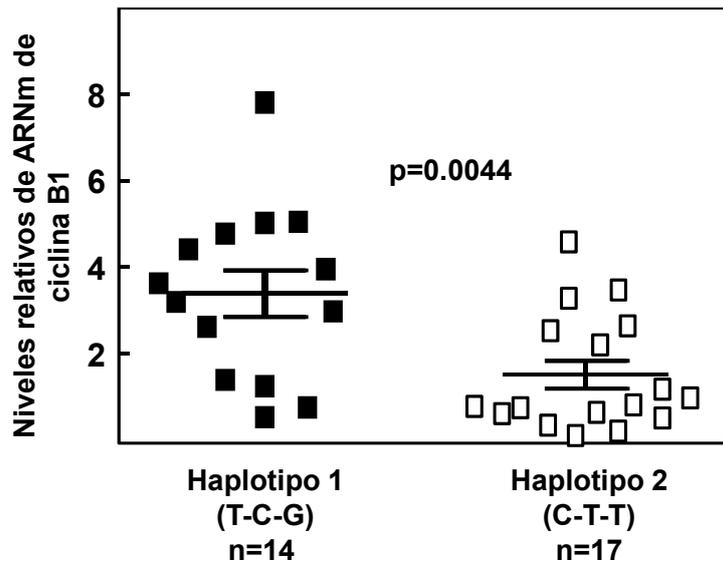


**Figura 14.** La variante alélica +102G localizada en el gen *CCNB1* asociada a un riesgo aumentado de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario genera un sitio de unión a ADN para el factor de transcripción SP1. EMSAs incubando extractos nucleares obtenidos de células U2OS y las sondas y competidores indicados (Véase Materiales y Métodos, Tabla 5). Las autoradiografías son representativas de 3-5 experimentos. **(A, B)** Ensayos de competición utilizando las sondas radiactivas y los excesos indicados de oligonucleótido no marcado radiactivamente. La gráfica muestra la media de 4-7 experimentos independientes de las intensidades relativas de los complejos retardados sonda:AP-1. Barra negra: control sin competidor (=1). Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de un factor seguido de la corrección mediante el test post-hoc de Dunnet. \*:  $p < 0.001$  respecto al control sin competidor. **(B)** EMSA utilizando las sondas radiactivas y los anticuerpos indicados.



**Figura 15.** La variante alélica +102G asociada a un riesgo aumentado de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario induce la expresión de un gen reportero vía SP1. Células U2OS fueron co-transfectadas con los plásmidos pRL-Renilla (utilizado como control de la eficiencia de transfección) y los vectores reporteros indicados. **(A)** Representación esquemática de los vectores reporteros 3x(+102G) y 3x(+102T) utilizados en los ensayos de actividad luciferasa. **(B)** Los ensayos fueron llevados a cabo co-transfectando el vector de expresión que codifica la proteína SP1. Los resultados se representan como el ratio la luciferasa de luciérnaga/luciferasa de renilla relativizado al control pGL3p (=1). Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de un factor seguido de la corrección mediante el test post-hoc de Bonferroni (n=15 réplicas en 5 experimentos independientes). \*\*\*: p<0.001 respecto a pGL3-luciferasa y #: p<0.05 respecto 3x(+102T)-luciferasa.

dependiente de la variante polimórfica presente en los SNPs -957[T/C], -475[T/C] y +102[G/T], respectivamente (**Figuras 10-15**). Teniendo en cuenta estos resultados, quisimos evaluar la relación entre los haplotipos más frecuentes presentes en nuestras cohortes y la expresión de la ciclina B1. El análisis de los niveles de ARNm de ciclina B1 en linfocitos aislados de sangre periférica de donantes voluntarios mostró niveles 2.23 veces mayores en los individuos portadores del haplotipo 1 (T-C-G) respecto a los portadores del haplotipo 2 (C-T-T) (**Figura 16**).



**Figura 16. Linfocitos aislados de sangre periférica de donantes homocigotos para el haplotipo H1 de la ciclina B1 asociado a un mayor riesgo de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario expresan niveles aumentados de ARNm de ciclina B1.** Niveles relativos de ARNm de ciclina B1 analizado por qPCR en linfocitos aislados de sangre periférica de donantes sanos portadores del haplotipo 1 (-957T/-475C/+102G (T/C/G)) o del haplotipo 2 (-957C/-475T/+102G (C/T/T)). Los resultados fueron analizados por test de t de Student, no pareado y de dos colas.

En conjunto, estos resultados sugieren que el haplotipo portador de las variantes asociadas a un mayor riesgo de ISR (T-C-G) se relaciona con niveles aumentados de ARNm de ciclina B1 debido a un mayor reclutamiento de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, AP-1 y SP1 a las variantes alélicas de mayor riesgo -957T, -475C y +102G, respectivamente.

## DISCUSIÓN

Los SNPs son marcadores genéticos que se han asociado con la susceptibilidad individual a sufrir enfermedades complejas (Lohmueller, Pearce et al. 2003). Además, pueden tener un efecto directo sobre la funcionalidad de los genes en los que se hayan presentes o bien en genes cercanos (Chorley, Wang et al. 2008; Hardy and Singleton 2009). La influencia de un polimorfismo en la función de un gen depende de su localización dentro de la estructura del gen. Así, el efecto sobre la actividad de un gen ha sido ampliamente estudiado en aquellos polimorfismos localizados en regiones codificantes del gen, dando lugar a la generación de cambios no sinónimos que provocan cambios en la secuencia de aminoácidos de la proteína. Estos cambios aminoacídicos pueden generar cambios en el plegamiento correcto de la proteína, cambios de polaridad, defectos en la fosforilación y otros efectos que desembocan en un efecto directo sobre la actividad de la proteína. La importancia de estos polimorfismos se ha puesto de manifiesto mediante estudios farmacogenéticos que pretenden analizar el efecto de la variabilidad genética interindividual en la respuesta al tratamiento con fármacos (Evans and Relling 1999). En el mismo sentido, la presencia de polimorfismos en regiones reguladoras del gen (región promotora, región 3' y 5' UTR, potenciadores, silenciadores o regiones intrónicas) puede afectar a la actividad transcripcional del gen o a la maduración del ARNm, afectando en último término a la expresión y/o actividad de la proteína codificada (Ponomarenko, Orlova et al. 2002).

Nuestro estudio de asociación genética se centró en el análisis de SNPs presentes en regiones reguladoras de genes de control del ciclo celular, tales como la región promotora, región 3' y 5' UTR o en regiones intrónicas del gen. Teniendo en cuenta la importancia de los polimorfismos genéticos en la modulación de la expresión y/o actividad de un gen, el estudio de la implicación funcional de los SNPs identificados, asociados con un mayor riesgo de ISR, es importante para su validación como posibles biomarcadores de la reestenosis. Así, nuestros estudios funcionales de los SNPs -957[T/C], -475[T/C] y +102[G/T] (localizados en la región promotora del gen *CCNB1*) demuestran su implicación en la modulación de la

capacidad de unión de factores de transcripción al ADN, afectando, en último término, a la actividad transcripcional y expresión del gen (**Figura 10-16**).

Estudios previos han identificado al factor de transcripción NF-Y como la principal proteína capaz de interactuar con la secuencia CCAAT, uno de los elementos reguladores más comunes presente en los promotores eucarióticos, tanto en orientación directa como inversa (Mantovani 1999; Dolfini, Zambelli et al. 2009; Dolfini, Gatta et al. 2012). NF-Y es un factor de transcripción ubicuo formado por 3 subunidades, NF-YA, B y C, cuya función se asocia a la regulación transcripcional de un gran número de genes, principalmente genes reguladores del ciclo celular y en concreto, de la fase G2/M (Mantovani 1999). Mediante EMSAs demostramos que la variante -957T asociada a un mayor riesgo de reestenosis genera una secuencia CCAAT en la posición -959/-955 respecto al sitio de inicio de la transcripción en el gen *CCNB1*, tal y como se predijo en el estudio *in silico* previo. Este sitio de unión de NF-Y no descrito previamente permite la regulación transcripcional del gen reportero de la luciferasa de un modo dependiente de subunidad NF-Y. Cabe destacar que la correcta regulación transcripcional de diversos genes del ciclo celular requiere de la actividad conjunta de múltiples secuencias CCAAT (Mantovani 1998), o bien por la estabilización de los complejos NF-Y (Salsi, Caretti et al. 2003) o incrementando la afinidad por su sitio de unión a ADN de co-activadores de la transcripción génica (Liberati, di Silvio et al. 1999). Además, pese a que la mayor parte de las secuencias CCAAT se localizan en los 150 primeras pares de bases antes y después del inicio de transcripción (Dolfini, Zambelli et al. 2009), estudios de ChIP-on-chip han permitido identificar múltiples secuencias CCAAT en regiones alejadas del inicio de la transcripción (Testa, Donati et al. 2005). Es por tanto posible que exista una actividad cooperativa del motivo CCAAT localizado en la región -959/-955 en individuos homocigotos para la variante T del polimorfismo -957[T/C] con las cajas CCAAT presentes en las posiciones -17/-13 y +16/+20 del promotor del gen *CCNB1*, favoreciendo la inducción de la transcripción del gen.

La familia de factores de transcripción heterodiméricos AP-1 es responsable del control de diversos procesos celulares como la diferenciación, apoptosis y proliferación celular, en respuesta a múltiples estímulos fisiológicos y patológicos a

través de la regulación de genes diana portadores del motivo TPA (TRE: 5'-TGAG/CTCA-3') (Sylvester, Chen et al. 1998; Shaulian and Karin 2001; Shaulian and Karin 2002). En el contexto de la enfermedad reestenótica, la actividad AP-1 se induce tras daño mecánico en modelo de angioplastia con balón (Hu, Cheng et al. 1997; Sylvester, Chen et al. 1998; Ahn, Morishita et al. 2002) o de implantación de *stent* (Murrell, Khachigian et al. 2007). En este sentido, se ha demostrado que el factor AP-1/c-Fos es esencial para la activación de la ciclina A y para la proliferación de las CMLVs (Sylvester, Chen et al. 1998). Además, estudios de terapia génica han demostrado que la inactivación de AP-1 reduce la formación de la lesión neoíntima en modelos animales (Ahn, Morishita et al. 2002; Buchwald, Wagner et al. 2002; Kume, Komori et al. 2002). La función proliferativa de los factores AP-1 depende de su capacidad de regulación la expresión de los genes reguladores del ciclo celular ciclina D1, ciclina A, ciclina E, p53, p21<sup>Cip1</sup>, p16<sup>Ink4a</sup> y ARF (Hess, Angel et al. 2004). Nuestros ensayos funcionales demuestran que la presencia del alelo de mayor riesgo de ISR -475C del polimorfismo -475[T/C] localizado en la región promotora del gen *CCNB1* une miembros de la familia AP-1 (c-Jun y c-Fos) con una afinidad mayor que la variante polimórfica T de menor riesgo. Además, la sobreexpresión de c-Fos aumenta significativamente la actividad luciferasa de un promotor regulado por un tándem de secuencias portadoras del alelo -475C comparado con el alelo -475T.

El factor de transcripción SP1 se ha asociado con la regulación de la proliferación celular al promover la inducción de genes pro-proliferativos mediante su unión a la secuencia de ADN rica en GC, 5'-(G/T)GGGCGG(G/A)(G/A)(C/T)-3' (Wierstra 2008). Nuestros análisis funcionales mostraron que el alelo +102G del polimorfismo +102[G/T], asociado a mayor riesgo ISR tras implantación de *stent*, genera un sitio de unión para SP1. Además, nuestros ensayos con genes reporteros demostraron que la presencia de este sitio confiere una activación transcripcional dependiente de SP1. Estudios previos han demostrado la existencia de genes cuya regulación transcripcional depende de la acción cooperativa de dos o más sitios de unión SP1 (Wierstra 2008). Nuestros resultados sugieren que individuos homocigotos +102GG presentan un sitio de unión SP1 adicional que puede actuar de forma cooperativa en la regulación transcripcional de la ciclina B1 junto con las secuencias localizadas en las posiciones -259/-255 y -140/-136,

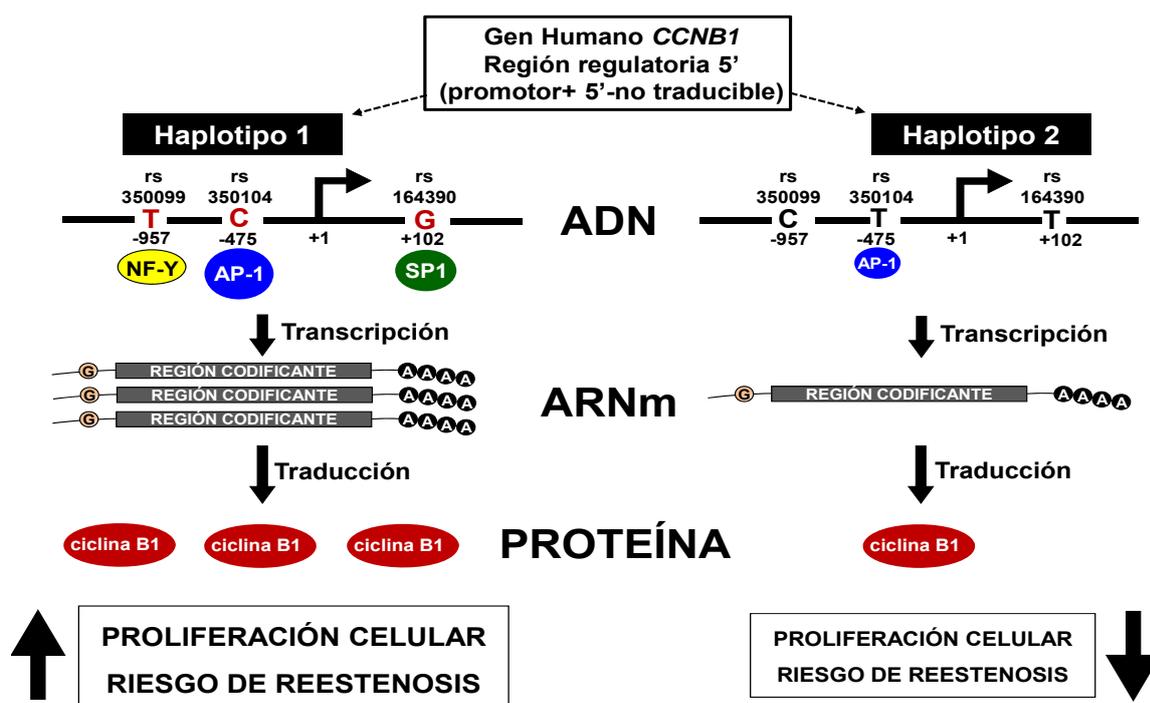
previamente descritas y esenciales en la actividad basal del promotor (Porter and Donoghue 2003; Wierstra 2008).

La importancia funcional de estas variantes polimórficas en la expresión *in vivo* de la ciclina B1 se pone de manifiesto al observar que linfocitos aislados de sangre periférica obtenidos de individuos portadores del haplotipo asociado a mayor riesgo de ISR tras implantación de *stent* presentan niveles mayores de ARNm de *CCNB1* (inducción 2.23 veces mayor) respecto a aquellos portadores del haplotipo de menor riesgo.

En conjunto, nuestros resultados sugieren una regulación transcripcional alelo-dependiente del gen *CCNB1* asociado a los SNPs rs350099, rs350104 y rs164390, que afecta al riesgo de sufrir ISR tras implantación de *stent* mediante el reclutamiento diferencial de los factores de transcripción NF-Y, AP-1 y SP1 respectivamente (**Figura 17**). Cabe destacar que Bouatia-Naji y colaboradores demostraron recientemente que el alelo A del polimorfismo rs13431652 del promotor *G6PC2* genera un sitio funcional para NF-Y que se asocia con niveles elevados de glucosa en plasma (Bouatia-Naji, Bonnefond et al. 2010). Por otro lado, una mutación en la secuencia CCAAT del promotor del gen *TERC*, suprime la capacidad de unión de NF-Y y se asocia con una enfermedad humana vinculada a alteraciones de la actividad telomerasa, poniendo de manifiesto que diferencias alélicas en el reclutamiento de NF-Y pueden contribuir al desarrollo de enfermedades humanas (Aalbers, Kajigaya et al. 2012). De igual manera, otros trabajos han demostrado la asociación de polimorfismos en genes reguladores de enfermedades como el lupus o la enfermedad coronaria modulando la actividad de unión a ADN de factores AP-1 y en último término, la expresión del gen (Jormsjo, Ye et al. 2000; Olfieriev, Masuda et al. 2007). También la regulación polimórfica de la actividad SP1 puede explicar la asociación de diversos SNPs y la susceptibilidad a sufrir hiperglicemia de ayuno, infarto aterotrombótico y cáncer de pulmón, mama y ovario (Jormsjo, Ye et al. 2000; Gasperikova, Tribble et al. 2009; Matsushita, Ashikawa et al. 2010; Zhang, Lu et al. 2010; Knappskog, Bjornslett et al. 2011).

En conclusión, la regulación de promotores humanos por sitios de unión polimórficos para NF-Y, AP-1 y SP1 puede contribuir a la variabilidad genética

interindividual en diversos escenarios patofisiológicos. En el caso de la reestenosis tras implantación de *stent*, nuestros estudios han identificado a los SNPs rs350099, rs350104 y rs164390 en la región reguladora 5' del gen *CCNB1* que afectan al riesgo individual de sufrir la enfermedad, posiblemente como consecuencia de un reclutamiento diferencial de NF-Y, AP-1 y SP-1. En este sentido, van Tiel y colaboradores demostraron que el polimorfismo -838C>A en el gen *CDKN1B* (que codifica para el inhibidor del ciclo celular p27<sup>Kip1</sup>) modula la actividad transcripcional del promotor y se asocia con un riesgo aumentado de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario (van Tiel, Bonta et al. 2009). Por tanto, la influencia de polimorfismos comunes en genes de ciclo celular puede contribuir a la susceptibilidad individual de sufrir reestenosis tras implantación de *stent*, al menos en parte modulando la expresión y actividad de las proteínas codificadas.



**Figura 17. Modelo del riesgo aumentado de ISR dependiente de la regulación transcripcional polimórfica del gen *CCNB1*.** Las variantes polimórficas -957T de rs350099, -475C de rs350104 y +102G de rs164390 aumentan el reclutamiento de los factores de transcripción NF-Y, AP-1 y SP-1, respectivamente, al promotor humano del gen *CCNB1*. En individuos portadores del haplotipo H1 (-957T/-475C/+102G), el mayor reclutamiento de NF-Y, AP-1 y SP-1 puede generar niveles aumentados de ARNm de *CCNB1* contribuyendo a una mayor proliferación de CMLVs y, por lo tanto, al mayor riesgo ISR tras implantación de *stent*. Por el contrario, la reducción en el reclutamiento de estos factores de transcripción en individuos portadores del haplotipo H2 (-957C/-475T/+102T) se asocia con niveles inferiores de ciclina B1 y un menor riesgo de ISR.



### **3. Papel del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en reestenosis y aterosclerosis**



## ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

NF- $\kappa$ B es una proteína esencial en la activación transcripcional de diversos genes reguladores del ciclo celular, especialmente aquellos implicados en la progresión a través de la fase G2/M. Concretamente en el caso de la ciclina B1, la delección de las subunidades que componen NF- $\kappa$ B resulta en la inhibición de la expresión de la ciclina B1 y de la proliferación celular. Trabajos previos han identificado dos sitios de unión a ADN para NF- $\kappa$ B esenciales para la actividad transcripcional basal e inducida del gen *CCNB1*. En esta tesis doctoral hemos demostrado que el alelo T del SNP rs350099 (-957 [T/C]) genera un sitio de unión de NF- $\kappa$ B en posición -959/-955 que se asocia con mayor expresión del gen y un riesgo aumentado de ISR. Sin embargo, si bien la relevancia de NF- $\kappa$ B en la patología hiper-proliferativa ha quedado de manifiesto en el contexto del desarrollo tumoral en diversos tipos de cáncer, no existen evidencias previas sobre su función en enfermedades vasculo-proliferativas, como la reestenosis y la aterosclerosis nativa. Por lo tanto, el objetivo del **Apartado 3** es el estudio del papel del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en reestenosis y aterosclerosis nativa.

Los objetivos concretos son:

1. Estudiar el papel del NF- $\kappa$ B en el desarrollo de la lesión neointima inducida por daño mecánico.
2. Estudiar el papel del NF- $\kappa$ B en el desarrollo de la aterosclerosis nativa.
3. Estudiar el papel del NF- $\kappa$ B en el control de la proliferación de CMLVs en el contexto de la enfermedad vascular.



## RESULTADOS

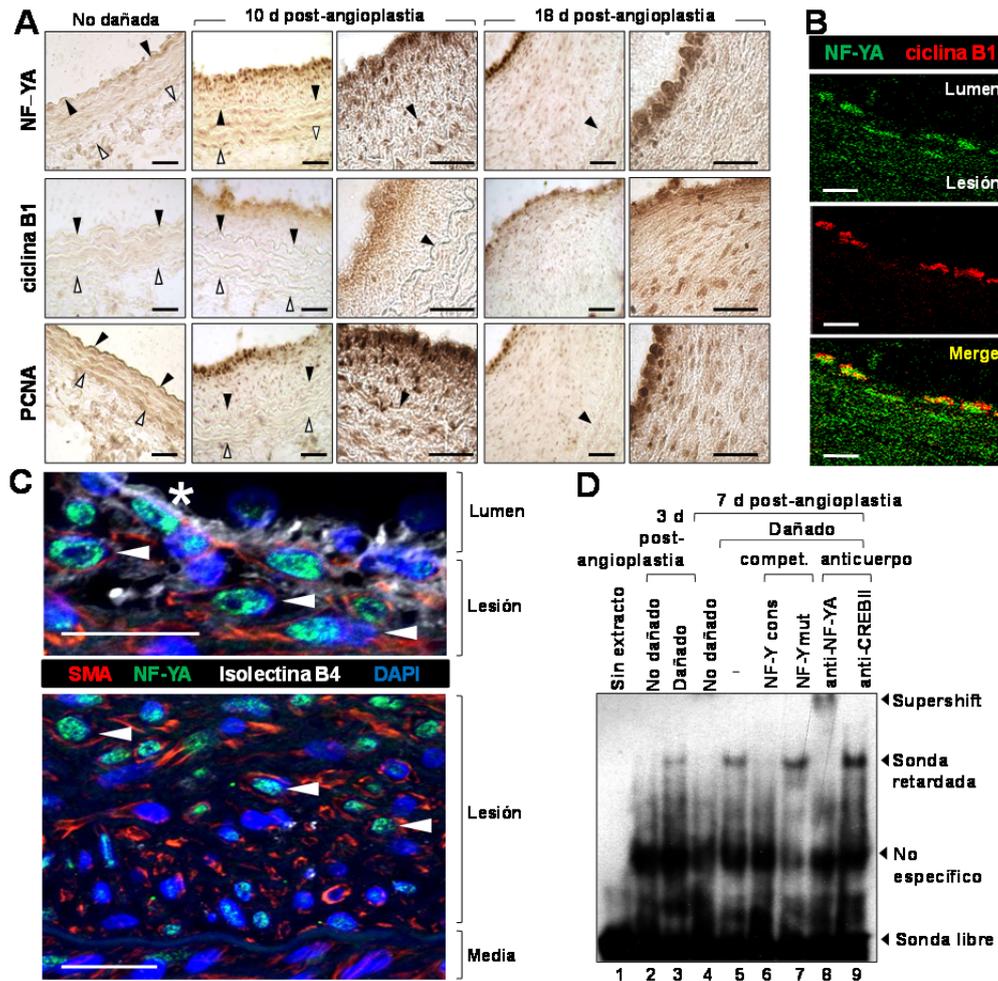
### La expresión y la actividad de unión a ADN del factor de transcripción NF-Y aumentan durante el desarrollo de la lesión neoíntima inducida por daño mecánico

Con el objetivo de estudiar el posible papel de NF-Y en el desarrollo de la lesión neoíntima inducida por daño mecánico analizamos, utilizamos en primer lugar el modelo de angioplastia con balón en la arteria carótida de rata. El estudio se centró en la subunidad NF-YA, portadora del dominio de transactivación del ADN, pues la regulación de sus niveles permite el control de la función del factor de transcripción (Mantovani 1999; Manni, Caretti et al. 2008).

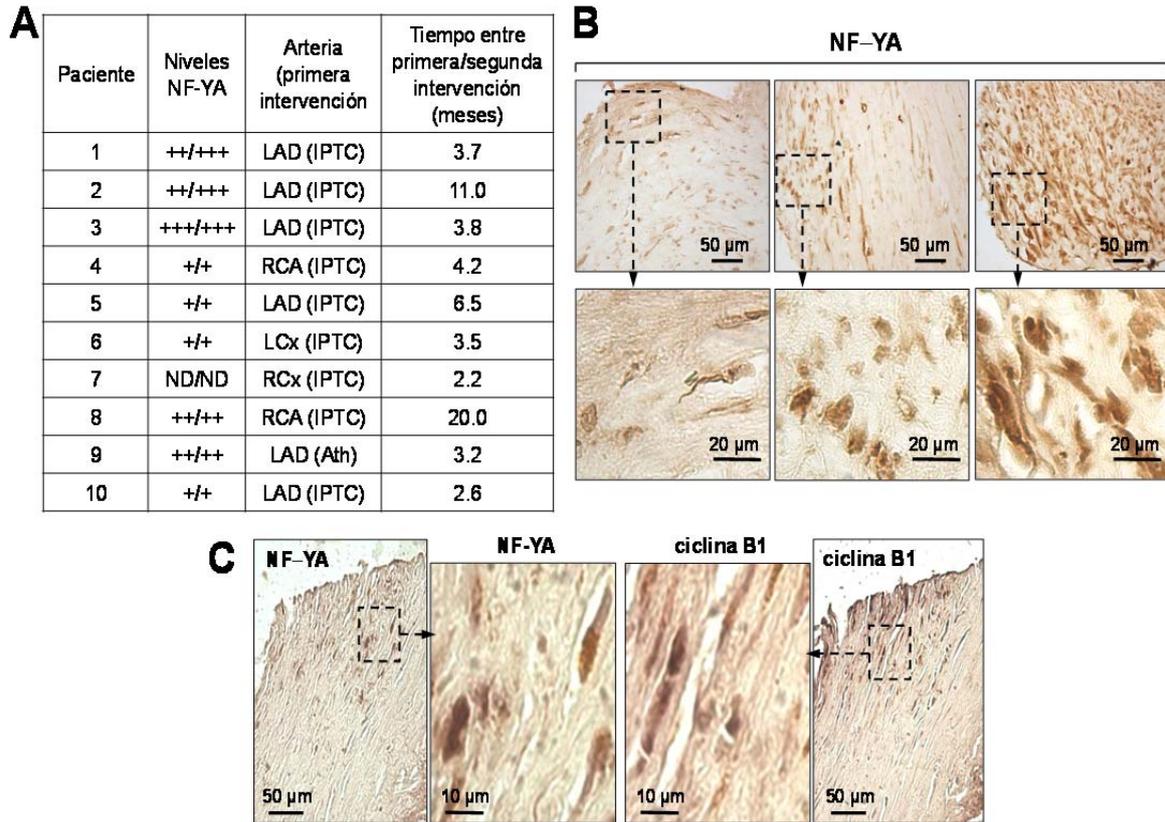
La expresión de NF-YA se analizó mediante ensayos de inmunohistoquímica en arterias no dañadas (n=4) y en estadios iniciales (7-12 días tras la angioplastia, n=5) y tardíos (14-18 días tras la angioplastia, n=4) de la enfermedad. Mientras que en las arterias no dañadas la expresión es baja o muy baja, observamos una clara inducción de la expresión de NF-YA en la lesión neoíntima tras 10 días y 18 días, localizándose una mayor expresión, en este último caso, en el borde luminal de la lesión (**Figura 18A**). A continuación quisimos comprobar si la expresión de NF-YA se correlacionaba con los niveles de ciclina B1 y de proliferación celular, analizado mediante el marcador PCNA. El análisis de la expresión de estas proteínas en cortes consecutivos mostró una correlación espacio-temporal entre la expresión de NF-YA, ciclina B1 y PCNA. La cuantificación mediante análisis planimétrico reveló los siguientes porcentajes de área de lesión neoíntima inmunoreactiva en estadios tempranos y tardíos tras angioplastia:  $34\pm 7\%$  y  $29\pm 5\%$  para NF-YA,  $28\pm 5\%$  y  $30\pm 10\%$  para ciclina B1, y  $37\pm 10\%$  y  $22\pm 7\%$  para PCNA. Además, el análisis de la expresión de NF-YA y ciclina B1 mediante microscopía confocal doble reveló la colocalización de ambas proteínas en el borde luminal de la lesión tras 18 días de la realización del daño mecánico (**Figura 18B**) e identificó a las CMLVs de la lesión neoíntima como las principales células que expresan NF-YA (**Figura 18C**). Estos estudios también mostraron expresión de NF-YA en células endoteliales presentes en lesiones neoíntimas avanzadas (**Figura 18C**).

Con el objetivo de determinar si el incremento en la expresión de NF-YA durante el desarrollo de lesión neointima en el mismo modelo animal se correlaciona con un aumento de su actividad de unión a ADN, se realizaron EMSAs incubando extractos de arteria sometida a angioplastia o control sin lesionar con una sonda marcada radiactivamente portadora de un sitio consenso para NF-Y (NF-Y (-26/-1)). Tal y como se muestra en la **Figura 18D**, no se observa actividad de unión a ADN de NF-Y en las arterias carótidas no dañadas (**carriles 2 y 4**), mientras que se observa una inducción creciente de la actividad a los 3 (**carril 3**) y 7 (**carril 5**) días tras el daño mecánico. La especificidad de las interacciones núcleo-proteicas se determinó mediante ensayos de competición incubando con un exceso de oligonucleótido NF-Y (-26/-1) no marcado radiactivamente. Mientras que NF-Y (-26/-1) compitió eficientemente la banda retardada (**carril 6**), el oligonucleótido mutado NF-Ymut no disminuyó la intensidad de la banda retardada (**carril 7**). La presencia de NF-Y en los complejos núcleo-proteicos formados se confirmó mediante ensayos de *supershift* incubando con un anticuerpo específico de NF-YA, el cual produjo un mayor retardo de la banda (**carril 8**). Por el contrario, la incubación con el anticuerpo control anti-CREBII no provocó “super-retardo” (**carril 9**).

Tras demostrar la inducción de NF-YA durante el desarrollo de la lesión neointima en el modelo animal, quisimos estudiar su expresión en lesiones reestenóticas de pacientes obtenidas por aterectomía percutánea direccional (Bauriedel, Schluckebier et al. 1998). Los estudios inmunohistoquímicos mostraron la presencia de NF-YA en lesiones de 9 de los 10 pacientes analizados, con diferentes grados de expresión (**Figura 19A y 19B**). Además, en concordancia con los resultados obtenidos en el modelo animal de angioplastia con balón en la carótida de rata, el estudio de la expresión de NF-YA y ciclina B1 en cortes consecutivos mostró la presencia de regiones de expresión de ambas proteínas (**Figura 19C**).



**Figura 18. Sobreexpresión de NF-YA y ciclina B1 e inducción de la actividad NF-Y de unión a ADN en la lesión neoíntima tras angioplastia con balón en la arteria carótida de rata. (A)** Imágenes representativas del análisis inmunohistoquímico de NF-YA, ciclina B1 y PCNA en lesiones neoíntimas en estadios tempranos y avanzados tras angioplastia con balón en arteria carótida de rata (10 y 18 días tras angioplastia, respectivamente). Flechas negras: lámina elástica interna; Flechas blancas: lámina elástica externa. **(B)** Inmunofluorescencia por microscopía confocal mostrando co-localización de NF-YA y ciclina B1 en la superficie luminal de la lesión neoíntima 18 días tras angioplastia. Barra: 10  $\mu$ m. **(C)** Inmunofluorescencia por microscopía confocal de la lesión neoíntima (14 días tras angioplastia) mostrando expresión de isolectina B4 (señal blanca, células endoteliales), smooth muscle  $\alpha$ -actin (SMA, señal roja, CMLVs), NF-YA (señal verde) y núcleos (señal azul, DAPI). Las flechas y asteriscos muestran células doblemente positivas para NF-YA/SMA y NF-YA/isolectina B4, respectivamente. Barra: 20  $\mu$ m. **(D)** EMSA representativo incubando lisados arteriales (mezcla de 3 arterias) y la sonda radiactiva NF-Y consenso (NF-Y cons) portadora del sitio de unión a NF-Y (CCAAT) en la posición -17/-13 del promotor del gen *CCNB1* humano. Los ensayos de competición fueron llevados a cabo añadiendo un exceso (100x) de oligonucleótido NF-Y cons o mutado (NF-Y mut) no marcado radiactivamente. Los ensayos de *supershift* se realizaron incubando los extractos proteicos con los anticuerpos indicados.



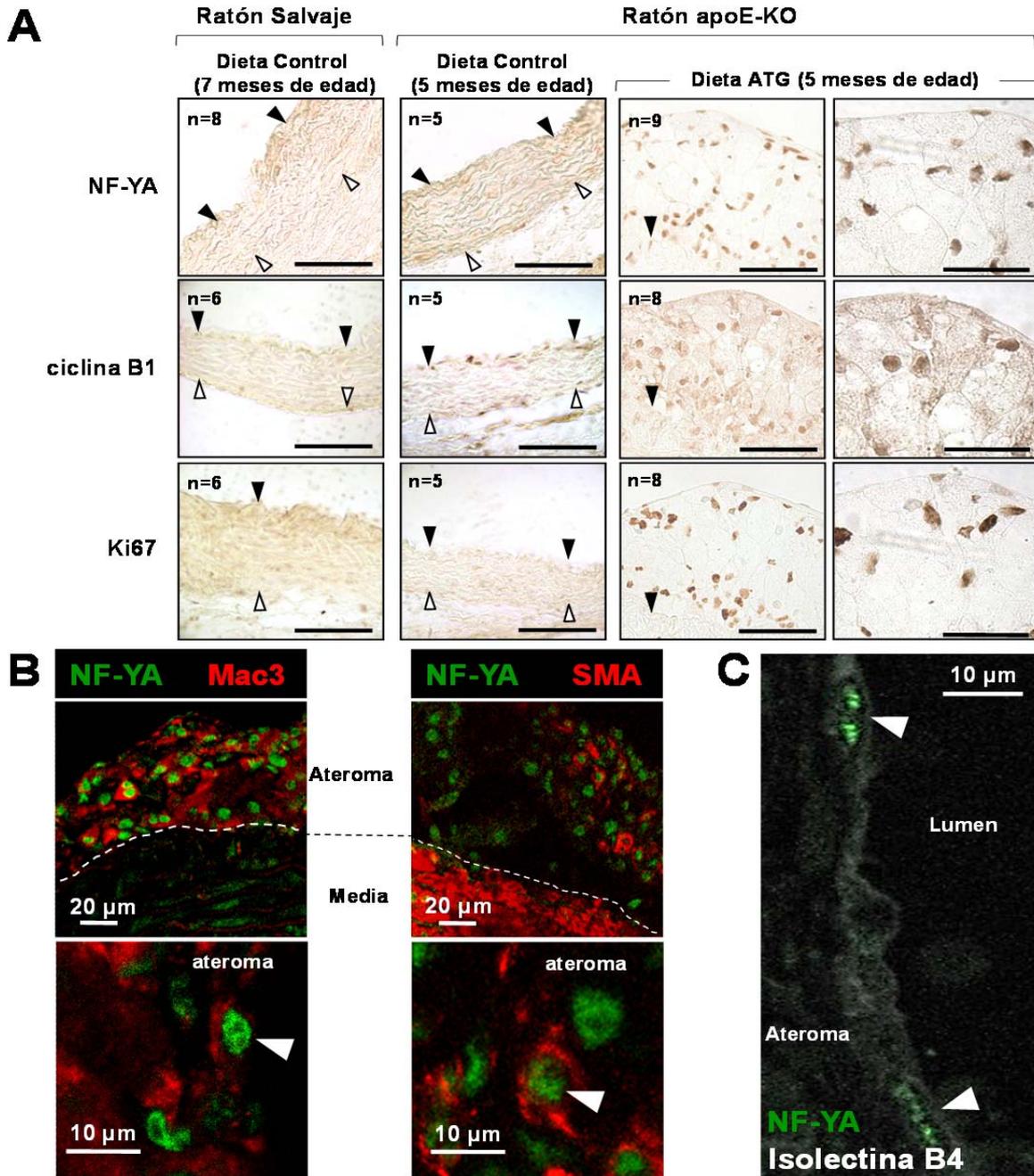
**Figura 19. Expresión de NF-YA y ciclina B1 en tejido reestenótico coronario humano.** Análisis inmunohistoquímico de NF-YA en tejido reestenótico coronario obtenido mediante endarterectomía realizada tras el intervalo de tiempo indicado después de la primera intervención (IPTC o aterectomía: Ath). LAD: *left anterior descending*, arteria coronaria anterior descendente; RCA: *right coronary artery*, arteria derecha coronaria; LCx: *left circumflex*, arteria coronaria izquierda circunfleja; RCx: *right circumflex*, arteria coronaria derecha circunfleja. **(A)** El grado de señal inmunohistoquímica fue evaluada por dos observadores independientes (observador 1/observador 2) de acuerdo con una escala semicuantitativa (ND: no detectada; +: débil; ++: moderada; +++: alta). **(B)** Ejemplos de expresión de NF-YA en diferentes especímenes. **(C)** Imágenes representativas de la expresión de NF-YA y ciclina B1 en cortes consecutivos de un mismo espécimen.

En conjunto estos resultados en el modelo de angioplastia en carótida de rata y tejido humano demuestran que el factor de transcripción NF-Y se induce y se activa durante el desarrollo de lesiones reestenóticas y sugieren su posible implicación en el desarrollo de la lesión neointima inducida por daño mecánico.

### **La expresión y actividad de unión a ADN de NF-Y se inducen en la lesión aterosclerótica nativa**

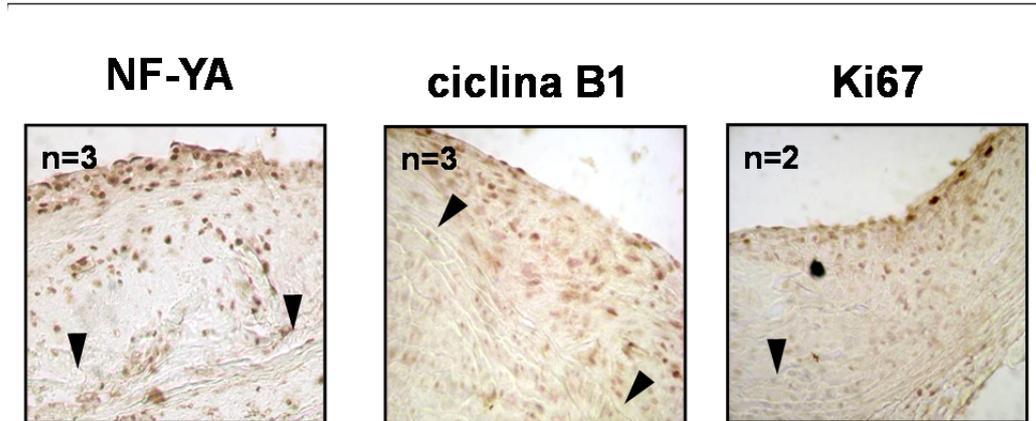
Como hemos explicado anteriormente, la proliferación y migración excesiva de las CMLVs juegan un papel esencial en la reestenosis. En el caso de la aterosclerosis nativa, en general se acepta que la proliferación celular contribuye significativamente al desarrollo de la lesión en las fases iniciales y es mucho menos relevante en fases tardías (Fuster, Fernandez et al. 2010). Dado el papel de NF-Y en la regulación de la proliferación celular, y su inducción en la lesión reestenótica, quisimos estudiar su implicación en la aterosclerosis nativa.

Para analizar la expresión de NF-Y en la lesión ateromatosa se llevaron cabo ensayos de inmunohistoquímica frente a la subunidad NF-YA en el modelo murino deficiente en apolipoproteína E, apoE-KO, caracterizado por su susceptibilidad al desarrollo de aterosclerosis. La expresión de NF-YA, ciclina B1 y el marcador de proliferación Ki67 fue baja o muy baja en animales de 7 meses de edad de genotipo silvestre y en animales apoE-KO de 5 meses de edad, ambos alimentados con dieta control (**Figura 20A**). Por el contrario, las 3 proteínas se indujeron fuertemente en lesiones ateromatosas, en ratones apoE-KO de 5 meses de edad alimentados con dieta rica en grasas y colesterol durante los 3 últimos meses (**Figura 20A**), así como formadas espontáneamente en ratones apoE-KO de 10 meses de edad alimentados con dieta control (**Figura 21**). La expresión de NF-YA, ciclina B1 y Ki67 se analizó en cortes consecutivos, observando regiones con una fuerte expresión de las 3 proteínas. La cuantificación en aorta de ratones apoE-KO reveló los siguientes porcentajes de área inmunoreactiva para las lesiones de aterosclerosis espontánea e inducida por dieta rica en grasas, respectivamente: NF-YA:  $30\pm 4\%$  y  $30\pm 4\%$ ; ciclina B1:  $33\pm 3\%$  y  $25\pm 2\%$ , Ki67:  $19\pm 1\%$  y  $9\pm 2$ . Además, mediante ensayos de inmunofluorescencia confocal observamos una expresión abundante de NF-YA tanto en macrófagos como CMLVs presentes en la lesión neoíntima (**Figura 20B**), así como en algunas células endoteliales presentes en el borde luminal de la lesión ateromatosa (**Figura 20C**).



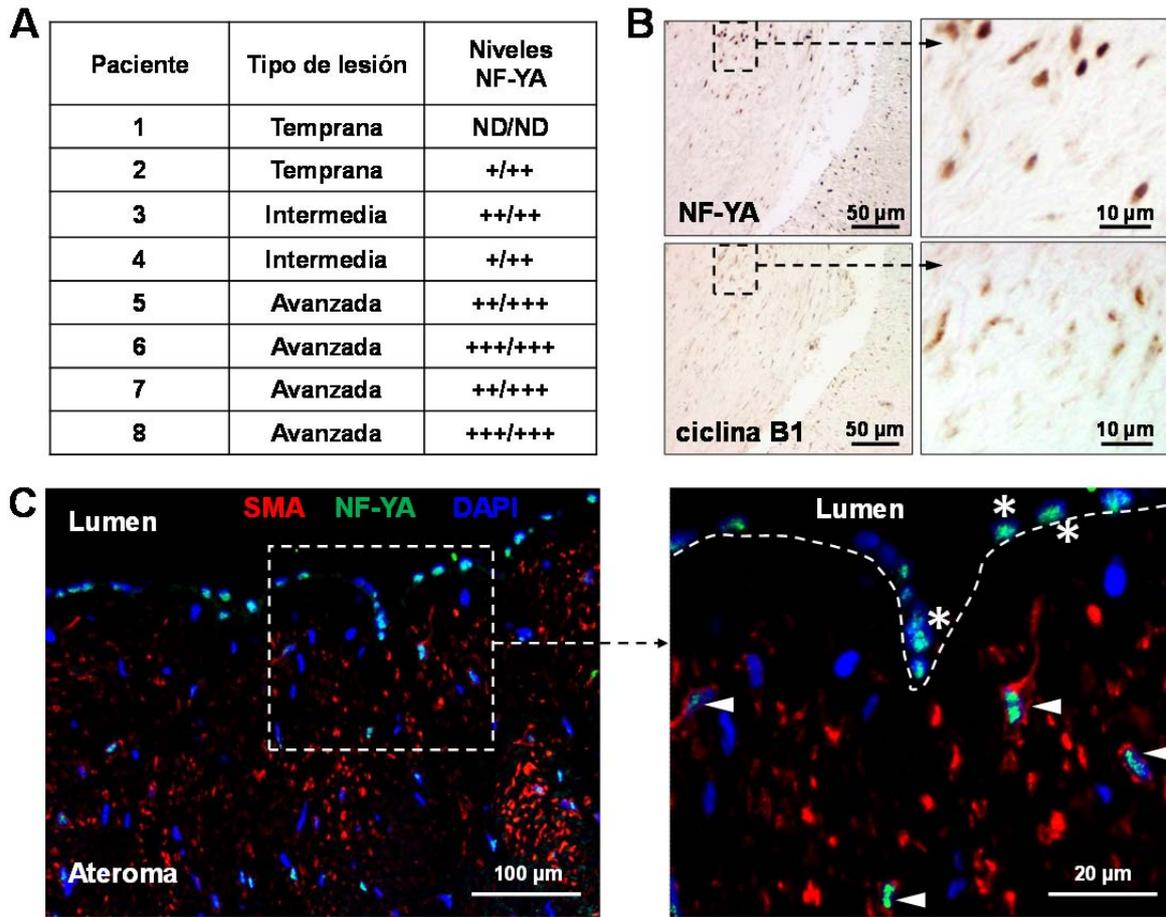
**Figura 20. La expresión de NF-YA y ciclina B1 se induce en aterosclerosis murina. (A)** Análisis inmunohistoquímico de la expresión de NF-YA, ciclina B1 y Ki67 en aorta de ratones salvajes y apoE-KO. Las microfotografías muestran ejemplos representativos del número de ratones indicado. Las flechas negras y blancas representan la lámina elástica interna y externa, respectivamente. En el caso de ratones apoE-KO con dieta aterogénica (ATG), las imágenes de la derecha muestran ampliaciones. **(B, C)** Inmunofluorescencia confocal de la expresión de NF-YA, Mac3 (Macrófagos), SMA (CMLVs) e isolectina B4 (endotelio) de ateroma aórtico de ratones apoE-KO alimentados con dieta ATG. La línea discontinua indica la lámina elástica interna.

**Dieta control  
(10 meses de edad)**



**Figura 21.** La expresión de NF-YA y ciclina B1 se induce en la lesión aterosclerótica inducida espontáneamente en ratones apoE-KO alimentados con dieta control. Análisis inmunohistoquímico de la expresión de NF-YA, ciclina B1 y Ki67 en tejido aórtico. Las microfotografías muestran ejemplos representativos del número de ratones indicado. Las flechas negras representan la lámina elástica interna.

Con el objetivo de estudiar la expresión de NF-YA en ateroma de origen humano, se analizaron muestras de arteria coronaria con o sin aterosclerosis procedentes de pacientes sometidos a transplante de corazón. Estos estudios detectamos diferentes grados de expresión de NF-YA en 7 de 8 muestras analizadas (**Figura 22A**). Además, el análisis de secciones consecutivas mostró regiones con una elevada expresión de las proteínas NF-YA y ciclina B1 (**Figura 22B**). Finalmente, ensayos de doble inmunofluorescencia revelaron la expresión de NF-YA tanto en CMLVs de la íntima como en células localizadas en el borde luminal de la lesión (**Figura 22C**).



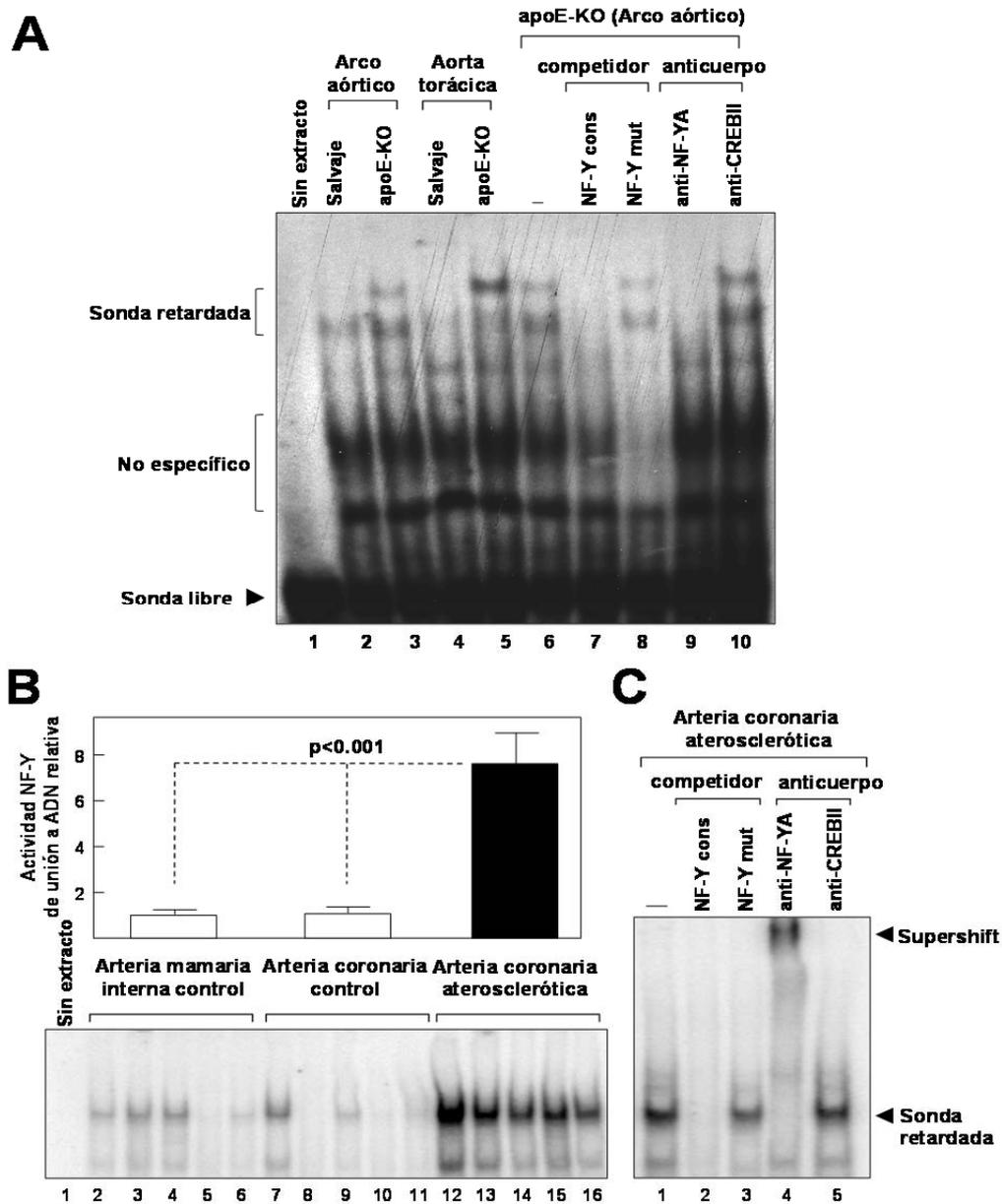
**Figura 22. NF-YA y ciclina B1 se expresan en ateroma coronario humano. (A)** La expresión de NF-YA se analizó mediante inmunohistoquímica en arterias coronarias humanas afectadas por grados variables de aterosclerosis de acuerdo con los criterios establecidos por la *American Heart Association*: temprana (tipo I y II), intermedia (tipo III) y avanzada (tipo IV-VI). El grado de expresión se evaluó por dos observadores independientes (observador 1/observador 2) de acuerdo a una escala semicuantitativa (ND: no detectada; + débil; ++: moderada; +++: alta). **(B)** Microfotografías de secciones consecutivas procedentes de un mismo espécimen mostrando una región con expresión abundante de NF-YA y ciclina B1. **(C)** Análisis mediante inmunofluorescencia confocal para la visualización de SMA (CMLVs), NF-YA y el núcleo (DAPI). Las flechas indican células positivas para NF-YA y SMA. Los asteriscos indican células del borde luminal positivas para NF-YA y negativas para SMA.

Una vez demostrada la expresión de NF-YA en ateroma murino y humano, decidimos analizar su actividad de unión a ADN mediante EMSA. En primer lugar, analizamos arterias sin aterosclerosis, procedentes de animales salvajes, así como con ateroma nativo formado en ratones apoE-KO de 11 meses de edad alimentados con dieta control. El EMSA se llevó a cabo incubando la sonda NF-Y (-

26/-1) con extractos procedentes de una mezcla de 3 arterias separadas en arco aórtico y aorta torácica. Tal y como se muestra en la **Figura 23A**, no se observó actividad NF-Y ni en arco aórtico (**carril 2**) ni en aorta torácica (**carril 4**) de animales salvajes, mientras que se produjo una inducción de la actividad en ambas regiones vasculares de animales apoE-KO con lesión ateromatosa espontánea (**carriles 3 y 5**). Estos complejos núcleo-proteicos retardados fueron competidos eficientemente mediante la incubación con un exceso de oligonucleótido no marcado radiactivamente NF-Y (-26/-1) (**carril 6**), pero no cuando incubamos con cantidades equivalentes de un oligonucleótido con la secuencia de unión de NF-Y mutada (NF-Y mut, **carril 7**). Además, la especificidad del complejo ADN-proteína se demostró al conseguir un “*super-retardo*” de la banda mediante la incubación con un anticuerpo anti-NF-YA (**carril 8**) que no se observó con un anticuerpo control (**carril 9**).

Finalmente, realizamos EMSAs incubando la sonda NF-Y (-26/-1) con extractos de arterias humanas, tanto coronarias con y sin lesión ateromatosa como mamaria interna (utilizada también como control al no desarrollar aterosclerosis). La actividad de NF-Y se indujo fuertemente en arterias coronarias con lesión aterosclerótica (**Figura 23B, carriles 12-16**) mientras que fue muy baja en arterias sin lesión, tanto coronarias (**Figura 23B, carriles 7-11**) como mamaria interna (**Figura 23B, carriles 2-6**). Los complejos núcleo-proteicos que mostraron movilidad electroforética retardada se compitieron eficientemente con un exceso de oligonucleótido no marcado NF-Y (-26/-1) (**Figura 23C, carril 2**), pero no con el oligonucleótido mutante (**Figura 23C, carril 3**). Además, sufrieron un retraso adicional al incubar con el anticuerpo anti-NF-YA (**Figura 23C, carril 4**), pero no con un anticuerpo control (**Figura 23C, carril 5**).

En conjunto, nuestros análisis en modelos animales y muestras humanas demuestran la inducción y activación del factor de transcripción NF-Y durante el proceso de arteriosclerosis nativa, sugiriendo su participación en el desarrollo de la lesión ateromatosa.



**Figura 23. La actividad de unión a ADN del factor de transcripción NF-Y se induce en aterosclerosis murina y humana.** EMSA incubando la sonda radiactiva NF-Y consenso (sonda portadora del sitio de unión a NF-Y en la posición -17/-13 del promotor del gen humano *CCNB1*). Los ensayos de competición fueron llevados a cabo mediante la adición de un exceso de 100 veces de oligonucleótido no marcado radiactivamente NF-Y consenso (NF-Ycons) o NF-Y mutado (NF-Ymut). Los ensayos de *supershift* fueron llevados a cabo mediante la post-incubación con los anticuerpos indicados. **(A)** Análisis de la actividad de unión a ADN en el arco aórtico y aorta torácica de ratones salvajes o apoE-KO de 11 meses de edad (mezcla de 3 arterias por condición). **(B)** Análisis de la actividad de unión a ADN en lisados arteriales de muestras humanas (5 pacientes por condición). La gráfica muestra la intensidad de las bandas formadas por los complejos ADN-proteína retardados respecto a la arteria coronaria control (=1). **(C)** Ensayos de competición y *supershift* en arteria coronaria humana con aterosclerosis.

---

### **El factor de transcripción NF-Y induce la expresión de ciclina B1 y la proliferación celular en CMLVs como efector de la vía de señalización PDGF-BB-ERK1/2-Akt**

El factor de crecimiento PDGF-BB ha sido ampliamente descrita como un potente mitógeno inductor de la proliferación en CMLVs en experimentos *in vitro* y como un factor esencial en el desarrollo de la lesión neoíntima en modelos animales de reestenosis y aterosclerosis (Raines 2004). Con el objetivo de profundizar en los mecanismos de actuación de NF-Y en estas patologías, estudiamos su posible papel como efector de la cascada de actuación de PDGF-BB en cultivos de CMLVs.

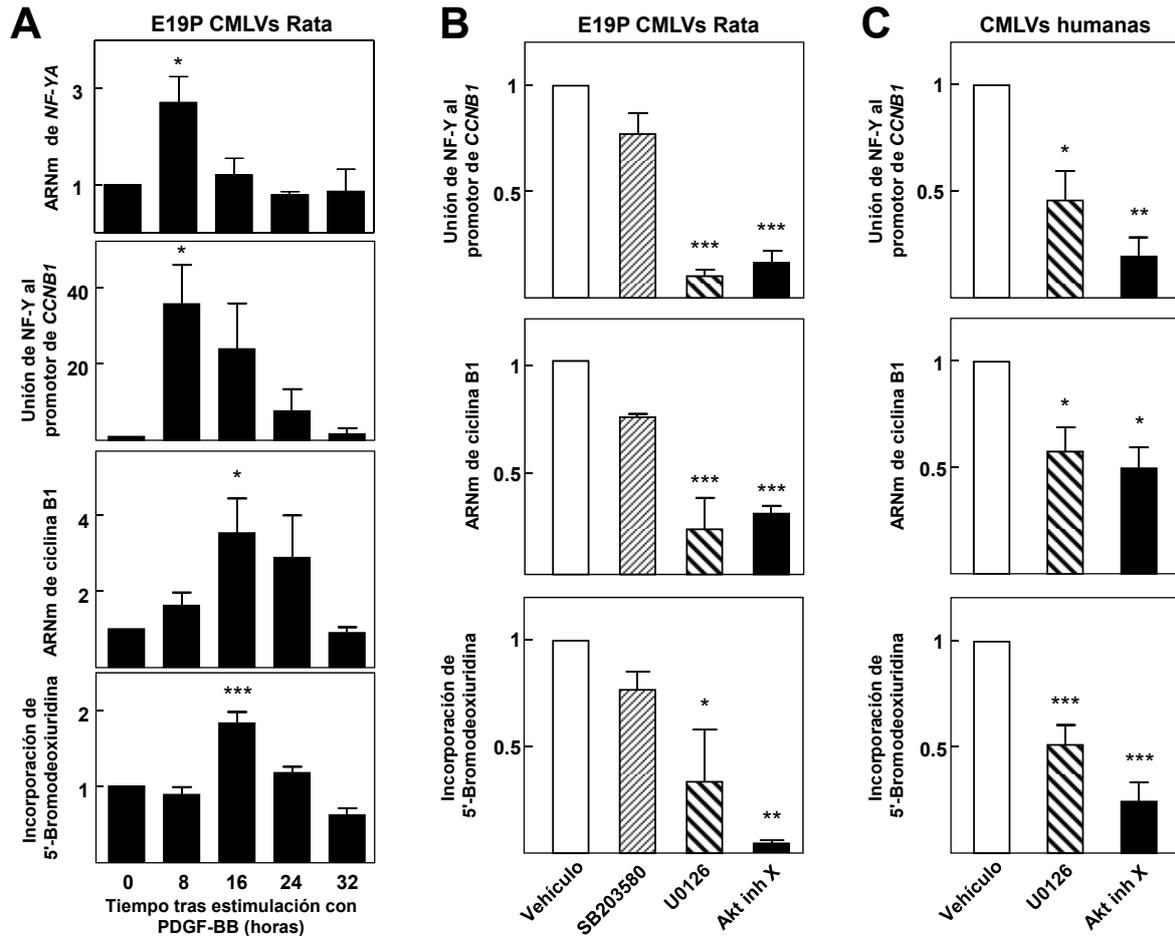
En primer lugar, utilizamos la línea celular E19P de CMLV de rata para estudiar la unión *in vivo* de NF-Y al promotor del gen *CCNB1* mediante la técnica de ChIP. Las células fueron ayunadas mediante depleción de suero y reestimuladas con 10 ng/mL de PDGF-BB durante 8, 16, 24 y 32 horas. Los niveles de ARNm de NF-YA y la unión de NF-Y al promotor de *CCNB1* se indujeron con un pico máximo a las 8 horas tras la reestimulación, mostrando posteriormente una disminución progresiva (**Figura 24A**). Con posterioridad a la unión de NF-Y al promotor de *CCNB1*, observamos un aumento significativo de la expresión de ARNm de *CCNB1*, medida mediante qPCR, y de la proliferación celular, medida por incorporación de BrdU, con un pico máximo a las 16 horas tras la estimulación con PDGF-BB (**Figura 24A**).

Estudios previos han descrito que la proliferación celular en CMLVs inducida por PDGF-BB depende de la activación de las rutas de señalización mediadas por las quinasas ERK1/2 y AKT (Choudhury, Karamitsos et al. 1997; Choudhury, Mahimainathan et al. 2006; Deuse, Koyanagi et al. 2010). Para comprobar si la activación de NF-Y dependiente de PDGF-BB requiere de estas dos rutas de señalización, incubamos las células E19P con inhibidores específicos de ERK1/2 (U0126) y Akt (*Akt inhibitor X*). La incubación con U0126 y *Akt inhibitor X* produjo un bloqueo de la unión *in vivo* de NF-Y al promotor de *CCNB1* a las 8 horas, que se correlacionó con una disminución de la expresión de ARNm de *CCNB1* y de la proliferación celular tras 16 horas de estimulación (**Figura 24B**). Estos efectos no

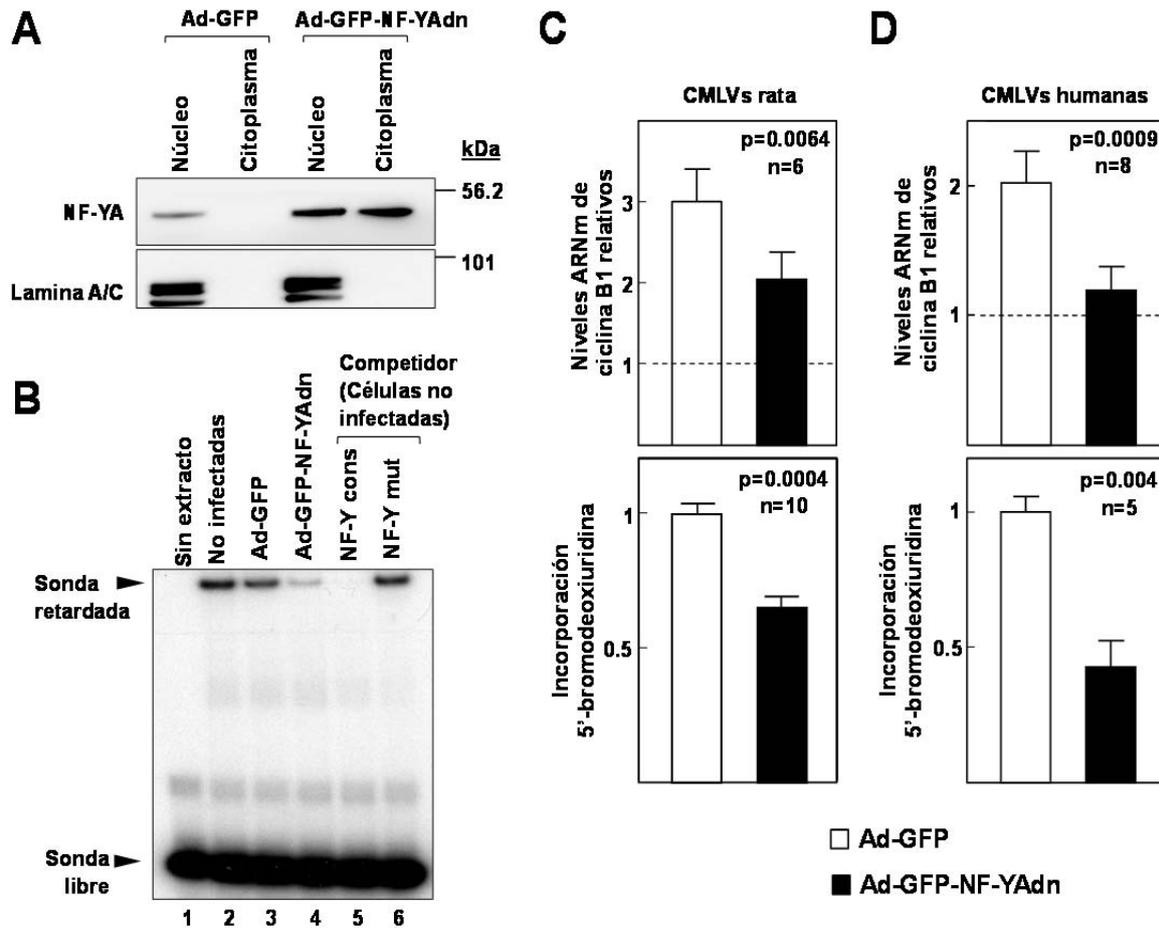
fueron observados al incubar con SB203580, un inhibidor de p38 utilizado como control negativo (**Figura 24B**). Igualmente, la incubación de CMLVs humanas con U0126 y *Akt inhibitor X* redujo significativamente la unión de NF-Y al promotor de *CCNB1*, los niveles de ARNm de *CCNB1* y la proliferación celular (**Figura 24C**), corroborando los resultados obtenidos en células E19P de aorta de rata.

**La inhibición de la actividad de unión a ADN de NF-Y mediante la sobreexpresión del mutante dominante negativo de NF-YA reduce la expresión de la ciclina B1 y la proliferación de CMLVs**

Con el objetivo de investigar si la actividad de NF-Y es esencial en la expresión de la ciclina B1 y la proliferación de las CMLVs inducida por PDGF-BB, llevamos a cabo ensayos de expresión ectópica de NF-YA13m29 (NF-YAdn), un mutante dominante negativo de la subunidad A que se ha demostrado inhibe significativamente la actividad de NF-Y (Mantovani, Li et al. 1994). CMLVs primarias aisladas de aorta de rata fueron infectadas con un vector adenoviral que expresa la proteína GFP (Ad-GFP) o con un vector adenoviral bicistrónico Ad-GFP-NF-YAdn que expresa independientemente GFP y NF-YAdn. En primer lugar, comprobamos mediante Western blot la correcta sobreexpresión del mutante (**Figura 25A**) y realizamos EMSA que demostraron una disminución de la actividad de unión a ADN asociada a NF-Y (**Figura 25B**). Este efecto inhibitor se correlacionó con una reducción significativa de la expresión de ARNm de *CCNB1* y de la proliferación celular (incorporación de BrdU) en cultivos primarios de CMLVs de arteria de rata (**Figura 25C**) y humana (**Figura 25D**).



**Figura 24.** El mitógeno PDGF-BB induce la unión de NF-Y al promotor del gen *CCNB1*, la expresión de *CCNB1* y la proliferación de las CMLVs mediante un mecanismo dependiente de ERK1/2 y Akt. Células E19P de rata (A,B) y CMLVs primarias humanas (C) ayunadas por depleción de suero fueron estimuladas con PDGF-BB para estudiar la actividad de unión de NF-Y al promotor del gen *CCNB1* mediante ChIP, la expresión de ARNm de NF-YA y ciclina B1 mediante qPCR y proliferación celular mediante incorporación de BrdU (n=3-4). Todos los resultados se expresan relativizados a las células no estimuladas (=1). (A) Análisis a los tiempos indicados tras la adición de PDGF-BB. (B) Las células fueron cultivadas con o sin SB203580 (inhibidor de la vía p38 MAPK), U0126 (inhibidor de la activación de ERK1/2) y Akt inhibitor X (inhibidor de la activación de Akt). Se añadió el PDGF-BB y las células fueron recogidas tras 8 horas (ChIP) y 16 horas (qPCR e incorporación de BrdU). (C) Las células fueron cultivadas con o sin U0126 o Akt inhibitor X. Se añadió el PDGF-BB y las células fueron recogidas tras 12 horas (ChIP) y 24 horas (qPCR e incorporación de BrdU). \*: p<0.05, \*\*: p<0.01, \*\*\*: p<0.001, respecto al control con vehículo.

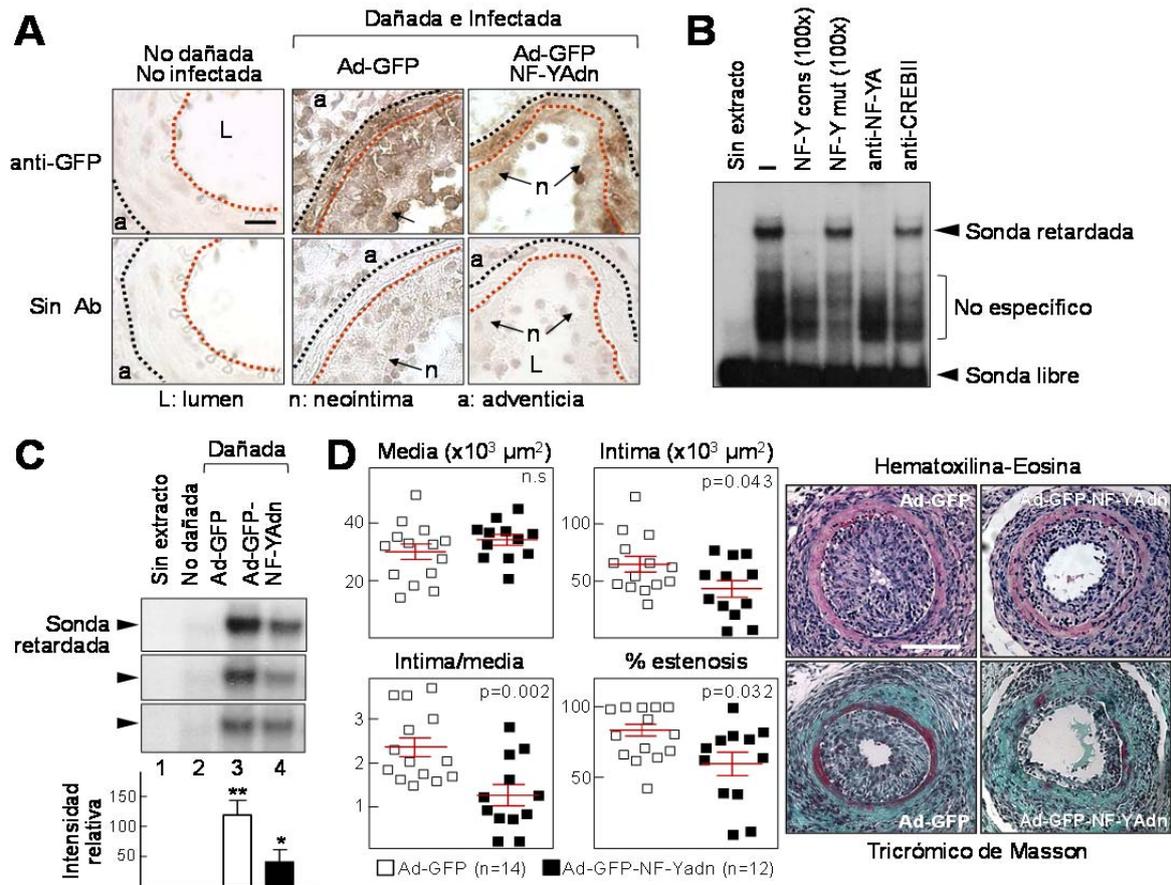


**Figura 25. La inactivación del factor de transcripción NF-Y en CMLVs reduce la expresión de ARNm de *CCNB1* y la proliferación celular.** CMLVs primarias de rata (**A**, **B**, **C**) y humanas (**D**) fueron infectadas con los adenovirus Ad-GFP (codifica para la proteína GFP) o Ad-GFP-NF-YAdn (vector bicistrónico que codifica para la síntesis independiente de GFP y del mutante dominante negativo NF-YA13m29). (**A**) Western Blot mostrando la expresión nuclear y citoplasmática de NF-YA. La proteína nuclear lamina A/C fue utilizada como control de la pureza del fraccionamiento núcleo-citoplasma. (**B**) EMSA incubando extractos nucleares y la sonda NF-Y consenso marcada radiactivamente (NF-Y cons). Ensayos de competición incubando un exceso de 50 veces de los oligonucleótidos no marcados radiactivamente indicados. (**C**) Células ayunadas mediante depleción de suero fueron infectadas y posteriormente estimuladas mediante la adición de 20% FBS. Los niveles de ARNm de ciclina B1 (qPCR) y proliferación celular (Incorporación de 5'-bromodeoxiuridina) fueron analizados 16 y 24 horas después de la estimulación, respectivamente. (**D**) Células ayunadas mediante depleción por suero fueron infectadas y posteriormente estimuladas con PDGF-BB. Los niveles de ARNm de ciclina B1 (qPCR) y proliferación celular (Incorporación de BrdU) fueron analizados 24 horas después de la estimulación. Los resultados de qPCR se representan relativos a las células no estimuladas (=1, línea discontinua). El porcentaje de células inmunoreactivas para BrdU se determinó en células GFP positivas. Los resultados se muestran relativos a Ad-GFP (=1).

---

### **La inhibición de la actividad NF-Y mediante transducción adenoviral de NF-YAdn reduce la formación de lesión neoíntima en un modelo de daño endoluminal de la arteria femoral común en ratón**

Con el objetivo de estudiar el papel de NF-Y en el desarrollo de la lesión neoíntima inducida por daño mecánico, llevamos a cabo un estudio de terapia génica en el modelo de daño endoluminal de la arteria femoral común de ratón. Inmediatamente tras infligir el daño mecánico, se procedió a la liberación local e intraluminal de los vectores adenovirales Ad-GFP (control) y Ad-GFP-NF-YAdn, los cuales se incubaron durante un periodo de 20 minutos. Los animales fueron sacrificados 9 días tras la intervención y las arterias se extrajeron para realizar diversos estudios. La correcta infección de las arterias se determinó por la presencia de células positivas para la proteína GFP en las arterias infectadas, que no se observaron en las arterias control (no dañadas y no infectadas) (**Figura 26A**). Para determinar el efecto del mutante dominante negativo NF-YAdn sobre la actividad de unión al ADN, se realizaron EMSAs incubando lisados de arterias infectadas con Ad-GFP y una sonda portadora de la secuencia de unión a NF-Y localizada en la posición -17/-13 del promotor del gen *CCNB1* (NF-Ycons). Observamos un complejo núcleo-proteico retardado que fue eliminado al incubarse con un exceso de sonda NF-Y consenso no marcada radiactivamente o un anticuerpo anti-NF-YA, pero no cuando se incubó con un exceso de sonda NF-Y mutante (NF-Ymut) o con un anticuerpo control (anti-CREBII) (**figura 26B**). En concordancia con los resultados obtenidos en el modelo de angioplastia con balón en la arteria carótida de rata (**Figura 18D**), la actividad de unión a ADN de NF-Y fue indetectable en la arteria femoral de ratón no dañada y aumentó significativamente tras el daño mecánico (**Figura 26C, carril 2** respecto a **carril 3**). Cabe destacar que la sobreexpresión del mutante dominante negativo NF-YAdn redujo significativamente la actividad de unión a ADN (**Figura 26C, carril 3** respecto a **carril 4**) y disminuyó el desarrollo de la lesión neoíntima, como demuestra una menor relación íntima/media y porcentaje de estenosis, sin afectar al área de la media (**Figura 26D**).



**Figura 26. La inhibición de la actividad NF-κ mediante transducción adenoviral de NF-κAdn reduce la formación de lesión neointima en un modelo de daño endoluminal de la arteria femoral común en ratón.** Todos los estudios fueron realizados con tejido obtenido 9 días tras el daño mecánico de la arteria femoral común. **(A)** Imágenes representativas del análisis de la expresión de GFP en secciones de arteria femoral. La túnica media se delimita mediante líneas discontinuas (rojo: lámina elástica interna; negro: lámina elástica externa). Sin Ab: control negativo sin incubación con anticuerpo primario. Barra: 20  $\mu m$ . **(B)** EMSA incubando la sonda radioactiva NF-κ consenso (NF-κ cons) y extractos proteicos de arterias femorales infectadas con Ad-GFP (mezcla de 14 arterias). Para los ensayos de competencia (carriles 3 y 4), se utilizó un exceso de 100 veces de oligonucleótidos no marcados. Para los estudios de “super-retardo” (carriles 5 y 6) se emplearon los anticuerpos indicados. **(C)** Autoradiografía representativa de 7 EMSAs independientes incubando la sonda radioactiva NF-κ consenso y extractos proteicos de arterias no dañadas y no infectadas (carril 2) o arterias dañadas e infectadas con Ad-GFP (carril 3) o Ad-GFP-NF-κAdn (carril 4) (mezcla de 4, 14 y 12 arterias, respectivamente). Sólo se muestran los complejos núcleo-proteicos retardados. La gráfica muestra la cuantificación de las intensidades de los complejos núcleo-proteicos retardados procedente de la media de 7 EMSAs independientes (relativo a la condición no dañada=1). ). \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.001$ , respecto a la arteria no dañada/no infectada. **(D)** Cuantificación del área de la media e íntima, relación íntima/media y porcentaje de estenosis en arterias infectadas con Ad-GFP o Ad-GFP-NF-κAdn. n.s: no significativo ( $p=0.231$ ). Se muestran imágenes representativas de secciones de arteria femoral teñidas con hematoxilina-eosina o tricrómico de Masson. Barra: 100  $\mu m$ .

## DISCUSIÓN

La ciclina B1 es una proteína esencial en la progresión del ciclo celular cuya disrupción genética en el ratón es letal durante el desarrollo embrionario y la desregulación de su expresión se asocia con numerosos desórdenes patológicos (Egloff, Vella et al. 2006; Santamaria and Ortega 2006). En condiciones fisiológicas, la expresión de la ciclina B1 se encuentra fuertemente controlada para asegurar la correcta acumulación únicamente durante la fase G2/M del ciclo celular y su posterior degradación para permitir la separación de las cromátidas durante la división celular (Porter and Donoghue 2003). Niveles anormalmente elevados de ciclina B1 como consecuencia de una transcripción génica desregulada se asocian con una proliferación celular excesiva en diversos cánceres humanos (Egloff, Vella et al. 2006). En el contexto de la enfermedad cardiovascular, se ha demostrado que su expresión tras daño mecánico en un modelo de angioplastia con balón en la arteria carótida de rata (Braun-Dullaues, Mann et al. 2001). Además, en este mismo modelo experimental, la inhibición de la ciclina B1 mediante la liberación local de oligonucleótidos antisentido reduce la hiperplasia de la íntima (Morishita, Gibbons et al. 1994). Pese a la importancia de la ciclina B1 en el desarrollo de la lesión neoíntima, los mecanismos que provocan su inducción no han sido descritos previamente. Nosotros hipotetizamos que la inducción y activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, a través de la expresión de la ciclina B1, es importante en el desarrollo de la hiperplasia de la íntima tras daño mecánico. Mediante estudios de inmunohistología en un modelo de angioplastia en la arteria carótida de rata, demostramos que existe una expresión coordinada en el tiempo y en el espacio de la subunidad NF- $\kappa$ B y de la ciclina B1 en la lesión neoíntima, donde existe una actividad proliferativa importante. En este mismo modelo, la inducción de la expresión de NF- $\kappa$ B en la lesión neoíntima se correlaciona con un aumento de su unión a una de las cajas CCAAT en el promotor del gen *CCNB1*. Por otro lado, comparado con arterias no arterioscleróticas, las lesiones ateroscleróticas de ratones apoE-KO mostraron una inducción de la expresión de NF- $\kappa$ B, ciclina B1 y el marcador de proliferación Ki67 que se correlaciona con un importante aumento de la actividad de unión de NF- $\kappa$ B a la secuencia NF- $\kappa$ B en el promotor *CCNB1*. Además,

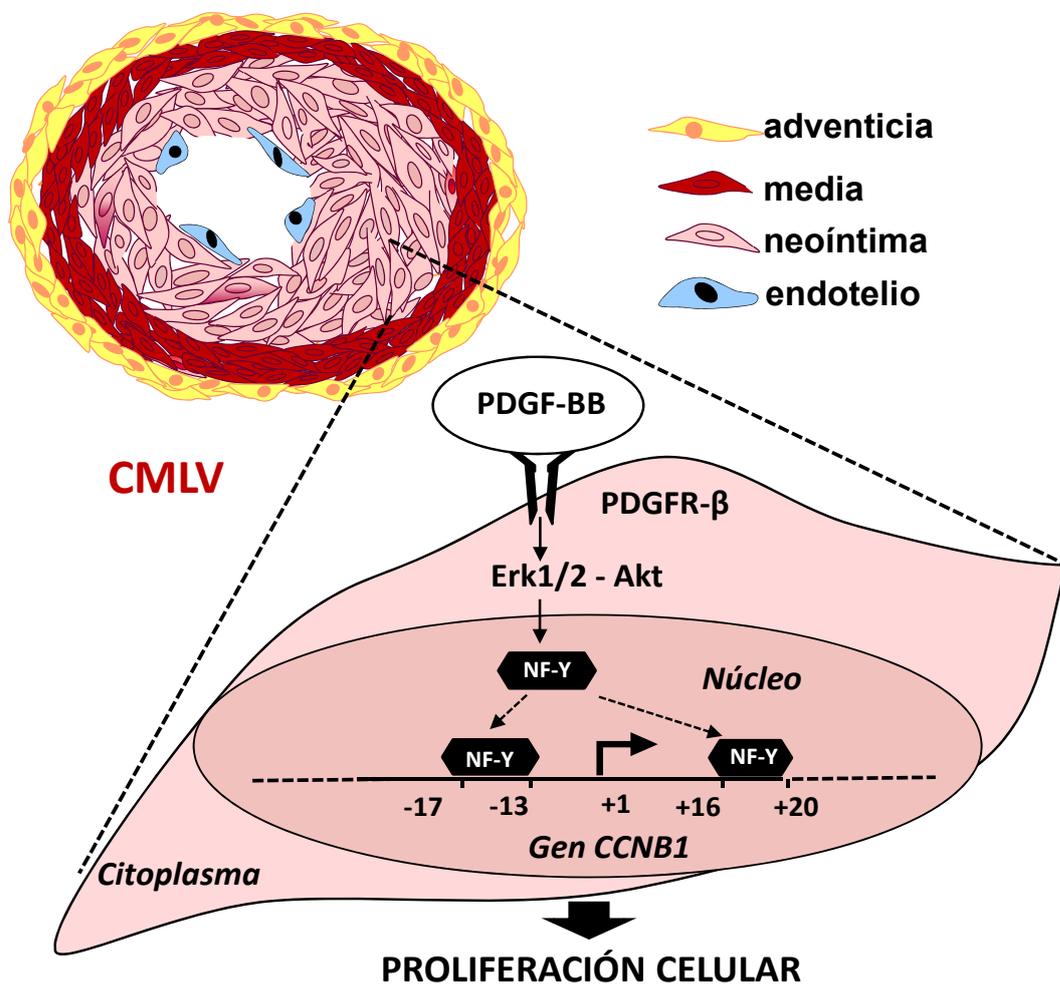
nuestros análisis de lesiones vasculares humanas demostraron la expresión de NF-YA y ciclina B1 y una mayor actividad de unión a su secuencia diana en el promotor *CCNB1* en arterias coronarias ateroscleróticas comparado con arterias coronarias control. En conjunto, estos resultados sugieren que NF-Y puede contribuir a la expresión de ciclina B1 en CMLVs de la neointima, aumentando su actividad proliferativa y con ello el desarrollo de la lesión vascular obstructiva

Nuestros estudios han demostrado la expresión de NF-YA en CMLVs, células endoteliales y macrófagos de lesiones arterioscleróticas. Por lo tanto, además de promover la proliferación de las CMLVs, NF-Y puede participar en la regulación de otros procesos en células endoteliales o macrófagos de la lesión neointima, como la inflamación vascular o el metabolismo lipídico. En este sentido, existen evidencias previas de la implicación de NF-Y en la regulación de diferentes genes implicados en la diferenciación mieloide (Sjin, Krishnaraju et al. 2002), así como genes relacionados con la respuesta inmune adaptativa mediada por macrófagos o células endoteliales, como el complejo mayor de histocompatibilidad tipo II (Grimm, Spiecker et al. 2002) o el receptor C5a del sistema de complemento (Hunt, Martin et al. 2005). Por tanto, sería de interés investigar el papel de NF-Y en aspectos clave de la célula mieloide durante el desarrollo de la enfermedad cardiovascular, como la producción de citoquinas, la actividad fagocítica o la captación de lipoproteínas de baja densidad, así como el papel en la células endoteliales, por ejemplo en el reclutamiento de leucocitos en el área de inflamación.

En concordancia con estudios previos que demuestran la importancia de NF-Y en la regulación de la expresión de la ciclina B1 y la proliferación celular en fibroblastos y células tumorales (Hu and Maity 2000; Gurtner, Manni et al. 2003; Hu, Lu et al. 2006; Kotecha, Kluza et al. 2008), nuestros resultados demuestran que la inhibición de la actividad de unión a ADN de NF-Y en CMLVs de rata y humanas mediante el uso de un mutante dominante negativo de la subunidad NF-YA reduce la proliferación celular y la expresión de la ciclina B1. Además, la administración intraluminal de adenovirus que expresan este mutante dominante negativo inhibe la actividad de unión a ADN de NF-Y en la pared arterial dañada y atenúa la formación de la neointima en el modelo de daño mecánico en la arteria femoral común en ratón.

Numerosos estudios en distintos modelos animales han demostrado la importancia de la cascada de señalización dependiente del mitógeno PDGF-BB en el desarrollo de la hiperplasia de la íntima tras daño mecánico (Morishita, Gibbons et al. 1994). Además, tanto el mitógeno (PDGF-BB) como su receptor (PDGFR- $\beta$ ) se sobreexpresan en lesiones ateroscleróticas y reestenóticas en modelos animales y en muestras humanas (Raines 2004). Por otra parte, se ha demostrado que las quinasas Erk1/2 y Akt son efectores esenciales de PDGF-BB en la activación de la proliferación de CMLVs *in vitro* (Choudhury, Karamitsos et al. 1997; Choudhury, Mahimainathan et al. 2006; Deuse, Koyanagi et al. 2010), y en el desarrollo de la lesión neoíntima tras daño vascular *in vivo* (Yonemitsu, Kaneda et al. 1998; Muslin 2008). Nuestros resultados de inmunoprecipitación de cromatina demuestran que PDGF-BB induce primero el reclutamiento de NF-Y al promotor de la ciclina B1 en CMLVs de rata y humanas, aumentando a continuación la expresión de ciclina B1 y la proliferación celular. El tratamiento con inhibidores de la vía Erk1/2 y Akt, pero no de p38, y la inhibición de la actividad de unión a ADN de NF-Y bloquean la expresión de ciclina B1 y la proliferación celular dependiente de PDGF-BB. En conjunto, nuestros resultados identifican a NF-Y como un importante mediador de la cascada de señalización PDGF-BB-Erk1/2-Akt que contribuye al engrosamiento de la neoíntima al menos en parte induciendo la expresión de la ciclina B1 y la proliferación de CMLVs (**Figura 27**). Por tanto, la aplicación de terapias dirigidas al bloqueo local de la expresión de NF-Y puede suponer una estrategia más específica y segura que la inhibición de los efectores Erk1/2 y AKT, los cuales controlan múltiples procesos fisiológicos esenciales en el mantenimiento de la homeostasis celular (como por ejemplo, diferenciación celular, motilidad, apoptosis, autofagia, angiogénesis, metabolismo y síntesis proteica) (Mattmann, Stoops et al. 2011; Mendoza, Er et al. 2011). En este sentido, el conjugado pirrolobenzodiazepina-poliámida GWL-78 es capaz de bloquear la unión de NF-Y a diversas secuencias CCAAT en diferentes promotores génicos implicados en la progresión del ciclo celular, inhibiendo la proliferación celular de fibroblastos NIH-3T3 en experimentos *in vitro* (Kotecha, Kluza et al. 2008). Estudios pre-clínicos en modelos animales grandes pueden ser importantes en la investigación de la eficacia de GWL-78 en la prevención de la lesión neoíntima en el contexto de la reestenosis tras implantación de *stent* y aterosclerosis nativa, así como en otras enfermedades con remodelado

vascular que transcurre también con proliferación excesiva de CMLVs (ej. aterosclerosis asociada a transplante, hipertensión pulmonar).



**Figura 27. Papel propuesto de NF-κB en el desarrollo de la hiperplasia de la neointima.** NF-κB se induce en lesiones reestenóticas y ateroscleróticas murinas y humanas y contribuye a la expresión de la ciclina B1 y la proliferación de las CMLVs como un efector de la vía PDGF-BB-ERK1/2-Akt.

## **DISCUSIÓN GENERAL**



La importancia de la proliferación celular excesiva en la enfermedad reestenótica se ha puesto de manifiesto en numerosos estudios en modelos animales (Fuster, Fernandez et al. 2010), pero también por la demostrada eficacia terapéutica de los SL-FAs en la cardiología intervencionista (Garg and Serruys 2010; Wessely 2010). Efectivamente, la introducción de estos *stents* que liberan localmente fármacos anti-proliferativos ha supuesto una revolución médica al reducir significativamente la incidencia de la ISR tras implantación de *stent*. Sin embargo, el uso de los SL-FAs se ha asociado con diversos problemas de tipo económico-sanitario como por ejemplo su elevado coste (2-3 más que el de los *stents* convencionales) y el aumento del riesgo de sufrir trombosis tardía asociada a una elevada tasa de mortalidad (Kirtane and Stone 2011). Teniendo en cuenta la falta de marcadores de ISR, la identificación de biomarcadores puede suponer una importante ayuda en la estratificación de los pacientes en base al riesgo de sufrir la enfermedad y con ello, en la toma de decisiones médicas. Así, el correcto pronóstico del riesgo de sufrir reestenosis antes de realizar la angioplastia permitiría decidir el tratamiento más adecuado que el paciente debe recibir, tanto desde el punto de vista médico como económico. Por ejemplo la implantación de SL-FAs podría prescribirse solo a aquellos pacientes de mayor riesgo, y los *stents* convencionales podrían utilizarse en los de menor riesgo, evitando de esta manera los problemas secundarios asociados a los SL-FAs y abaratando costes.

Nuestros estudios de asociación genética y posterior validación funcional nos han permitido identificar polimorfismos genéticos en genes reguladores del ciclo celular que se asocian con el riesgo a sufrir ISR tras implantación de *stent* convencional y cuyo mecanismo puede depender de la regulación polimórfica del reclutamiento de factores de transcripción, afectando, en último término, a la expresión del gen. En base a nuestros resultados, sugerimos que una mayor expresión de ciclina B1 en individuos portadores de las variantes alélicas -957T, -475C y +102G debido al mayor reclutamiento de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, AP-1 y SP1, puede aumentar la respuesta proliferativa en la pared arterial dañada y contribuir así al mayor riesgo de sufrir ISR observado en estos pacientes. Además, identificamos otros 3 polimorfismos, rs875459 (+7010[G/T]) (localizado en el gen *CCNB1*), rs2282411 (+7733[T/C], localizado en el gen *CCNA1*, que codifica para la proteína ciclina A1) y el polimorfismo rs733590 (-1284[T/C]), localizado en el gen

*CDKN1A*, que codifica para la proteína p21<sup>Cip1</sup>) asociados un mayor riesgo de ISR y que requieren de nuevos estudios funcionales que expliquen estas asociaciones.

Una de las limitaciones más importantes de los estudios de asociación genética en enfermedades complejas basada en la identificación de SNPs son los tamaños muestrales de las cohortes analizadas. La frecuencia poblacional de estos polimorfismos es alta, respecto a polimorfismos raros, lo que hace que sea necesario tamaños muestrales altos para obtener resultados estadísticamente significativos (Gibson 2011). La importancia del tamaño muestral se incrementa dependiendo del número de polimorfismos analizados, pues a mayor número se requiere un tamaño mayor de la cohorte en estudio, con el objetivo de evitar posibles falsos positivos que aparecen resultado del azar asociado a estos análisis estadísticos (Hardy and Singleton 2009; Gibson 2011). Tras el estudio piloto en la cohorte Mediterránea, nuestra validación en una población independiente y de mayor tamaño muestral, así como nuestros estudios funcionales, refuerzan fuertemente la importancia de los SNPs rs350099, rs350104 y rs164390 localizados en la zona 5' reguladora del gen *CCNB1* como potenciales biomarcadores genéticos del riesgo de sufrir ISR tras implantación de *stent*. En este sentido, la importancia de una validación funcional de los polimorfismos detectados es un factor importante para la correcta correlación entre genotipo y fenotipo cuando se estudian variantes génicas de baja penetrancia como son los polimorfismos comunes (Hunt, Martin et al. 2005).

Por otro lado, la importancia de los polimorfismos comunes, respecto a los polimorfismos raros, en la susceptibilidad a sufrir enfermedades complejas, se basa en el efecto aditivo de múltiples polimorfismos con efectos moderados (Gibson 2011). Nuestros estudios genéticos y funcionales basados en la identificación de haplotipos portadores de los polimorfismos rs350099, rs350104 y rs164390 sugieren un efecto aditivo de los alelos -957T, -475C y +102G que puede explicar la susceptibilidad individual a sufrir reestenosis mediante la inducción de la expresión de la ciclina B1, tal y como demostramos en nuestros estudios funcionales en linfocitos aislados de sangre periférica de individuos sanos.

El papel del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en el contexto de la enfermedad cardiovascular no había sido previamente descrito. Sin embargo, nuestro laboratorio

y otros habían demostrado previamente la importancia de los factores de la familia AP-1 (Hu, Cheng et al. 1997; Sylvester, Chen et al. 1998; Ahn, Morishita et al. 2002; Murrell, Khachigian et al. 2007) y SP1 (Andres, Urena et al. 2001; Wierstra 2008) en el desarrollo de la lesión neoíntima en modelos animales de hiperplasia de la íntima tras daño mecánico. En esta tesis doctoral hemos demostrado que NF- $\kappa$ B se haya fuertemente inducido y activado en arterias afectadas por lesiones neoíntimas, tanto inducidas por daño mecánico como arterioscleróticas, en modelos animales y muestras humanas. Además identificamos a NF- $\kappa$ B como un efector de la vía de señalización PDGF-BB-Erk1/2-Akt, esencial en la proliferación de las CMLVs y el desarrollo de la lesión neoíntima *in vivo* (Raines 2004). La importancia de NF- $\kappa$ B como regulador de la proliferación celular en el contexto de la enfermedad cardiovascular se ve remarcada por nuestros estudios en CMLVs de rata y humanas, pues el bloqueo de su actividad de unión a ADN inhibe la inducción de la ciclina B1 y la proliferación celular. Estos resultados se ven apoyados por ensayos de terapia génica en un modelo de daño en arteria femoral de ratón, de modo que la administración de un mutante dominante negativo de NF- $\kappa$ B inhibe la actividad de NF- $\kappa$ B y reduce la formación de la lesión neoíntima.

En resumen, hemos identificado a NF- $\kappa$ B como un regulador positivo de la expresión de la ciclina B1, de la proliferación celular de las CMLVs y del desarrollo de la lesión neoíntima. En este sentido, hemos detectado la sobreexpresión y activación de NF- $\kappa$ B en lesiones reestenóticas y ateroscleróticas, tanto en modelos animales como en muestras humanas. Además, hemos identificado variantes polimórficas de los SNPs rs350099 (-975T/C), rs350104 (-475 T/C) y rs164390 (+102G/T) localizados en la región promotora del gen *CCNB1* humano asociados a un mayor riesgo de sufrir ISR tras implantación de *stent* coronario que generan sitios de unión para los factores de transcripción NF- $\kappa$ B, AP-1 y SP1, respectivamente. De hecho, el haplotipo portador de las variantes alélicas de mayor riesgo de estos polimorfismos se asocia con niveles aumentados de ARNm de *CCNB1* en linfocitos T circulantes y con una mayor susceptibilidad a desarrollar ISR post-*stent*. Por lo tanto, nuestros estudios sugieren que pacientes portadores del genotipo -957TT/-475CC/+102GG presentan un reclutamiento aumentado de las proteínas NF- $\kappa$ B, AP-1 y SP1 que puede contribuir al mayor riesgo de sufrir ISR tras implantación de *stent*

como resultado de un aumento de los niveles de ciclina B1 y de la proliferación de las CMLVs.

Investigaciones futuras pueden ser importantes para determinar el potencial terapéutico del uso de estrategias inhibitorias de NF- $\kappa$ B para la prevención del engrosamiento de la neoíntima. Además, nuestros estudios constituyen la prueba de que el genotipado de SNPs localizados en genes reguladores del ciclo celular puede convertirse en una herramienta diagnóstica para la predicción del riesgo de sufrir ISR tras implantación de *stent*. Sin embargo, validaciones adicionales en cohortes independientes y de mayor tamaño son necesarias previo a su posible aplicación clínica.

## **CONCLUSIONES**



1. Los polimorfismos de base única rs350099 (-957C/T), rs350104 (-475C/T), rs164390 (+102G/C) y rs875459 (+7010[G/T]) (localizados en el gen *CCNB1*, proteína ciclina B1), rs2282411 (+7733[T/C]) (localizado en el gen *CCNA1*, proteína ciclina A1) y rs733590 (-1284[T/C]) (localizado en el gen *CDKN1A*, proteína p21<sup>Cip1</sup>) se asocian con un riesgo aumentado de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario.
2. Las variantes alélicas de los polimorfismos de base única rs350099, rs350104 y rs164390 localizados en la región promotora del gen *CCNB1* que se asocian a un mayor riesgo de sufrir reestenosis generan sitios funcionales de unión a ADN para los factores de transcripción NF-Y, AP-1 y SP1, respectivamente.
3. Los pacientes portadores del haplotipo -957TT/-475CC/+102GG, homocigotos para las variantes alélicas de los polimorfismos de base única rs350099, rs350104 y rs164390 asociadas a riesgo aumentado de reestenosis, muestran mayor expresión del ARNm de ciclina B1 en linfocitos T circulantes y un riesgo aumentado de sufrir reestenosis tras implantación de *stent* coronario.
4. El factor de transcripción NF-Y se induce y se activa durante el desarrollo de la lesión neoíntima inducida por daño mecánico y de la lesión aterosclerótica nativa en modelos animales y arterias humanas.
5. NF-Y es un efector de la vía mitogénica PDGF-BB-ERK1/2-Akt que induce la expresión de la ciclina B1 y la proliferación de las CMLVs.
6. La inhibición de la actividad NF-Y mediante transducción adenoviral de un mutante dominante negativo de NF-YA reduce *in vitro* la expresión de ciclina B1 y la proliferación de CMLVs de rata y humanas, así como formación de lesión neoíntima *in vivo* en un modelo de daño endoluminal de la arteria femoral común de ratón.



## **BIBLIOGRAFÍA**



- Aalbers, A. M., S. Kajigaya, et al. (2012). "Human telomere disease due to disruption of the CCAAT box of the TERC promoter." *Blood* **119**(13): 3060-3063.
- Abdullah, K. G. (2010). "Phenotypes, genotypes, and the 9p21 locus for prediction of cardiovascular events." *JACC Cardiovasc Interv* **3**(2): 260; author reply 260-261.
- Abe, J., W. Zhou, et al. (1994). "Suppression of neointimal smooth muscle cell accumulation in vivo by antisense cdc2 and cdk2 oligonucleotides in rat carotid artery." *Biochem Biophys Res Commun* **198**(1): 16-24.
- Abel, D., O. Abdul-Hamid, et al. (2012). "Transcription factor STOX1A promotes mitotic entry by binding to the CCNB1 promoter." *PLoS One* **7**(1): e29769.
- Abizaid, A., R. Kornowski, et al. (1998). "The influence of diabetes mellitus on acute and late clinical outcomes following coronary stent implantation." *J Am Coll Cardiol* **32**(3): 584-589.
- Adachi, N., M. Nomoto, et al. (2000). "Cell-cycle regulation of the DNA topoisomerase IIalpha promoter is mediated by proximal CCAAT boxes: possible involvement of acetylation." *Gene* **245**(1): 49-57.
- Agema, W. R., J. W. Jukema, et al. (2001). "Genetic aspects of restenosis after percutaneous coronary interventions: towards more tailored therapy." *Eur Heart J* **22**(22): 2058-2074.
- Agema, W. R., P. S. Monraats, et al. (2004). "Current PTCA practice and clinical outcomes in The Netherlands: the real world in the pre-drug-eluting stent era." *Eur Heart J* **25**(13): 1163-1170.
- Ahn, J. D., R. Morishita, et al. (2002). "Inhibitory effects of novel AP-1 decoy oligodeoxynucleotides on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation in vivo." *Circ Res* **90**(12): 1325-1332.
- Alabert, C., L. Rogers, et al. (2006). "Cell type-dependent control of NF- $\kappa$ B activity by TGF- $\beta$ ." *Oncogene* **25**(24): 3387-3396.
- Allavena, P., M. Signorelli, et al. (2005). "Anti-inflammatory properties of the novel antitumor agent yondelis (trabectedin): inhibition of macrophage differentiation and cytokine production." *Cancer Res* **65**(7): 2964-2971.
- Andrae, J., R. Gallini, et al. (2008). "Role of platelet-derived growth factors in physiology and medicine." *Genes Dev* **22**(10): 1276-1312.
- Andres, V. (2004). "Control of vascular cell proliferation and migration by cyclin-dependent kinase signalling: new perspectives and therapeutic potential." *Cardiovasc Res* **63**(1): 11-21.
- Andres, V. and C. Castro (2003). "Antiproliferative strategies for the treatment of vascular proliferative disease." *Curr Vasc Pharmacol* **1**(1): 85-98.
- Andres, V., J. Urena, et al. (2001). "Role of Sp1 in the induction of p27 gene expression in vascular smooth muscle cells in vitro and after balloon angioplasty." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**(3): 342-347.
- Androic, I., A. Kramer, et al. (2008). "Targeting cyclin B1 inhibits proliferation and sensitizes breast cancer cells to taxol." *BMC Cancer* **8**: 391.
- Angiolillo, D. J., A. Fernandez-Ortiz, et al. (2005). "Lack of association between the P2Y12 receptor gene polymorphism and platelet response to clopidogrel in patients with coronary artery disease." *Thromb Res* **116**(6): 491-497.
- Aoki, M., R. Morishita, et al. (1999). "Inhibition of the p53 tumor suppressor gene results in growth of human aortic vascular smooth muscle cells.

- Potential role of p53 in regulation of vascular smooth muscle cell growth." Hypertension **34**(2): 192-200.
- Archer, S. Y., J. Johnson, et al. (2005). "The histone deacetylase inhibitor butyrate downregulates cyclin B1 gene expression via a p21/WAF-1-dependent mechanism in human colon cancer cells." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **289**(4): G696-703.
- Arents, G. and E. N. Moudrianakis (1995). "The histone fold: a ubiquitous architectural motif utilized in DNA compaction and protein dimerization." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(24): 11170-11174.
- Ari, H., S. Ari, et al. (2010). "A novel predictor of restenosis and adverse cardiac events: asymmetric dimethylarginine." Heart Vessels **25**(1): 19-26.
- Aronson, D., Z. Bloomgarden, et al. (1996). "Potential mechanisms promoting restenosis in diabetic patients." J Am Coll Cardiol **27**(3): 528-535.
- Aronson, D. and E. R. Edelman (2010). "Revascularization for coronary artery disease in diabetes mellitus: angioplasty, stents and coronary artery bypass grafting." Rev Endocr Metab Disord **11**(1): 75-86.
- Asselbergs, F. W., S. M. Williams, et al. (2006). "The gender-specific role of polymorphisms from the fibrinolytic, renin-angiotensin, and bradykinin systems in determining plasma t-PA and PAI-1 levels." Thromb Haemost **96**(4): 471-477.
- Baim, D. S. and E. J. Ignatius (1988). "Use of percutaneous transluminal coronary angioplasty: results of a current survey." Am J Cardiol **61**(14): 3G-8G.
- Banai, S., Y. Wolf, et al. (1998). "PDGF-receptor tyrosine kinase blocker AG1295 selectively attenuates smooth muscle cell growth in vitro and reduces neointimal formation after balloon angioplasty in swine." Circulation **97**(19): 1960-1969.
- Barchiesi, F., E. K. Jackson, et al. (2006). "2-Methoxyestradiol, an estradiol metabolite, inhibits neointima formation and smooth muscle cell growth via double blockade of the cell cycle." Circ Res **99**(3): 266-274.
- Bauriedel, G., S. Schluckebier, et al. (1998). "Apoptosis in restenosis versus stable-angina atherosclerosis: implications for the pathogenesis of restenosis." Arterioscler Thromb Vasc Biol **18**(7): 1132-1139.
- Bauters, C., E. Van Belle, et al. (1994). "Angiopeptin inhibits oncogene induction in rabbit aorta after balloon denudation." Circulation **89**(5): 2327-2331.
- Baxevanis, A. D., G. Arents, et al. (1995). "A variety of DNA-binding and multimeric proteins contain the histone fold motif." Nucleic Acids Res **23**(14): 2685-2691.
- Bellorini, M., D. K. Lee, et al. (1997). "CCAAT binding NF-Y-TBP interactions: NF-YB and NF-YC require short domains adjacent to their histone fold motifs for association with TBP basic residues." Nucleic Acids Res **25**(11): 2174-2181.
- Benatti, P., D. Dolfini, et al. (2011). "Specific inhibition of NF-Y subunits triggers different cell proliferation defects." Nucleic Acids Res **39**(13): 5356-5368.
- Berry, C., J. C. Tardif, et al. (2007). "Coronary heart disease in patients with diabetes: part I: recent advances in prevention and noninvasive management." J Am Coll Cardiol **49**(6): 631-642.

- Beyzade, S., S. Zhang, et al. (2003). "Influences of matrix metalloproteinase-3 gene variation on extent of coronary atherosclerosis and risk of myocardial infarction." J Am Coll Cardiol **41**(12): 2130-2137.
- Bhattacharya, A., J. M. Deng, et al. (2003). "The B subunit of the CCAAT box binding transcription factor complex (CBF/NF-Y) is essential for early mouse development and cell proliferation." Cancer Res **63**(23): 8167-8172.
- Bi, W., L. Wu, et al. (1997). "DNA binding specificity of the CCAAT-binding factor CBF/NF-Y." J Biol Chem **272**(42): 26562-26572.
- Bienertova-Vasku, J., P. Bienert, et al. (2010). "Common polymorphism +45T/G in adiponectin gene as potential modulator of in-stent restenosis development." Int J Cardiol **145**(2): 351.
- Bilder, G., T. Wentz, et al. (1999). "Restenosis following angioplasty in the swine coronary artery is inhibited by an orally active PDGF-receptor tyrosine kinase inhibitor, RPR101511A." Circulation **99**(25): 3292-3299.
- Black, A. R., J. D. Black, et al. (2001). "Sp1 and kruppel-like factor family of transcription factors in cell growth regulation and cancer." J Cell Physiol **188**(2): 143-160.
- Blagosklonny, M. V., Z. N. Demidenko, et al. (2006). "Cytostatic activity of paclitaxel in coronary artery smooth muscle cells is mediated through transient mitotic arrest followed by permanent post-mitotic arrest: comparison with cancer cells." Cell Cycle **5**(14): 1574-1579.
- Blaschke, F., D. Bruemmer, et al. (2004). "Egr-1 is a major vascular pathogenic transcription factor in atherosclerosis and restenosis." Rev Endocr Metab Disord **5**(3): 249-254.
- Blum, R., R. Gupta, et al. (2009). "Molecular signatures of prostate stem cells reveal novel signaling pathways and provide insights into prostate cancer." PLoS One **4**(5): e5722.
- Bolognese, F., M. Wasner, et al. (1999). "The cyclin B2 promoter depends on NF-Y, a trimer whose CCAAT-binding activity is cell-cycle regulated." Oncogene **18**(10): 1845-1853.
- Bonta, P. I., T. W. Pols, et al. (2010). "Nuclear receptor Nurr1 is expressed in and is associated with human restenosis and inhibits vascular lesion formation in mice involving inhibition of smooth muscle cell proliferation and inflammation." Circulation **121**(18): 2023-2032.
- Bouatia-Naji, N., A. Bonnefond, et al. (2010). "Genetic and functional assessment of the role of the rs13431652-A and rs573225-A alleles in the G6PC2 promoter that are strongly associated with elevated fasting glucose levels." Diabetes **59**(10): 2662-2671.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Braun-Dullaes, R. C., M. J. Mann, et al. (2001). "Cell cycle protein expression in vascular smooth muscle cells in vitro and in vivo is regulated through phosphatidylinositol 3-kinase and mammalian target of rapamycin." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(7): 1152-1158.
- Braun-Dullaes, R. C., A. Ziegler, et al. (2003). "Quantification of the cell-cycle inhibitors p27(Kip1) and p21(Cip1) in human atherectomy specimens: primary stenosis versus restenosis." J Lab Clin Med **141**(3): 179-189.

- Breen, D. M., K. K. Chan, et al. (2009). "Insulin increases reendothelialization and inhibits cell migration and neointimal growth after arterial injury." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(7): 1060-1066.
- Breen, D. M., J. K. Dhaliwall, et al. (2010). "Insulin inhibits and oral sucrose increases neointimal growth after arterial injury in rats." J Vasc Res **47**(5): 412-422.
- Brito, L. A., S. Chandrasekhar, et al. (2010). "Non-viral eNOS gene delivery and transfection with stents for the treatment of restenosis." Biomed Eng Online **9**: 56.
- Brooks, E. E., N. S. Gray, et al. (1997). "CVT-313, a specific and potent inhibitor of CDK2 that prevents neointimal proliferation." J Biol Chem **272**(46): 29207-29211.
- Brown, R. A., M. Williams, et al. (2010). "Sex-specific outcomes following revascularization with zotarolimus-eluting stents: comparison of angiographic and late-term clinical results." Catheter Cardiovasc Interv **76**(6): 804-813.
- Bucher, P. (1990). "Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences." J Mol Biol **212**(4): 563-578.
- Buchwald, A. B., A. H. Wagner, et al. (2002). "Decoy oligodeoxynucleotide against activator protein-1 reduces neointimal proliferation after coronary angioplasty in hypercholesterolemic minipigs." J Am Coll Cardiol **39**(4): 732-738.
- Buetow, B. S., K. A. Tappan, et al. (2003). "Chimera analysis supports a predominant role of PDGFRbeta in promoting smooth-muscle cell chemotaxis after arterial injury." Am J Pathol **163**(3): 979-984.
- Bungartz, G., H. Land, et al. (2012). "NF-Y is necessary for hematopoietic stem cell proliferation and survival." Blood **119**(6): 1380-1389.
- Burgess, T. L., E. F. Fisher, et al. (1995). "The antiproliferative activity of c-myc and c-myc antisense oligonucleotides in smooth muscle cells is caused by a nonantisense mechanism." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(9): 4051-4055.
- Burke, S. E., N. L. Lubbers, et al. (1999). "Neointimal formation after balloon-induced vascular injury in Yucatan minipigs is reduced by oral rapamycin." J Cardiovasc Pharmacol **33**(6): 829-835.
- Burr, D., H. Doss, et al. (2003). "A meta-analysis of studies on the association of the platelet PIA polymorphism of glycoprotein IIIa and risk of coronary heart disease." Stat Med **22**(10): 1741-1760.
- Butler, L. M., X. Zhou, et al. (2002). "The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(18): 11700-11705.
- Caplice, N. M., T. J. Bunch, et al. (2003). "Smooth muscle cells in human coronary atherosclerosis can originate from cells administered at marrow transplantation." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(8): 4754-4759.
- Cartharius, K., K. Frech, et al. (2005). "MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites." Bioinformatics **21**(13): 2933-2942.
- Ceribelli, M., M. Alcalay, et al. (2006). "Repression of new p53 targets revealed by ChIP on chip experiments." Cell Cycle **5**(10): 1102-1110.

- Ceribelli, M., P. Benatti, et al. (2009). "NF-YC complexity is generated by dual promoters and alternative splicing." *J Biol Chem* **284**(49): 34189-34200.
- Ceribelli, M., D. Dolfini, et al. (2008). "The histone-like NF-Y is a bifunctional transcription factor." *Mol Cell Biol* **28**(6): 2047-2058.
- Clute, P. and J. Pines (1999). "Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase." *Nat Cell Biol* **1**(2): 82-87.
- Cogswell, J. P., M. M. Godlevski, et al. (1995). "Upstream stimulatory factor regulates expression of the cell cycle-dependent cyclin B1 gene promoter." *Mol Cell Biol* **15**(5): 2782-2790.
- Collas, P. (2009). "The state-of-the-art of chromatin immunoprecipitation." *Methods Mol Biol* **567**: 1-25.
- Condorelli, G., J. K. Aycock, et al. (2001). "Mutated p21/WAF/CIP transgene overexpression reduces smooth muscle cell proliferation, macrophage deposition, oxidation-sensitive mechanisms, and restenosis in hypercholesterolemic apolipoprotein E knockout mice." *FASEB J* **15**(12): 2162-2170.
- Costa, M. A. and D. I. Simon (2005). "Molecular basis of restenosis and drug-eluting stents." *Circulation* **111**(17): 2257-2273.
- Coustry, F., S. N. Maity, et al. (1996). "The transcriptional activity of the CCAAT-binding factor CBF is mediated by two distinct activation domains, one in the CBF-B subunit and the other in the CBF-C subunit." *J Biol Chem* **271**(24): 14485-14491.
- Coustry, F., S. Sinha, et al. (1998). "The two activation domains of the CCAAT-binding factor CBF interact with the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex." *Biochem J* **331** ( Pt 1): 291-297.
- Covini, G., E. K. Chan, et al. (1997). "Immune response to cyclin B1 in hepatocellular carcinoma." *Hepatology* **25**(1): 75-80.
- Crombez, L., M. C. Morris, et al. (2009). "Targeting cyclin B1 through peptide-based delivery of siRNA prevents tumour growth." *Nucleic Acids Res* **37**(14): 4559-4569.
- Crosby, J. R., R. A. Seifert, et al. (1998). "Chimaeric analysis reveals role of Pdgf receptors in all muscle lineages." *Nat Genet* **18**(4): 385-388.
- Cutlip, D. E., M. S. Chauhan, et al. (2002). "Clinical restenosis after coronary stenting: perspectives from multicenter clinical trials." *J Am Coll Cardiol* **40**(12): 2082-2089.
- Chae, H. D., J. Kim, et al. (2011). "NF-Y binds to both G1- and G2-specific cyclin promoters; a possible role in linking CDK2/Cyclin A to CDK1/Cyclin B." *BMB Rep* **44**(8): 553-557.
- Chae, H. D., J. Yun, et al. (2004). "Cdk2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor is essential for the expression of the cell cycle-regulatory genes and cell cycle G1/S and G2/M transitions." *Oncogene* **23**(23): 4084-4088.
- Chan, D. W., S. Y. Yu, et al. (2008). "Over-expression of FOXM1 transcription factor is associated with cervical cancer progression and pathogenesis." *J Pathol* **215**(3): 245-252.
- Chang, M. W., E. Barr, et al. (1995). "Adenovirus-mediated over-expression of the cyclin/cyclin-dependent kinase inhibitor, p21 inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation in the rat carotid artery model of balloon angioplasty." *J Clin Invest* **96**(5): 2260-2268.

- Chang, Z. F. and C. J. Liu (1994). "Human thymidine kinase CCAAT-binding protein is NF-Y, whose A subunit expression is serum-dependent in human IMR-90 diploid fibroblasts." *J Biol Chem* **269**(27): 17893-17898.
- Charron, T., N. Nili, et al. (2006). "The cell cycle: a critical therapeutic target to prevent vascular proliferative disease." *Can J Cardiol* **22 Suppl B**: 41B-55B.
- Chelm, B. K. and E. P. Geiduschek (1979). "Gel electrophoretic separation of transcription complexes: an assay for RNA polymerase selectivity and a method for promoter mapping." *Nucleic Acids Res* **7**(7): 1851-1867.
- Chen, C. F., X. He, et al. (2011). "Novel regulation of nuclear factor-YB by miR-485-3p affects the expression of DNA topoisomerase IIalpha and drug responsiveness." *Mol Pharmacol* **79**(4): 735-741.
- Chen, D., K. Krasinski, et al. (1997). "Downregulation of cyclin-dependent kinase 2 activity and cyclin A promoter activity in vascular smooth muscle cells by p27(KIP1), an inhibitor of neointima formation in the rat carotid artery." *J Clin Invest* **99**(10): 2334-2341.
- Chiefari, E., A. Brunetti, et al. (2002). "Increased expression of AP2 and Sp1 transcription factors in human thyroid tumors: a role in NIS expression regulation?" *BMC Cancer* **2**: 35.
- Chintharlapalli, S., S. Papineni, et al. (2011). "Betulinic acid inhibits colon cancer cell and tumor growth and induces proteasome-dependent and -independent downregulation of specificity proteins (Sp) transcription factors." *BMC Cancer* **11**: 371.
- Chorley, B. N., X. Wang, et al. (2008). "Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: current and developing technologies." *Mutat Res* **659**(1-2): 147-157.
- Choudhury, G. G., C. Karamitsos, et al. (1997). "PI-3-kinase and MAPK regulate mesangial cell proliferation and migration in response to PDGF." *Am J Physiol* **273**(6 Pt 2): F931-938.
- Choudhury, G. G., L. Mahimainathan, et al. (2006). "c-Src couples PI 3 kinase/Akt and MAPK signaling to PDGF-induced DNA synthesis in mesangial cells." *Cell Signal* **18**(11): 1854-1864.
- Daemen, J. and P. W. Serruys (2007). "Drug-eluting stent update 2007: part II: Unsettled issues." *Circulation* **116**(8): 961-968.
- Daemen, J., P. Wenaweser, et al. (2007). "Early and late coronary stent thrombosis of sirolimus-eluting and paclitaxel-eluting stents in routine clinical practice: data from a large two-institutional cohort study." *Lancet* **369**(9562): 667-678.
- Dalvai, M., O. Mondesert, et al. (2011). "Cdc25B is negatively regulated by p53 through Sp1 and NF-Y transcription factors." *Oncogene* **30**(19): 2282-2288.
- De Amicis, F., F. Giordano, et al. (2011). "Resveratrol, through NF-Y/p53/Sin3/HDAC1 complex phosphorylation, inhibits estrogen receptor alpha gene expression via p38MAPK/CK2 signaling in human breast cancer cells." *FASEB J* **25**(10): 3695-3707.
- de Maat, M. P., J. W. Jukema, et al. (1999). "Effect of the stromelysin-1 promoter on efficacy of pravastatin in coronary atherosclerosis and restenosis." *Am J Cardiol* **83**(6): 852-856.
- Deng, W., S. W. Tsao, et al. (2011). "Impact of G checkpoint defect on centromeric instability." *Oncogene* **30**(11): 1281-1289.

- Deuse, T., T. Koyanagi, et al. (2010). "Sustained inhibition of epsilon protein kinase C inhibits vascular restenosis after balloon injury and stenting." Circulation **122**(11 Suppl): S170-178.
- Di Agostino, S., S. Strano, et al. (2006). "Gain of function of mutant p53: the mutant p53/NF-Y protein complex reveals an aberrant transcriptional mechanism of cell cycle regulation." Cancer Cell **10**(3): 191-202.
- Diamanti-Kandarakis, E., G. Palioniko, et al. (2004). "The prevalence of 4G5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) gene in polycystic ovarian syndrome and its association with plasma PAI-1 levels." Eur J Endocrinol **150**(6): 793-798.
- Dolfini, D., R. Gatta, et al. (2012). "NF-Y and the transcriptional activation of CCAAT promoters." Crit Rev Biochem Mol Biol **47**(1): 29-49.
- Dolfini, D., F. Zambelli, et al. (2009). "A perspective of promoter architecture from the CCAAT box." Cell Cycle **8**(24): 4127-4137.
- Domashenko, A. D., G. Danet-Desnoyers, et al. (2010). "TAT-mediated transduction of NF-Ya peptide induces the ex vivo proliferation and engraftment potential of human hematopoietic progenitor cells." Blood **116**(15): 2676-2683.
- Dotter, C. T. and M. P. Judkins (1964). "Transluminal Treatment of Arteriosclerotic Obstruction. Description of a New Technic and a Preliminary Report of Its Application." Circulation **30**: 654-670.
- Edwards, D., J. A. Murray, et al. (1998). "Multiple genes encoding the conserved CCAAT-box transcription factor complex are expressed in Arabidopsis." Plant Physiol **117**(3): 1015-1022.
- Egloff, A. M., L. A. Vella, et al. (2006). "Cyclin B1 and other cyclins as tumor antigens in immunosurveillance and immunotherapy of cancer." Cancer Res **66**(1): 6-9.
- Eisinger, J. (1971). "Visible gel electrophoresis and the determination of association constants." Biochem Biophys Res Commun **44**(5): 1135-1142.
- Ekholm, S. V. and S. I. Reed (2000). "Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle." Curr Opin Cell Biol **12**(6): 676-684.
- Elezi, S., A. Kastrati, et al. (1998). "Diabetes mellitus and the clinical and angiographic outcome after coronary stent placement." J Am Coll Cardiol **32**(7): 1866-1873.
- Elkon, R., C. Linhart, et al. (2003). "Genome-wide in silico identification of transcriptional regulators controlling the cell cycle in human cells." Genome Res **13**(5): 773-780.
- Emanuelsson, H., K. J. Beatt, et al. (1995). "Long-term effects of angiopeptin treatment in coronary angioplasty. Reduction of clinical events but not angiographic restenosis. European Angiopeptin Study Group." Circulation **91**(6): 1689-1696.
- Eriksen, U. H., O. Amtorp, et al. (1995). "Randomized double-blind Scandinavian trial of angiopeptin versus placebo for the prevention of clinical events and restenosis after coronary balloon angioplasty." Am Heart J **130**(1): 1-8.
- Evans, W. E. and M. V. Relling (1999). "Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics." Science **286**(5439): 487-491.

- Fan, X. C. and J. A. Steitz (1998). "Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs." EMBO J **17**(12): 3448-3460.
- Faniello, M. C., M. A. Bevilacqua, et al. (1999). "The B subunit of the CAAT-binding factor NFY binds the central segment of the Co-activator p300." J Biol Chem **274**(12): 7623-7626.
- Farina, A., C. Gaetano, et al. (1996). "The inhibition of cyclin B1 gene transcription in quiescent NIH3T3 cells is mediated by an E-box." Oncogene **13**(6): 1287-1296.
- Farina, A., I. Manni, et al. (1999). "Down-regulation of cyclin B1 gene transcription in terminally differentiated skeletal muscle cells is associated with loss of functional CCAAT-binding NF-Y complex." Oncogene **18**(18): 2818-2827.
- Farooq, V., B. D. Gogas, et al. (2011). "Restenosis: delineating the numerous causes of drug-eluting stent restenosis." Circ Cardiovasc Interv **4**(2): 195-205.
- Fasciano, S., R. C. Patel, et al. (2005). "Regulation of vascular smooth muscle proliferation by heparin: inhibition of cyclin-dependent kinase 2 activity by p27(kip1)." J Biol Chem **280**(16): 15682-15689.
- Faxon, D. P. (2000). "Predicting restenosis: bigger is better but not best." Circulation **101**(9): 946-947.
- Ferns, G. A., A. S. Motani, et al. (1991). "The insulin-like growth factors: their putative role in atherogenesis." Artery **18**(4): 197-225.
- Forte, A., M. Cipollaro, et al. (2007). "Pathophysiology of stem cells in restenosis." Histol Histopathol **22**(5): 547-557.
- Fried, M. and D. M. Crothers (1981). "Equilibria and kinetics of lac repressor-operator interactions by polyacrylamide gel electrophoresis." Nucleic Acids Res **9**(23): 6505-6525.
- Frontini, M., C. Imbriano, et al. (2002). "NF-Y recruitment of TFIID, multiple interactions with histone fold TAF(II)s." J Biol Chem **277**(8): 5841-5848.
- Frontini, M., C. Imbriano, et al. (2004). "Cell cycle regulation of NF-YC nuclear localization." Cell Cycle **3**(2): 217-222.
- Fujita, N., Y. Furukawa, et al. (1999). "Failure of cdc2 promoter activation and G(2)/M transition by ANG II and AVP in vascular smooth muscle cells." Am J Physiol **277**(2 Pt 2): H515-523.
- Fuster, J. J., P. Fernandez, et al. (2010). "Control of cell proliferation in atherosclerosis: insights from animal models and human studies." Cardiovasc Res **86**: 254-264
- Fuster, V., L. Badimon, et al. (1992). "The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1)." N Engl J Med **326**(4): 242-250.
- Fuster, V., L. Badimon, et al. (1992). "The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2)." N Engl J Med **326**(5): 310-318.
- Gallant, P. and E. A. Nigg (1994). "Identification of a novel vertebrate cyclin: cyclin B3 shares properties with both A- and B-type cyclins." EMBO J **13**(3): 595-605.
- Gallo, R., A. Padurean, et al. (1999). "Inhibition of intimal thickening after balloon angioplasty in porcine coronary arteries by targeting regulators of the cell cycle." Circulation **99**(16): 2164-2170.

- Garcia-Ramirez, M., J. Martinez-Gonzalez, et al. (2005). "Transcription factor SOX18 is expressed in human coronary atherosclerotic lesions and regulates DNA synthesis and vascular cell growth." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(11): 2398-2403.
- Garg, S. and P. W. Serruys (2010). "Coronary stents: current status." J Am Coll Cardiol **56**(10 Suppl): S1-42.
- Garner, M. M. and A. Revzin (1981). "A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the Escherichia coli lactose operon regulatory system." Nucleic Acids Res **9**(13): 3047-3060.
- Gasperikova, D., N. D. Tribble, et al. (2009). "Identification of a novel beta-cell glucokinase (GCK) promoter mutation (-71G>C) that modulates GCK gene expression through loss of allele-specific Sp1 binding causing mild fasting hyperglycemia in humans." Diabetes **58**(8): 1929-1935.
- Gatta, R., D. Dolfini, et al. (2011). "NF-Y joins E2Fs, p53 and other stress transcription factors at the apoptosis table." Cell Death Dis **2**: e162.
- Gatta, R. and R. Mantovani (2011). "NF-Y affects histone acetylation and H2A.Z deposition in cell cycle promoters." Epigenetics **6**(4): 526-534.
- Gibson, G. (2011). "Rare and common variants: twenty arguments." Nat Rev Genet **13**(2): 135-145.
- Giese, N. A., M. M. Marijjanowski, et al. (1999). "The role of alpha and beta platelet-derived growth factor receptor in the vascular response to injury in nonhuman primates." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(4): 900-909.
- Gilbert, J., J. Raboud, et al. (2004). "Meta-analysis of the effect of diabetes on restenosis rates among patients receiving coronary angioplasty stenting." Diabetes Care **27**(4): 990-994.
- Giusti, B., A. M. Gori, et al. (2009). "Relation of cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism to occurrence of drug-eluting coronary stent thrombosis." Am J Cardiol **103**(6): 806-811.
- Giusti, B., A. M. Gori, et al. (2007). "Cytochrome P450 2C19 loss-of-function polymorphism, but not CYP3A4 IVS10 + 12G/A and P2Y12 T744C polymorphisms, is associated with response variability to dual antiplatelet treatment in high-risk vascular patients." Pharmacogenet Genomics **17**(12): 1057-1064.
- Good, L. F. and K. Y. Chen (1996). "Cell cycle- and age-dependent transcriptional regulation of human thymidine kinase gene: the role of NF-Y in the CBP/tk binding complex." Biol Signals **5**(3): 163-169.
- Goodarzi, H., O. Elemento, et al. (2009). "Revealing global regulatory perturbations across human cancers." Mol Cell **36**(5): 900-911.
- Goukassian, D., S. M. Sanz-Gonzalez, et al. (2001). "Inhibition of the cyclin D1/E2F pathway by PCA-4230, a potent repressor of cellular proliferation." Br J Pharmacol **132**(7): 1597-1605.
- Graham, F. L. and A. J. van der Eb (1973). "Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5." Virology **54**(2): 536-539.
- Granada, J. F., D. Ensenat, et al. (2005). "Single perivascular delivery of mitomycin C stimulates p21 expression and inhibits neointima formation in rat arteries." Arterioscler Thromb Vasc Biol **25**(11): 2343-2348.
- Grant, S., A. J. Freemerman, et al. (1996). "Effect of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine on apoptosis and differentiation in human

- monocytic leukemia cells (U937) expressing a c-Jun dominant-negative mutant protein (TAM67)." Cell Growth Differ **7**(5): 603-613.
- Grassi, G., M. Grassi, et al. (2001). "Selection and characterization of active hammerhead ribozymes targeted against cyclin E and E2F1 full-length mRNA." Antisense Nucleic Acid Drug Dev **11**(5): 271-287.
- Grassi, G., A. Schneider, et al. (2005). "Hammerhead ribozymes targeted against cyclin E and E2F1 cooperate to down-regulate coronary smooth muscle cell proliferation." J Gene Med **7**(9): 1223-1234.
- Grimm, M., M. Spiecker, et al. (2002). "Inhibition of major histocompatibility complex class II gene transcription by nitric oxide and antioxidants." J Biol Chem **277**(29): 26460-26467.
- Grskovic, M., C. Chaivorapol, et al. (2007). "Systematic identification of cis-regulatory sequences active in mouse and human embryonic stem cells." PLoS Genet **3**(8): e145.
- Grube, E., S. Silber, et al. (2003). "TAXUS I: six- and twelve-month results from a randomized, double-blind trial on a slow-release paclitaxel-eluting stent for de novo coronary lesions." Circulation **107**(1): 38-42.
- Gruntzig, A. R., A. Senning, et al. (1979). "Nonoperative dilatation of coronary-artery stenosis: percutaneous transluminal coronary angioplasty." N Engl J Med **301**(2): 61-68.
- Guo, K., V. Andres, et al. (1998). "Nitric oxide-induced downregulation of Cdk2 activity and cyclin A gene transcription in vascular smooth muscle cells." Circulation **97**(20): 2066-2072.
- Gurtner, A., P. Fuschi, et al. (2008). "NF-Y dependent epigenetic modifications discriminate between proliferating and postmitotic tissue." PLoS One **3**(4): e2047.
- Gurtner, A., I. Manni, et al. (2003). "Requirement for down-regulation of the CCAAT-binding activity of the NF-Y transcription factor during skeletal muscle differentiation." Mol Biol Cell **14**(7): 2706-2715.
- Hackzell, A., H. Uramoto, et al. (2002). "p73 independent of c-Myc represses transcription of platelet-derived growth factor beta-receptor through interaction with NF-Y." J Biol Chem **277**(42): 39769-39776.
- Hagting, A., N. Den Elzen, et al. (2002). "Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1." J Cell Biol **157**(7): 1125-1137.
- Hagting, A., M. Jackman, et al. (1999). "Translocation of cyclin B1 to the nucleus at prophase requires a phosphorylation-dependent nuclear import signal." Curr Biol **9**(13): 680-689.
- Halperin, Y., C. Linhart, et al. (2009). "Allegro: analyzing expression and sequence in concert to discover regulatory programs." Nucleic Acids Res **37**(5): 1566-1579.
- Hamann, L., A. Gomma, et al. (2005). "A frequent toll-like receptor (TLR)-2 polymorphism is a risk factor for coronary restenosis." J Mol Med (Berl) **83**(6): 478-485.
- Han, W. and G. N. Liu (2010). "EGR-1 decoy ODNs inhibit vascular smooth muscle cell proliferation and neointimal hyperplasia of balloon-injured arteries in rat." Life Sci **86**(7-8): 234-243.
- Hardy, J. and A. Singleton (2009). "Genomewide association studies and human disease." N Engl J Med **360**(17): 1759-1768.

- Hart, C. E., L. W. Kraiss, et al. (1999). "PDGFbeta receptor blockade inhibits intimal hyperplasia in the baboon." Circulation **99**(4): 564-569.
- Hashiya, N., M. Aoki, et al. (2004). "Local delivery of E2F decoy oligodeoxynucleotides using ultrasound with microbubble agent (Optison) inhibits intimal hyperplasia after balloon injury in rat carotid artery model." Biochem Biophys Res Commun **317**(2): 508-514.
- Hellman, L. M. and M. G. Fried (2007). "Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) for detecting protein-nucleic acid interactions." Nat Protoc **2**(8): 1849-1861.
- Hess, J., P. Angel, et al. (2004). "AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings." J Cell Sci **117**(Pt 25): 5965-5973.
- Hixon, M. L., C. Obejero-Paz, et al. (2000). "Cks1 mediates vascular smooth muscle cell polyploidization." J Biol Chem **275**(51): 40434-40442.
- Hochegger, H., A. Klotzbucher, et al. (2001). "New B-type cyclin synthesis is required between meiosis I and II during *Xenopus* oocyte maturation." Development **128**(19): 3795-3807.
- Holmes, D. R., Jr., R. E. Vlietstra, et al. (1984). "Restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty (PTCA): a report from the PTCA Registry of the National Heart, Lung, and Blood Institute." Am J Cardiol **53**(12): 77C-81C.
- Holloway, S. L., M. Glotzer, et al. (1993). "Anaphase is initiated by proteolysis rather than by the inactivation of maturation-promoting factor." Cell **73**(7): 1393-1402.
- Hooft van Huijsduijnen, R., X. Y. Li, et al. (1990). "Co-evolution from yeast to mouse: cDNA cloning of the two NF-Y (CP-1/CBF) subunits." EMBO J **9**(10): 3119-3127.
- Hoppmann, P., A. Erl, et al. (2009). "No association of chromosome 9p21.3 variation with clinical and angiographic outcomes after placement of drug-eluting stents." JACC Cardiovasc Interv **2**(11): 1149-1155.
- Hoppmann, P., W. Koch, et al. (2004). "The 5A/6A polymorphism of the stromelysin-1 gene and restenosis after percutaneous coronary interventions." Eur Heart J **25**(4): 335-341.
- Hu, Q., J. F. Lu, et al. (2006). "Inhibition of CBF/NF-Y mediated transcription activation arrests cells at G2/M phase and suppresses expression of genes activated at G2/M phase of the cell cycle." Nucleic Acids Res **34**(21): 6272-6285.
- Hu, Q. and S. N. Maity (2000). "Stable expression of a dominant negative mutant of CCAAT binding factor/NF-Y in mouse fibroblast cells resulting in retardation of cell growth and inhibition of transcription of various cellular genes." J Biol Chem **275**(6): 4435-4444.
- Hu, Y., L. Cheng, et al. (1997). "Activation of mitogen-activated protein kinases (ERK/JNK) and AP-1 transcription factor in rat carotid arteries after balloon injury." Arterioscler Thromb Vasc Biol **17**(11): 2808-2816.
- Huang, Y., A. Y. Chuang, et al. (2010). "Phospho-DeltaNp63alpha/NF-Y protein complex transcriptionally regulates DDIT3 expression in squamous cell carcinoma cells upon cisplatin exposure." Cell Cycle **9**(2): 328-338.
- Huet, X., J. Rech, et al. (1996). "Cyclin A expression is under negative transcriptional control during the cell cycle." Mol Cell Biol **16**(7): 3789-3798.

- Humphries, S., C. Bauters, et al. (2002). "The 5A6A polymorphism in the promoter of the stromelysin-1 (MMP3) gene as a risk factor for restenosis." Eur Heart J **23**(9): 721-725.
- Hunt, J. R., C. B. Martin, et al. (2005). "Transcriptional regulation of the murine C5a receptor gene: NF-Y is required for basal and LPS induced expression in macrophages and endothelial cells." Mol Immunol **42**(11): 1405-1415.
- Hunt, T., K. Nasmyth, et al. (2011). "The cell cycle." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **366**(1584): 3494-3497.
- Hwang, A., W. G. McKenna, et al. (1998). "Cell cycle-dependent usage of transcriptional start sites. A novel mechanism for regulation of cyclin B1." J Biol Chem **273**(47): 31505-31509.
- Iijima, R., G. Ndrepepa, et al. (2007). "Impact of diabetes mellitus on long-term outcomes in the drug-eluting stent era." Am Heart J **154**(4): 688-693.
- Imbriano, C., N. Gnesutta, et al. (2012). "The NF-Y/p53 liaison: Well beyond repression." Biochim Biophys Acta **1825**(2): 131-139.
- Indolfi, C., E. V. Avvedimento, et al. (1995). "Inhibition of cellular ras prevents smooth muscle cell proliferation after vascular injury in vivo." Nat Med **1**(6): 541-545.
- Innocente, S. A., J. L. Abrahamson, et al. (1999). "p53 regulates a G2 checkpoint through cyclin B1." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(5): 2147-2152.
- Innocente, S. A. and J. M. Lee (2005). "p53 is a NF-Y- and p21-independent, Sp1-dependent repressor of cyclin B1 transcription." FEBS Lett **579**(5): 1001-1007.
- Inoue, T., K. Croce, et al. (2011). "Vascular inflammation and repair: implications for re-endothelialization, restenosis, and stent thrombosis." JACC Cardiovasc Interv **4**(10): 1057-1066.
- Ishimaru, F., B. Mari, et al. (1997). "The type 2 CD10/neutral endopeptidase 24.11 promoter: functional characterization and tissue-specific regulation by CBF/NF-Y isoforms." Blood **89**(11): 4136-4145.
- Ishiwata, S., T. Tukada, et al. (1997). "Postangioplasty restenosis: platelet activation and the coagulation-fibrinolysis system as possible factors in the pathogenesis of restenosis." Am Heart J **133**(4): 387-392.
- Izawa, A., J. Suzuki, et al. (2001). "Tranilast inhibits cardiac allograft vasculopathy in association with p21(Waf1/Cip1) expression on neointimal cells in murine cardiac transplantation model." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(7): 1172-1178.
- Izumi, H., C. Molander, et al. (2001). "Mechanism for the transcriptional repression by c-Myc on PDGF beta-receptor." J Cell Sci **114**(Pt 8): 1533-1544.
- Jackman, M., M. Firth, et al. (1995). "Human cyclins B1 and B2 are localized to strikingly different structures: B1 to microtubules, B2 primarily to the Golgi apparatus." EMBO J **14**(8): 1646-1654.
- Jackson, C. L., E. W. Raines, et al. (1993). "Role of endogenous platelet-derived growth factor in arterial smooth muscle cell migration after balloon catheter injury." Arterioscler Thromb **13**(8): 1218-1226.
- Jarvis, T. C., L. J. Alby, et al. (1996). "Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by ribozymes that cleave c-myb mRNA." RNA **2**(5): 419-428.

- Jarvis, T. C., F. E. Wincott, et al. (1996). "Optimizing the cell efficacy of synthetic ribozymes. Site selection and chemical modifications of ribozymes targeting the proto-oncogene c-myc." *J Biol Chem* **271**(46): 29107-29112.
- Jaschke, B., S. Milz, et al. (2004). "Local cyclin-dependent kinase inhibition by flavopiridol inhibits coronary artery smooth muscle cell proliferation and migration: Implications for the applicability on drug-eluting stents to prevent neointima formation following vascular injury." *FASEB J* **18**(11): 1285-1287.
- Javaherian, K., S. Y. Park, et al. (2002). "Laminin modulates morphogenic properties of the collagen XVIII endostatin domain." *J Biol Chem* **277**(47): 45211-45218.
- Jawien, A., D. F. Bowen-Pope, et al. (1992). "Platelet-derived growth factor promotes smooth muscle migration and intimal thickening in a rat model of balloon angioplasty." *J Clin Invest* **89**(2): 507-511.
- Jeong, J. H., J. Y. An, et al. (2009). "Effects of low dose quercetin: cancer cell-specific inhibition of cell cycle progression." *J Cell Biochem* **106**(1): 73-82.
- Jguirim-Souissi, I., A. Jelassi, et al. (2011). "Matrix metalloproteinase-1 and matrix metalloproteinase-12 gene polymorphisms and the outcome of coronary artery disease." *Coron Artery Dis* **22**(6): 388-393.
- Jia, Z., Y. Gao, et al. (2010). "Combined treatment of pancreatic cancer with mithramycin A and tolfenamic acid promotes Sp1 degradation and synergistic antitumor activity." *Cancer Res* **70**(3): 1111-1119.
- Jiang, Y., L. Wang, et al. (2004). "A high expression level of insulin-like growth factor I receptor is associated with increased expression of transcription factor Sp1 and regional lymph node metastasis of human gastric cancer." *Clin Exp Metastasis* **21**(8): 755-764.
- Jormsjo, S., S. Ye, et al. (2000). "Allele-specific regulation of matrix metalloproteinase-12 gene activity is associated with coronary artery luminal dimensions in diabetic patients with manifest coronary artery disease." *Circ Res* **86**(9): 998-1003.
- Jukema, J. W., J. J. Verschuren, et al. (2012). "Restenosis after PCI. Part 1: pathophysiology and risk factors." *Nat Rev Cardiol* **9**(1): 53-62.
- Jung, M. S., J. Yun, et al. (2001). "p53 and its homologues, p63 and p73, induce a replicative senescence through inactivation of NF-Y transcription factor." *Oncogene* **20**(41): 5818-5825.
- Jurchott, K., S. Bergmann, et al. (2003). "YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression." *J Biol Chem* **278**(30): 27988-27996.
- Kalaszczynska, I., Y. Geng, et al. (2009). "Cyclin A is redundant in fibroblasts but essential in hematopoietic and embryonic stem cells." *Cell* **138**(2): 352-365.
- Kamiyama, J., T. Inoue, et al. (1999). "The ubiquitous transcription factor NF-Y positively regulates the transcription of human p27Kip1 through a CCAAT box located in the 5'-upstream region of the p27Kip1 gene." *FEBS Lett* **455**(3): 281-285.
- Kao, C. Y., A. Tanimoto, et al. (1999). "Transactivation of the human cdc2 promoter by adenovirus E1A. E1A induces the expression and assembly of a heteromeric complex consisting of the CCAAT box binding factor,

- CBF/NF-Y, and a 110-kDa DNA-binding protein." J Biol Chem **274**(33): 23043-23051.
- Karpurapu, M., D. Wang, et al. (2008). "NFATc1 targets cyclin A in the regulation of vascular smooth muscle cell multiplication during restenosis." J Biol Chem **283**(39): 26577-26590.
- Kastrati, A., W. Koch, et al. (2000). "Protective role against restenosis from an interleukin-1 receptor antagonist gene polymorphism in patients treated with coronary stenting." J Am Coll Cardiol **36**(7): 2168-2173.
- Kastrati, A., A. Schomig, et al. (1997). "Predictive factors of restenosis after coronary stent placement." J Am Coll Cardiol **30**(6): 1428-1436.
- Kastrati, A., A. Schomig, et al. (1998). "Interlesion dependence of the risk for restenosis in patients with coronary stent placement in multiple lesions." Circulation **97**(24): 2396-2401.
- Kastrati, A., A. Schomig, et al. (1999). "PIA polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risk of restenosis after coronary stent placement." Circulation **99**(8): 1005-1010.
- Kathiresan, S., S. B. Gabriel, et al. (2005). "Comprehensive survey of common genetic variation at the plasminogen activator inhibitor-1 locus and relations to circulating plasminogen activator inhibitor-1 levels." Circulation **112**(12): 1728-1735.
- Katsaros, K. M., S. P. Kastl, et al. (2010). "Increased restenosis rate after implantation of drug-eluting stents in patients with elevated serum activity of matrix metalloproteinase-2 and -9." JACC Cardiovasc Interv **3**(1): 90-97.
- Katsaros, K. M., W. S. Speidl, et al. (2008). "Plasminogen activator inhibitor-1 predicts coronary in-stent restenosis of drug-eluting stents." J Thromb Haemost **6**(3): 508-513.
- Katula, K. S., K. L. Wright, et al. (1997). "Cyclin-dependent kinase activation and S-phase induction of the cyclin B1 gene are linked through the CCAAT elements." Cell Growth Differ **8**(7): 811-820.
- Kavurma, M. M. and L. M. Khachigian (2003). "Sp1 inhibits proliferation and induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by repressing p21WAF1/Cip1 transcription and cyclin D1-Cdk4-p21WAF1/Cip1 complex formation." J Biol Chem **278**(35): 32537-32543.
- Kearney, M., A. Pieczek, et al. (1997). "Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease." Circulation **95**(8): 1998-2002.
- Khorsandi, M. J., J. A. Fagin, et al. (1992). "Regulation of insulin-like growth factor-I and its receptor in rat aorta after balloon denudation. Evidence for local bioactivity." J Clin Invest **90**(5): 1926-1931.
- Kim, E. C., J. S. Lau, et al. (1997). "Positive and negative regulation of the human thymidine kinase promoter mediated by CCAAT binding transcription factors NF-Y/CBF, dbpA, and CDP/cut." Cell Growth Differ **8**(12): 1329-1338.
- Kim, I. S., S. Sinha, et al. (1996). "Determination of functional domains in the C subunit of the CCAAT-binding factor (CBF) necessary for formation of a CBF-DNA complex: CBF-B interacts simultaneously with both the CBF-A and CBF-C subunits to form a heterotrimeric CBF molecule." Mol Cell Biol **16**(8): 4003-4013.

- Kim, J. Y., Y. G. Ko, et al. (2005). "Comparison of effects of drug-eluting stents versus bare metal stents on plasma C-reactive protein levels." Am J Cardiol **96**(10): 1384-1388.
- Kim, M. J., K. G. Park, et al. (2005). "Cilostazol inhibits vascular smooth muscle cell growth by downregulation of the transcription factor E2F." Hypertension **45**(4): 552-556.
- Kim, T., K. K. Chan, et al. (2005). "Anti-atherogenic effect of insulin in vivo." J Vasc Res **42**(6): 455-462.
- Kipshidze, N. N., P. Iversen, et al. (2004). "Advanced c-myc antisense (AVI-4126)-eluting phosphorylcholine-coated stent implantation is associated with complete vascular healing and reduced neointimal formation in the porcine coronary restenosis model." Catheter Cardiovasc Interv **61**(4): 518-527.
- Kipshidze, N. N., H. S. Kim, et al. (2002). "Intramural coronary delivery of advanced antisense oligonucleotides reduces neointimal formation in the porcine stent restenosis model." J Am Coll Cardiol **39**(10): 1686-1691.
- Kirtane, A. J. and G. W. Stone (2011). "How to minimize stent thrombosis." Circulation **124**(11): 1283-1287.
- Kitadai, Y., W. Yasui, et al. (1992). "The level of a transcription factor Sp1 is correlated with the expression of EGF receptor in human gastric carcinomas." Biochem Biophys Res Commun **189**(3): 1342-1348.
- Knappskog, S., M. Bjornstlett, et al. (2011). "The MDM2 promoter SNP285C/309G haplotype diminishes Sp1 transcription factor binding and reduces risk for breast and ovarian cancer in Caucasians." Cancer Cell **19**(2): 273-282.
- Koch, W., A. de Waha, et al. (2010). "Haplotypes and 5A/6A polymorphism of the matrix metalloproteinase-3 gene in coronary disease: case-control study and a meta-analysis." Atherosclerosis **208**(1): 171-176.
- Koch, W., K. Tiroch, et al. (2003). "Tumor necrosis factor-alpha, lymphotoxin-alpha, and interleukin-10 gene polymorphisms and restenosis after coronary artery stenting." Cytokine **24**(4): 161-171.
- Kong, D., L. G. Melo, et al. (2004). "Enhanced inhibition of neointimal hyperplasia by genetically engineered endothelial progenitor cells." Circulation **109**(14): 1769-1775.
- Korner, K., V. Jerome, et al. (2001). "Cell cycle regulation of the murine cdc25B promoter: essential role for nuclear factor-Y and a proximal repressor element." J Biol Chem **276**(13): 9662-9669.
- Korner, K. and R. Muller (2000). "In vivo structure of the cell cycle-regulated human cdc25C promoter." J Biol Chem **275**(25): 18676-18681.
- Kornowski, R., G. S. Mintz, et al. (1997). "Increased restenosis in diabetes mellitus after coronary interventions is due to exaggerated intimal hyperplasia. A serial intravascular ultrasound study." Circulation **95**(6): 1366-1369.
- Kotecha, M., J. Kluza, et al. (2008). "Inhibition of DNA binding of the NF-Y transcription factor by the pyrrolobenzodiazepine-polyamide conjugate GWL-78." Mol Cancer Ther **7**(5): 1319-1328.
- Koziol, J. A., J. Y. Zhang, et al. (2003). "Recursive partitioning as an approach to selection of immune markers for tumor diagnosis." Clin Cancer Res **9**(14): 5120-5126.

- Krause, K., M. Wasner, et al. (2000). "The tumour suppressor protein p53 can repress transcription of cyclin B." Nucleic Acids Res **28**(22): 4410-4418.
- Kullmann, S., P. Binner, et al. (2009). "Variation in the human soluble epoxide hydrolase gene and risk of restenosis after percutaneous coronary intervention." BMC Cardiovasc Disord **9**: 48.
- Kume, M., K. Komori, et al. (2002). "Administration of a decoy against the activator protein-1 binding site suppresses neointimal thickening in rabbit balloon-injured arteries." Circulation **105**(10): 1226-1232.
- Kutryk, M. J., D. P. Foley, et al. (2002). "Local intracoronary administration of antisense oligonucleotide against c-myc for the prevention of in-stent restenosis: results of the randomized investigation by the Thoraxcenter of antisense DNA using local delivery and IVUS after coronary stenting (ITALICS) trial." J Am Coll Cardiol **39**(2): 281-287.
- Labib, K. and G. De Piccoli (2011). "Surviving chromosome replication: the many roles of the S-phase checkpoint pathway." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **366**(1584): 3554-3561.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lambert, D. L., N. Malik, et al. (2001). "Localization of c-Myb and induction of apoptosis by antisense oligonucleotide c-Myb after angioplasty of porcine coronary arteries." Arterioscler Thromb Vasc Biol **21**(11): 1727-1732.
- Landgren, E., A. Eriksson, et al. (1996). "Induction of fibroblast growth factor receptor-1 mRNA and protein by platelet-derived growth factor BB." Exp Cell Res **223**(2): 405-411.
- Laoukili, J., M. R. Kooistra, et al. (2005). "FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability." Nat Cell Biol **7**(2): 126-136.
- Lecona, E., J. I. Barrasa, et al. (2008). "Upregulation of annexin A1 expression by butyrate in human colon adenocarcinoma cells: role of p53, NF- $\kappa$ B, and p38 mitogen-activated protein kinase." Mol Cell Biol **28**(15): 4665-4674.
- Lee, M. S., E. M. David, et al. (2004). "Molecular and cellular basis of restenosis after percutaneous coronary intervention: the intertwining roles of platelets, leukocytes, and the coagulation-fibrinolysis system." J Pathol **203**(4): 861-870.
- Lee, W. S., J. A. Harder, et al. (1997). "Progesterone inhibits arterial smooth muscle cell proliferation." Nat Med **3**(9): 1005-1008.
- Lemos, P. A., A. Hoye, et al. (2004). "Clinical, angiographic, and procedural predictors of angiographic restenosis after sirolimus-eluting stent implantation in complex patients: an evaluation from the Rapamycin-Eluting Stent Evaluated At Rotterdam Cardiology Hospital (RESEARCH) study." Circulation **109**(11): 1366-1370.
- Leppanen, O., N. Janjic, et al. (2000). "Intimal hyperplasia recurs after removal of PDGF-AB and -BB inhibition in the rat carotid artery injury model." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(11): E89-95.
- Leung, T. W., S. S. Lin, et al. (2001). "Over-expression of FoxM1 stimulates cyclin B1 expression." FEBS Lett **507**(1): 59-66.
- Lev, E. I., R. T. Patel, et al. (2007). "Genetic polymorphisms of the platelet receptors P2Y(12), P2Y(1) and GP IIIa and response to aspirin and clopidogrel." Thromb Res **119**(3): 355-360.

- Li, J., A. N. Meyer, et al. (1997). "Nuclear localization of cyclin B1 mediates its biological activity and is regulated by phosphorylation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 502-507.
- Li, X. Y., R. Hooft van Huijsduijnen, et al. (1992). "Intron-exon organization of the NF-Y genes. Tissue-specific splicing modifies an activation domain." J Biol Chem **267**(13): 8984-8990.
- Liberati, C., A. di Silvio, et al. (1999). "NF-Y binding to twin CCAAT boxes: role of Q-rich domains and histone fold helices." J Mol Biol **285**(4): 1441-1455.
- Lichtinghagen, R., M. J. Bahr, et al. (2003). "Expression and coordinated regulation of matrix metalloproteinases in chronic hepatitis C and hepatitis C virus-induced liver cirrhosis." Clin Sci (Lond) **105**(3): 373-382.
- Lietard, J., O. Musso, et al. (1997). "Sp1-mediated transactivation of LamC1 promoter and coordinated expression of laminin-gamma1 and Sp1 in human hepatocellular carcinomas." Am J Pathol **151**(6): 1663-1672.
- Lindner, V., D. A. Lappi, et al. (1991). "Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation." Circ Res **68**(1): 106-113.
- Linhart, C., R. Elkon, et al. (2005). "Deciphering transcriptional regulatory elements that encode specific cell cycle phasing by comparative genomics analysis." Cell Cycle **4**(12): 1788-1797.
- Liu, Q., H. Yan, et al. (1998). "Transcriptional activation of the p34cdc2 gene by cdc2 promoter binding factor/nuclear factor-Y in fetal rat ventricular myocytes." Circ Res **82**(2): 251-260.
- Lohmueller, K. E., C. L. Pearce, et al. (2003). "Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease." Nat Genet **33**(2): 177-182.
- Lok, C. N., A. J. Lang, et al. (2002). "Characterization of the human topoisomerase IIbeta (TOP2B) promoter activity: essential roles of the nuclear factor-Y (NF-Y)- and specificity protein-1 (Sp1)-binding sites." Biochem J **368**(Pt 3): 741-751.
- Lou, Z., S. O'Reilly, et al. (2005). "Down-regulation of overexpressed sp1 protein in human fibrosarcoma cell lines inhibits tumor formation." Cancer Res **65**(3): 1007-1017.
- Lowe, H. C., R. G. Fahmy, et al. (2001). "Catalytic oligodeoxynucleotides define a key regulatory role for early growth response factor-1 in the porcine model of coronary in-stent restenosis." Circ Res **89**(8): 670-677.
- Luger, K., T. J. Rechsteiner, et al. (1997). "Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria." J Mol Biol **272**(3): 301-311.
- Lundergan, C., M. L. Foegh, et al. (1989). "Inhibition of myointimal proliferation of the rat carotid artery by the peptides, angiopeptin and BIM 23034." Atherosclerosis **80**(1): 49-55.
- Luo, J., Z. L. Deng, et al. (2007). "A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system." Nat Protoc **2**(5): 1236-1247.
- Luo, R., S. A. Klumpp, et al. (2011). "Inactivation of CBF/NF-Y in postnatal liver causes hepatocellular degeneration, lipid deposition, and endoplasmic reticulum stress." Sci Rep **1**: 136.
- Macejak, D. G., H. Lin, et al. (1999). "Adenovirus-mediated expression of a ribozyme to c-myb mRNA inhibits smooth muscle cell proliferation and neointima formation in vivo." J Virol **73**(9): 7745-7751.

- Macintyre, G., J. Bailey, et al. (2010). "is-rSNP: a novel technique for in silico regulatory SNP detection." Bioinformatics **26**(18): i524-530.
- Madsen, C. S., C. P. Regan, et al. (1997). "Interaction of CArG elements and a GC-rich repressor element in transcriptional regulation of the smooth muscle myosin heavy chain gene in vascular smooth muscle cells." J Biol Chem **272**(47): 29842-29851.
- Maisel, W. H. (2007). "Unanswered questions--drug-eluting stents and the risk of late thrombosis." N Engl J Med **356**(10): 981-984.
- Maity, A., W. G. McKenna, et al. (1995). "Evidence for post-transcriptional regulation of cyclin B1 mRNA in the cell cycle and following irradiation in HeLa cells." EMBO J **14**(3): 603-609.
- Maity, A., W. G. McKenna, et al. (1997). "Cyclin A message stability varies with the cell cycle." Cell Growth Differ **8**(3): 311-318.
- Majesky, M. W., M. J. Daemen, et al. (1990). "Alpha 1-adrenergic stimulation of platelet-derived growth factor A-chain gene expression in rat aorta." J Biol Chem **265**(2): 1082-1088.
- Malumbres, M. (2011). "Physiological relevance of cell cycle kinases." Physiol Rev **91**(3): 973-1007.
- Mamotte, C. D., F. M. van Bockxmeer, et al. (1998). "Pla1/a2 polymorphism of glycoprotein IIIa and risk of coronary artery disease and restenosis following coronary angioplasty." Am J Cardiol **82**(1): 13-16.
- Manari, A., P. Ortolani, et al. (2011). "Long-term outcomes with cobalt-chromium bare-metal vs. drug-eluting stents: the REgistro regionale AngiopLastiche dell'Emilia-Romagna registry." J Cardiovasc Med (Hagerstown) **12**(2): 102-109.
- Mandinov, L., A. Mandinova, et al. (2003). "Copper chelation represses the vascular response to injury." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(11): 6700-6705.
- Manni, I., G. Caretti, et al. (2008). "Posttranslational regulation of NF-YA modulates NF-Y transcriptional activity." Mol Biol Cell **19**(12): 5203-5213.
- Manni, I., G. Mazzaro, et al. (2001). "NF-Y mediates the transcriptional inhibition of the cyclin B1, cyclin B2, and cdc25C promoters upon induced G2 arrest." J Biol Chem **276**(8): 5570-5576.
- Manni, I., P. Tunici, et al. (2002). "Mxi1 inhibits the proliferation of U87 glioma cells through down-regulation of cyclin B1 gene expression." Br J Cancer **86**(3): 477-484.
- Manolio, T. A., F. S. Collins, et al. (2009). "Finding the missing heritability of complex diseases." Nature **461**(7265): 747-753.
- Mantovani, R. (1998). "A survey of 178 NF-Y binding CCAAT boxes." Nucleic Acids Res **26**(5): 1135-1143.
- Mantovani, R. (1999). "The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y." Gene **239**(1): 15-27.
- Mantovani, R., X. Y. Li, et al. (1994). "Dominant negative analogs of NF-YA." J Biol Chem **269**(32): 20340-20346.
- Marenberg, M. E., N. Risch, et al. (1994). "Genetic susceptibility to death from coronary heart disease in a study of twins." N Engl J Med **330**(15): 1041-1046.
- Martinez-Gonzalez, J. and L. Badimon (1996). "Human and porcine smooth muscle cells share similar proliferation dependence on the mevalonate

- pathway: implication for in vivo interventions in the porcine model." Eur J Clin Invest **26**(11): 1023-1032.
- Marx, S. O. and A. R. Marks (2001). "Bench to bedside: the development of rapamycin and its application to stent restenosis." Circulation **104**(8): 852-855.
- Marx, S. O., H. Totary-Jain, et al. (2011). "Vascular smooth muscle cell proliferation in restenosis." Circ Cardiovasc Interv **4**(1): 104-111.
- Marziali, G., E. Perrotti, et al. (1997). "Transcriptional regulation of the ferritin heavy-chain gene: the activity of the CCAAT binding factor NF-Y is modulated in heme-treated Friend leukemia cells and during monocyte-to-macrophage differentiation." Mol Cell Biol **17**(3): 1387-1395.
- Matsushita, H., R. Morishita, et al. (2000). "Transfection of antisense p53 tumor suppressor gene oligodeoxynucleotides into rat carotid artery results in abnormal growth of vascular smooth muscle cells." Circulation **101**(12): 1447-1452.
- Matsushita, T., K. Ashikawa, et al. (2010). "Functional SNP of ARHGEF10 confers risk of atherothrombotic stroke." Hum Mol Genet **19**(6): 1137-1146.
- Mattmann, M. E., S. L. Stoops, et al. (2011). "Inhibition of Akt with small molecules and biologics: historical perspective and current status of the patent landscape." Expert Opin Ther Pat **21**(9): 1309-1338.
- Matuoka, K. and K. Y. Chen (2000). "Possible role of subunit A of nuclear factor Y (NF-YA) in normal human diploid fibroblasts during senescence." Biogerontology **1**(3): 261-271.
- McDermott, M. M. and D. M. Lloyd-Jones (2009). "The role of biomarkers and genetics in peripheral arterial disease." J Am Coll Cardiol **54**(14): 1228-1237.
- McNabb, D. S., Y. Xing, et al. (1995). "Cloning of yeast HAP5: a novel subunit of a heterotrimeric complex required for CCAAT binding." Genes Dev **9**(1): 47-58.
- Medley, T. L., B. A. Kingwell, et al. (2003). "Matrix metalloproteinase-3 genotype contributes to age-related aortic stiffening through modulation of gene and protein expression." Circ Res **92**(11): 1254-1261.
- Mendoza, M. C., E. E. Er, et al. (2011). "The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation." Trends Biochem Sci **36**(6): 320-328.
- Menssen, A. and H. Hermeking (2002). "Characterization of the c-MYC-regulated transcriptome by SAGE: identification and analysis of c-MYC target genes." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(9): 6274-6279.
- Merino-Ibarra, E., M. Artieda, et al. (2005). "Ultrasonography for the evaluation of visceral fat and the metabolic syndrome." Metabolism **54**(9): 1230-1235.
- Minuzzo, M., S. Marchini, et al. (2000). "Interference of transcriptional activation by the antineoplastic drug ecteinascidin-743." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6780-6784.
- Mondy, J. S., V. Lindner, et al. (1997). "Platelet-derived growth factor ligand and receptor expression in response to altered blood flow in vivo." Circ Res **81**(3): 320-327.

- Monraats, P. S., F. de Vries, et al. (2006). "Inflammation and apoptosis genes and the risk of restenosis after percutaneous coronary intervention." Pharmacogenet Genomics **16**(10): 747-754.
- Monraats, P. S., F. A. Kurreeman, et al. (2007). "Interleukin 10: a new risk marker for the development of restenosis after percutaneous coronary intervention." Genes Immun **8**(1): 44-50.
- Monraats, P. S., N. M. Pires, et al. (2005). "Genetic inflammatory factors predict restenosis after percutaneous coronary interventions." Circulation **112**(16): 2417-2425.
- Monraats, P. S., N. M. Pires, et al. (2005). "Tumor necrosis factor-alpha plays an important role in restenosis development." FASEB J **19**(14): 1998-2004.
- Monraats, P. S., R. P. A. W, et al. (2004). "Genetic predictive factors in restenosis." Pathol Biol (Paris) **52**(4): 186-195.
- Morgan, D. O. (1995). "Principles of CDK regulation." Nature **374**(6518): 131-134.
- Morice, M. C., P. W. Serruys, et al. (2002). "A randomized comparison of a sirolimus-eluting stent with a standard stent for coronary revascularization." N Engl J Med **346**(23): 1773-1780.
- Morikawa, S., W. Takabe, et al. (2004). "Global analysis of RNA expression profile in human vascular cells treated with statins." J Atheroscler Thromb **11**(2): 62-72.
- Morishita, R., G. H. Gibbons, et al. (1994). "Intimal hyperplasia after vascular injury is inhibited by antisense cdk 2 kinase oligonucleotides." J Clin Invest **93**(4): 1458-1464.
- Morishita, R., G. H. Gibbons, et al. (1993). "Single intraluminal delivery of antisense cdc2 kinase and proliferating-cell nuclear antigen oligonucleotides results in chronic inhibition of neointimal hyperplasia." Proc Natl Acad Sci USA **90**(18): 8474-8478.
- Morishita, R., G. H. Gibbons, et al. (1994). "Pharmacokinetics of antisense oligodeoxyribonucleotides (cyclin B1 and CDC 2 kinase) in the vessel wall in vivo: enhanced therapeutic utility for restenosis by HVJ-liposome delivery." Gene **149**(1): 13-19.
- Morrison, D. A., G. Sethi, et al. (2001). "Percutaneous coronary intervention versus coronary artery bypass graft surgery for patients with medically refractory myocardial ischemia and risk factors for adverse outcomes with bypass: a multicenter, randomized trial. Investigators of the Department of Veterans Affairs Cooperative Study #385, the Angina With Extremely Serious Operative Mortality Evaluation (AWESOME)." J Am Coll Cardiol **38**(1): 143-149.
- Moses, J. W., M. B. Leon, et al. (2003). "Sirolimus-eluting stents versus standard stents in patients with stenosis in a native coronary artery." N Engl J Med **349**(14): 1315-1323.
- Moussa, I., M. B. Leon, et al. (2004). "Impact of sirolimus-eluting stents on outcome in diabetic patients: a SIRIUS (SIRollmUS-coated Bx Velocity balloon-expandable stent in the treatment of patients with de novo coronary artery lesions) substudy." Circulation **109**(19): 2273-2278.
- Muller, G. A. and K. Engeland (2010). "The central role of CDE/CHR promoter elements in the regulation of cell cycle-dependent gene transcription." FEBS J **277**(4): 877-893.

- Murrell, M., L. Khachigian, et al. (2007). "The role of c-jun in PDTC-sensitive flow-dependent restenosis after angioplasty and stenting." Atherosclerosis **194**(2): 364-371.
- Murrell, M., L. M. Khachigian, et al. (2011). "Divergent roles of NF-kappaB and Egr-1 in flow-dependent restenosis after angioplasty and stenting." Atherosclerosis **214**(1): 65-72.
- Murthy, S. N., S. Sukhanov, et al. (2009). "Insulin glargine reduces carotid intimal hyperplasia after balloon catheter injury in Zucker fatty rats possibly by reduction in oxidative stress." Mol Cell Biochem **330**(1-2): 1-8.
- Musacchio, A. (2011). "Spindle assembly checkpoint: the third decade." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **366**(1584): 3595-3604.
- Muslin, A. J. (2008). "MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets." Clin Sci (Lond) **115**(7): 203-218.
- Nabel, E. G., Z. Yang, et al. (1993). "Recombinant platelet-derived growth factor B gene expression in porcine arteries induce intimal hyperplasia in vivo." J Clin Invest **91**(4): 1822-1829.
- Nagahama, Y. and M. Yamashita (2008). "Regulation of oocyte maturation in fish." Dev Growth Differ **50 Suppl 1**: S195-219.
- Nakamura, T., R. Morishita, et al. (2002). "Molecular strategy using cis-element 'decoy' of E2F binding site inhibits neointimal formation in porcine balloon-injured coronary artery model." Gene Ther **9**(8): 488-494.
- Nakata, Y., S. Shetzline, et al. (2007). "c-Myb contributes to G2/M cell cycle transition in human hematopoietic cells by direct regulation of cyclin B1 expression." Mol Cell Biol **27**(6): 2048-2058.
- Natarajan, M. K., B. H. Strauss, et al. (2012). "Randomized trial of insulin versus usual care in reducing restenosis after coronary intervention in patients with diabetes. the STent Restenosis And Metabolism (STREAM) study." Cardiovasc Revasc Med.
- Negoro, N., Y. Kanayama, et al. (1995). "Blood pressure regulates platelet-derived growth factor A-chain gene expression in vascular smooth muscle cells in vivo. An autocrine mechanism promoting hypertensive vascular hypertrophy." J Clin Invest **95**(3): 1140-1150.
- Neugebauer, P., M. Goldbergova-Pavkova, et al. (2009). "Nuclear receptors gene polymorphisms and risk of restenosis and clinical events following coronary stenting." Vnitr Lek **55**(12): 1135-1140.
- Niccoli, G., R. A. Montone, et al. (2010). "The evolving role of inflammatory biomarkers in risk assessment after stent implantation." J Am Coll Cardiol **56**(22): 1783-1793.
- Nigg, E. A. (2001). "Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(1): 21-32.
- Niida, A., A. D. Smith, et al. (2008). "Integrative bioinformatics analysis of transcriptional regulatory programs in breast cancer cells." BMC Bioinformatics **9**: 404.
- Nomiyama, T., T. Nakamachi, et al. (2006). "The NR4A orphan nuclear receptor NOR1 is induced by platelet-derived growth factor and mediates vascular smooth muscle cell proliferation." J Biol Chem **281**(44): 33467-33476.

- Nomiyama, T., Y. Zhao, et al. (2009). "Deficiency of the NR4A neuron-derived orphan receptor-1 attenuates neointima formation after vascular injury." Circulation **119**(4): 577-586.
- Norbury, C. and P. Nurse (1992). "Animal cell cycles and their control." Annu Rev Biochem **61**: 441-470.
- O'Sullivan, M., S. D. Scott, et al. (2003). "Differential cyclin E expression in human in-stent stenosis smooth muscle cells identifies targets for selective anti-restenosis therapy." Cardiovasc Res **60**(3): 673-683.
- Ohno, Y., A. Hattori, et al. (2011). "Multiple NF-Y-binding CCAAT boxes are essential for transcriptional regulation of the human C7orf24 gene, a novel tumor-associated gene." FEBS J **278**(21): 4088-4099.
- Oishi, Y., I. Manabe, et al. (2010). "Regulatory polymorphism in transcription factor KLF5 at the MEF2 element alters the response to angiotensin II and is associated with human hypertension." FASEB J **24**(6): 1780-1788.
- Olferiev, M., E. Masuda, et al. (2007). "The role of activating protein 1 in the transcriptional regulation of the human FCGR2B promoter mediated by the -343 G -> C polymorphism associated with systemic lupus erythematosus." J Biol Chem **282**(3): 1738-1746.
- Orlando, V. (2000). "Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehyde-crosslinked-chromatin immunoprecipitation." Trends Biochem Sci **25**(3): 99-104.
- Park, S. H., G. R. Yu, et al. (2007). "NF-Y-dependent cyclin B2 expression in colorectal adenocarcinoma." Clin Cancer Res **13**(3): 858-867.
- Pelliccia, F., C. Cianfrocca, et al. (2010). "Role of endothelial progenitor cells in restenosis and progression of coronary atherosclerosis after percutaneous coronary intervention: a prospective study." JACC Cardiovasc Interv **3**(1): 78-86.
- Peter, M., C. Le Peuch, et al. (2002). "Initial activation of cyclin-B1-cdc2 kinase requires phosphorylation of cyclin B1." EMBO Rep **3**(6): 551-556.
- Piaggio, G., A. Farina, et al. (1995). "Structure and growth-dependent regulation of the human cyclin B1 promoter." Exp Cell Res **216**(2): 396-402.
- Pickering, J. G., S. Uniyal, et al. (1997). "Fibroblast growth factor-2 potentiates vascular smooth muscle cell migration to platelet-derived growth factor: upregulation of alpha2beta1 integrin and disassembly of actin filaments." Circ Res **80**(5): 627-637.
- Pilkinton, M., R. Sandoval, et al. (2007). "Mip/LIN-9 regulates the expression of B-Myb and the induction of cyclin A, cyclin B, and CDK1." J Biol Chem **282**(1): 168-175.
- Pines, J. (2006). "Mitosis: a matter of getting rid of the right protein at the right time." Trends Cell Biol **16**(1): 55-63.
- Pires, N. M., T. W. Pols, et al. (2007). "Activation of nuclear receptor Nur77 by 6-mercaptopurine protects against neointima formation." Circulation **115**(4): 493-500.
- Platz, J., M. Grassi, et al. (2007). "Effects of various promoter derived sequences on the cleavage kinetic of an hammerhead ribozyme directed against cyclin E1 mRNA." Drug Metab Lett **1**(3): 218-225.
- Plet, A., X. Huet, et al. (1997). "Relief of cyclin A gene transcriptional inhibition during activation of human primary T lymphocytes via CD2 and CD28 adhesion molecules." Oncogene **14**(21): 2575-2583.

- Polager, S. and D. Ginsberg (2008). "E2F - at the crossroads of life and death." Trends Cell Biol **18**(11): 528-535.
- Ponomarenko, J. V., G. V. Orlova, et al. (2002). "rSNP\_Guide: an integrated database-tools system for studying SNPs and site-directed mutations in transcription factor binding sites." Hum Mutat **20**(4): 239-248.
- Pons, D., P. S. Monraats, et al. (2007). "The influence of established genetic variation in the haemostatic system on clinical restenosis after percutaneous coronary interventions." Thromb Haemost **98**(6): 1323-1328.
- Poon, M., S. O. Marx, et al. (1996). "Rapamycin inhibits vascular smooth muscle cell migration." J Clin Invest **98**(10): 2277-2283.
- Popma, J. J., N. B. De Cesare, et al. (1993). "Quantitative analysis of factors influencing late lumen loss and restenosis after directional coronary atherectomy." Am J Cardiol **71**(7): 552-557.
- Porter, L. A. and D. J. Donoghue (2003). "Cyclin B1 and CDK1: nuclear localization and upstream regulators." Prog Cell Cycle Res **5**: 335-347.
- Prisco, D., S. Fedi, et al. (2001). "Postprocedural PAI-1 activity is a risk marker of subsequent clinical restenosis in patients both with and without stent implantation after elective balloon PTCA." Thromb Res **104**(3): 181-186.
- Raines, E. W. (2004). "PDGF and cardiovascular disease." Cytokine Growth Factor Rev **15**(4): 237-254.
- Ranganna, K., Z. Yousefipour, et al. (2003). "Gene expression profile of butyrate-inhibited vascular smooth muscle cell proliferation." Mol Cell Biochem **254**(1-2): 21-36.
- Rassool, F. V., P. S. North, et al. (2003). "Constitutive DNA damage is linked to DNA replication abnormalities in Bloom's syndrome cells." Oncogene **22**(54): 8749-8757.
- Rathore, S., M. Terashima, et al. (2009). "Predictors of angiographic restenosis after drug eluting stents in the coronary arteries: contemporary practice in real world patients." EuroIntervention **5**(3): 349-354.
- Rauchhaus, M., M. Gross, et al. (2002). "The E-selectin SER128ARG gene polymorphism and restenosis after successful coronary angioplasty." Int J Cardiol **83**(3): 249-257.
- Reed, S. I. (2003). "Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover." Nat Rev Mol Cell Biol **4**(11): 855-864.
- Rittersma, S. Z., R. J. de Winter, et al. (2004). "Preprocedural C-reactive protein is not associated with angiographic restenosis or target lesion revascularization after coronary artery stent placement." Clin Chem **50**(9): 1589-1596.
- Robinson, K. A., N. A. Chronos, et al. (1997). "Endoluminal local delivery of PCNA/cdc2 antisense oligonucleotides by porous balloon catheter does not affect neointima formation or vessel size in the pig coronary artery model of postangioplasty restenosis." Cathet Cardiovasc Diagn **41**(3): 348-353.
- Roeder, R. G. (1996). "The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II." Trends Biochem Sci **21**(9): 327-335.
- Romier, C., F. Cocchiarella, et al. (2003). "The NF-YB/NF-YC structure gives insight into DNA binding and transcription regulation by CCAAT factor NF-Y." J Biol Chem **278**(2): 1336-1345.

- Rother, K., Y. Y. Li, et al. (2007). "Expression of cyclin-dependent kinase subunit 1 (Cks1) is regulated during the cell cycle by a CDE/CHR tandem element and is downregulated by p53 but not by p63 or p73." Cell Cycle **6**(7): 853-862.
- Roy, P., T. Okabe, et al. (2007). "Correlates of clinical restenosis following intracoronary implantation of drug-eluting stents." Am J Cardiol **100**(6): 965-969.
- Rudez, G., D. Pons, et al. (2008). "Platelet receptor P2RY12 haplotypes predict restenosis after percutaneous coronary interventions." Hum Mutat **29**(3): 375-380.
- Ruef, J., A. S. Meshel, et al. (1999). "Flavopiridol inhibits smooth muscle cell proliferation in vitro and neointimal formation In vivo after carotid injury in the rat." Circulation **100**(6): 659-665.
- Ruiz-Ortega, M., O. Lorenzo, et al. (2000). "Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms." Circ Res **86**(12): 1266-1272.
- Rutherford, C., W. Martin, et al. (1997). "Substantial inhibition of neo-intimal response to balloon injury in the rat carotid artery using a combination of antibodies to platelet-derived growth factor-BB and basic fibroblast growth factor." Atherosclerosis **130**(1-2): 45-51.
- Safe, S. and M. Abdelrahim (2005). "Sp transcription factor family and its role in cancer." Eur J Cancer **41**(16): 2438-2448.
- Salsi, V., G. Caretti, et al. (2003). "Interactions between p300 and multiple NF-Y trimers govern cyclin B2 promoter function." J Biol Chem **278**(9): 6642-6650.
- Santamaria, D. and S. Ortega (2006). "Cyclins and CDKS in development and cancer: lessons from genetically modified mice." Front Biosci **11**: 1164-1188.
- Santoian, E. D., J. E. Schneider, et al. (1993). "Angiopeptin inhibits intimal hyperplasia after angioplasty in porcine coronary arteries." Circulation **88**(1): 11-14.
- Sanz-Gonzalez, S. M., L. Barquin, et al. (2007). "Increased p53 gene dosage reduces neointimal thickening induced by mechanical injury but has no effect on native atherosclerosis." Cardiovasc Res **75**(4): 803-812.
- Sarafan-Vasseur, N., A. Lamy, et al. (2002). "Overexpression of B-type cyclins alters chromosomal segregation." Oncogene **21**(13): 2051-2057.
- Sata, M., A. Saiura, et al. (2002). "Hematopoietic stem cells differentiate into vascular cells that participate in the pathogenesis of atherosclerosis." Nat Med **8**(4): 403-409.
- Sata, M., A. Takahashi, et al. (2002). "Mouse genetic evidence that tranilast reduces smooth muscle cell hyperplasia via a p21(WAF1)-dependent pathway." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(8): 1305-1309.
- Sato, Y., R. Hamanaka, et al. (1991). "The stimulatory effect of PDGF on vascular smooth muscle cell migration is mediated by the induction of endogenous basic FGF." Biochem Biophys Res Commun **174**(3): 1260-1266.
- Sciortino, S., A. Gurtner, et al. (2001). "The cyclin B1 gene is actively transcribed during mitosis in HeLa cells." EMBO Rep **2**(11): 1018-1023.
- Schatz, R. A., J. C. Palmaz, et al. (1987). "Balloon-expandable intracoronary stents in the adult dog." Circulation **76**(2): 450-457.

- Seo, H. R., J. Kim, et al. (2008). "Cdk5-mediated phosphorylation of c-Myc on Ser-62 is essential in transcriptional activation of cyclin B1 by cyclin G1." *J Biol Chem* **283**(23): 15601-15610.
- Serra, E., K. Zemzoumi, et al. (1998). "Conservation and divergence of NF-Y transcriptional activation function." *Nucleic Acids Res* **26**(16): 3800-3805.
- Sharif, F., S. O. Hynes, et al. (2008). "Gene-eluting stents: adenovirus-mediated delivery of eNOS to the blood vessel wall accelerates re-endothelialization and inhibits restenosis." *Mol Ther* **16**(10): 1674-1680.
- Shaulian, E. and M. Karin (2001). "AP-1 in cell proliferation and survival." *Oncogene* **20**(19): 2390-2400.
- Shaulian, E. and M. Karin (2002). "AP-1 as a regulator of cell life and death." *Nat Cell Biol* **4**(5): E131-136.
- Shi, Q., X. Le, et al. (2001). "Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma." *Cancer Res* **61**(10): 4143-4154.
- Sigwart, U., J. Puel, et al. (1987). "Intravascular stents to prevent occlusion and restenosis after transluminal angioplasty." *N Engl J Med* **316**(12): 701-706.
- Simsek, C., M. Magro, et al. (2010). "The unrestricted use of sirolimus- and paclitaxel-eluting stents results in better clinical outcomes during 6-year follow-up than bare-metal stents: an analysis of the RESEARCH (Rapamycin-Eluting Stent Evaluated At Rotterdam Cardiology Hospital) and T-SEARCH (Taxus-Stent Evaluated At Rotterdam Cardiology Hospital) registries." *JACC Cardiovasc Interv* **3**(10): 1051-1058.
- Singh, M., B. J. Gersh, et al. (2004). "Clinical and angiographic predictors of restenosis after percutaneous coronary intervention: insights from the Prevention of Restenosis With Tranilast and Its Outcomes (PRESTO) trial." *Circulation* **109**(22): 2727-2731.
- Sinha, S., I. S. Kim, et al. (1996). "Three classes of mutations in the A subunit of the CCAAT-binding factor CBF delineate functional domains involved in the three-step assembly of the CBF-DNA complex." *Mol Cell Biol* **16**(1): 328-337.
- Sinha, S., S. N. Maity, et al. (1995). "Recombinant rat CBF-C, the third subunit of CBF/NFY, allows formation of a protein-DNA complex with CBF-A and CBF-B and with yeast HAP2 and HAP3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(5): 1624-1628.
- Sitwala, K. V., K. Adams, et al. (2002). "YY1 and NF-Y binding sites regulate the transcriptional activity of the dek and dek-can promoter." *Oncogene* **21**(57): 8862-8870.
- Sjin, R. M., K. Krishnaraju, et al. (2002). "Transcriptional regulation of myeloid differentiation primary response (MyD) genes during myeloid differentiation is mediated by nuclear factor Y." *Blood* **100**(1): 80-88.
- Sofi, F., B. Giusti, et al. (2011). "Cytochrome P450 2C19\*2 polymorphism and cardiovascular recurrences in patients taking clopidogrel: a meta-analysis." *Pharmacogenomics J* **11**(3): 199-206.
- Sole, X., E. Guino, et al. (2006). "SNPStats: a web tool for the analysis of association studies." *Bioinformatics* **22**(15): 1928-1929.
- Solomon, M. J., P. L. Larsen, et al. (1988). "Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene." *Cell* **53**(6): 937-947.

- Song, Y., C. Zhao, et al. (2008). "Overexpression of cyclin B1 in human esophageal squamous cell carcinoma cells induces tumor cell invasive growth and metastasis." Carcinogenesis **29**(2): 307-315.
- Soucek, L. and G. I. Evan (2010). "The ups and downs of Myc biology." Curr Opin Genet Dev **20**(1): 91-95.
- Sousa, J. E., M. A. Costa, et al. (2001). "Sustained suppression of neointimal proliferation by sirolimus-eluting stents: one-year angiographic and intravascular ultrasound follow-up." Circulation **104**(17): 2007-2011.
- Speidl, W. S., K. M. Katsaros, et al. (2010). "Coronary late lumen loss of drug eluting stents is associated with increased serum levels of the complement components C3a and C5a." Atherosclerosis **208**(1): 285-289.
- Speir, E., R. Modali, et al. (1994). "Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis." Science **265**(5170): 391-394.
- Stefanini, G. G., B. Kalesan, et al. (2012). "Impact of sex on clinical and angiographic outcomes among patients undergoing revascularization with drug-eluting stents." JACC Cardiovasc Interv **5**(3): 301-310.
- Stolker, J. M., K. F. Kennedy, et al. (2010). "Predicting restenosis of drug-eluting stents placed in real-world clinical practice: derivation and validation of a risk model from the EVENT registry." Circ Cardiovasc Interv **3**(4): 327-334.
- Stone, K. E., E. Chiquette, et al. (2007). "Diabetic endovascular disease: role of coronary artery revascularization." Am J Cardiol **99**(4A): 105B-112B.
- Suzuki, H., D. F. Graziano, et al. (2005). "T cell-dependent antibody responses against aberrantly expressed cyclin B1 protein in patients with cancer and premalignant disease." Clin Cancer Res **11**(4): 1521-1526.
- Sylvester, A. M., D. Chen, et al. (1998). "Role of c-fos and E2F in the induction of cyclin A transcription and vascular smooth muscle cell proliferation." J Clin Invest **101**(5): 940-948.
- Syvanen, A. C. (2001). "Assessing genetic variation: genotyping single nucleotide polymorphisms." Nat Rev Genet **2**(12): 930-942.
- Tagne, J. B., S. Gupta, et al. (2012). "Genome-wide analyses of Nkx2-1 binding to transcriptional target genes uncover novel regulatory patterns conserved in lung development and tumors." PLoS One **7**(1): e29907.
- Takahashi, A., T. Taniguchi, et al. (1999). "Tranilast inhibits vascular smooth muscle cell growth and intimal hyperplasia by induction of p21(waf1/cip1/sdi1) and p53." Circ Res **84**(5): 543-550.
- Tanner, F. C., H. Greutert, et al. (2003). "Different cell cycle regulation of vascular smooth muscle in genetic hypertension." Hypertension **42**(2): 184-188.
- Testa, A., G. Donati, et al. (2005). "Chromatin immunoprecipitation (ChIP) on chip experiments uncover a widespread distribution of NF-Y binding CCAAT sites outside of core promoters." J Biol Chem **280**(14): 13606-13615.
- Thomassen, M., Q. Tan, et al. (2008). "Gene expression meta-analysis identifies metastatic pathways and transcription factors in breast cancer." BMC Cancer **8**: 394.
- Tiroch, K., W. Koch, et al. (2009). "P27 and P53 gene polymorphisms and restenosis following coronary implantation of drug-eluting stents." Cardiology **112**(4): 263-269.

- Trembley, J. H., Z. Chen, et al. (2000). "Genomic organization and promoter characterization of the rat cyclin B1 gene." Gene **255**(1): 93-104.
- Trembley, J. H., J. O. Ebbert, et al. (1996). "Differential regulation of cyclin B1 RNA and protein expression during hepatocyte growth in vivo." Cell Growth Differ **7**(7): 903-916.
- Trembley, J. H., B. T. Kren, et al. (1994). "Posttranscriptional regulation of cyclin B messenger RNA expression in the regenerating rat liver." Cell Growth Differ **5**(1): 99-108.
- Tsui, L. V., A. Camrud, et al. (2001). "p27-p16 fusion gene inhibits angioplasty-induced neointimal hyperplasia and coronary artery occlusion." Circ Res **89**(4): 323-328.
- Van Belle, E., K. Abolmaali, et al. (1999). "Restenosis, late vessel occlusion and left ventricular function six months after balloon angioplasty in diabetic patients." J Am Coll Cardiol **34**(2): 476-485.
- van Tiel, C. M., P. I. Bonta, et al. (2009). "p27kip1-838C>A single nucleotide polymorphism is associated with restenosis risk after coronary stenting and modulates p27kip1 promoter activity." Circulation **120**(8): 669-676.
- Varshavsky, A. J., V. V. Bakayev, et al. (1976). "Heterogeneity of chromatin subunits in vitro and location of histone H1." Nucleic Acids Res **3**(2): 477-492.
- Verdaasdonk, J. S. and K. Bloom (2011). "Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation." Nature reviews. Molecular cell biology **12**(5): 320-332.
- Verschuren, J. J., M. L. Sampietro, et al. (2010). "Matrix metalloproteinases 2 and 3 gene polymorphisms and the risk of target vessel revascularization after percutaneous coronary intervention: Is there still room for determining genetic variation of MMPs for assessment of an increased risk of restenosis?" Dis Markers **29**(5): 265-273.
- Villa, A. E., L. A. Guzman, et al. (1995). "Effects of antisense c-myc oligonucleotides on vascular smooth muscle cell proliferation and response to vessel wall injury." Circ Res **76**(4): 505-513.
- Visscher, P. M., M. A. Brown, et al. (2012). "Five years of GWAS discovery." Am J Hum Genet **90**(1): 7-24.
- Visser, M., M. Kayser, et al. (2012). "HERC2 rs12913832 modulates human pigmentation by attenuating chromatin-loop formation between a long-range enhancer and the OCA2 promoter." Genome Res **22**(3): 446-455.
- Volzke, H., R. Grimm, et al. (2004). "Candidate genetic markers and the risk of restenosis after coronary angioplasty." Clin Sci (Lond) **106**(1): 35-42.
- von Beckerath, N., O. von Beckerath, et al. (2005). "P2Y12 gene H2 haplotype is not associated with increased adenosine diphosphate-induced platelet aggregation after initiation of clopidogrel therapy with a high loading dose." Blood Coagul Fibrinolysis **16**(3): 199-204.
- von der Leyen, H. E., A. Mugge, et al. (2011). "A prospective, single-blind, multicenter, dose escalation study of intracoronary iNOS lipoplex (CAR-MP583) gene therapy for the prevention of restenosis in patients with de novo or restenotic coronary artery lesion (REGENT I extension)." Hum Gene Ther **22**(8): 951-958.
- von Essen, R., R. Ostermaier, et al. (1997). "Effects of octreotide treatment on restenosis after coronary angioplasty: results of the VERAS study.

- Verringerung der Restenoserate nach Angioplastie durch ein Somatostatin-analogon." Circulation **96**(5): 1482-1487.
- Wang, J., K. Liu, et al. (2011). "Small interfering RNA to c-myc inhibits vein graft restenosis in a rat vein graft model." J Surg Res **169**(1): e85-91.
- Wang, L., D. Wei, et al. (2003). "Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer." Clin Cancer Res **9**(17): 6371-6380.
- Wang, W., M. C. Caldwell, et al. (2000). "HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation." EMBO J **19**(10): 2340-2350.
- Wasner, M., U. Haugwitz, et al. (2003). "Three CCAAT-boxes and a single cell cycle genes homology region (CHR) are the major regulating sites for transcription from the human cyclin B2 promoter." Gene **312**: 225-237.
- Wasner, M., K. Tschop, et al. (2003). "Cyclin B1 transcription is enhanced by the p300 coactivator and regulated during the cell cycle by a CHR-dependent repression mechanism." FEBS Lett **536**(1-3): 66-70.
- Wei, G. L., K. Krasinski, et al. (1997). "Temporally and spatially coordinated expression of cell cycle regulatory factors after angioplasty." Circ Res **80**(3): 418-426.
- Weintraub, W. S., A. S. Kosinski, et al. (1993). "Can restenosis after coronary angioplasty be predicted from clinical variables?" J Am Coll Cardiol **21**(1): 6-14.
- Welt, F. G., E. R. Edelman, et al. (2000). "Neutrophil, not macrophage, infiltration precedes neointimal thickening in balloon-injured arteries." Arterioscler Thromb Vasc Biol **20**(12): 2553-2558.
- Welt, F. G. and C. Rogers (2002). "Inflammation and restenosis in the stent era." Arterioscler Thromb Vasc Biol **22**(11): 1769-1776.
- Wessely, R. (2010). "New drug-eluting stent concepts." Nat Rev Cardiol **7**(4): 194-203.
- Wheeler, G. L., G. A. Braden, et al. (2002). "Reduced inhibition by abciximab in platelets with the PIA2 polymorphism." Am Heart J **143**(1): 76-82.
- Wierstra, I. (2008). "Sp1: emerging roles--beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes." Biochem Biophys Res Commun **372**(1): 1-13.
- Wijkema, J. S., P. L. van Haelst, et al. (2006). "Restenosis after percutaneous coronary intervention is associated with the angiotensin-II type-1 receptor 1166A/C polymorphism but not with polymorphisms of angiotensin-converting enzyme, angiotensin-II receptor, angiotensinogen or heme oxygenase-1." Pharmacogenet Genomics **16**(5): 331-337.
- Wu, T., X. Zhang, et al. (2010). "Regulation of cyclin B2 expression and cell cycle G2/m transition by menin." J Biol Chem **285**(24): 18291-18300.
- Xing, Y., J. D. Fikes, et al. (1993). "Mutations in yeast HAP2/HAP3 define a hybrid CCAAT box binding domain." EMBO J **12**(12): 4647-4655.
- Yamasaki, Y., K. Miyoshi, et al. (2001). "Weekly dosing with the platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor SU9518 significantly inhibits arterial stenosis." Circ Res **88**(6): 630-636.
- Yang, Z. Y., R. D. Simari, et al. (1996). "Role of the p21 cyclin-dependent kinase inhibitor in limiting intimal cell proliferation in response to arterial injury." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(15): 7905-7910.
- Yano, K. (2012). "Lipid metabolic pathways as lung cancer therapeutic targets: a computational study." Int J Mol Med **29**(4): 519-529.

- Yao, J. C., L. Wang, et al. (2004). "Association between expression of transcription factor Sp1 and increased vascular endothelial growth factor expression, advanced stage, and poor survival in patients with resected gastric cancer." Clin Cancer Res **10**(12 Pt 1): 4109-4117.
- Yasuda, K., T. Kotani, et al. (2010). "Transgenic zebrafish reveals novel mechanisms of translational control of cyclin B1 mRNA in oocytes." Dev Biol **348**(1): 76-86.
- Ye, S. (2006). "Influence of matrix metalloproteinase genotype on cardiovascular disease susceptibility and outcome." Cardiovasc Res **69**(3): 636-645.
- Ye, S., P. Eriksson, et al. (1996). "Progression of coronary atherosclerosis is associated with a common genetic variant of the human stromelysin-1 promoter which results in reduced gene expression." J Biol Chem **271**(22): 13055-13060.
- Yeh, R. W., S. L. Normand, et al. (2011). "Predicting the restenosis benefit of drug-eluting versus bare metal stents in percutaneous coronary intervention." Circulation **124**(14): 1557-1564.
- Yin, X. Y., L. Grove, et al. (2001). "Inverse regulation of cyclin B1 by c-Myc and p53 and induction of tetraploidy by cyclin B1 overexpression." Cancer Res **61**(17): 6487-6493.
- Yonemitsu, Y., Y. Kaneda, et al. (1998). "Transfer of wild-type p53 gene effectively inhibits vascular smooth muscle cell proliferation in vitro and in vivo." Circ Res **82**(2): 147-156.
- You, X. M., I. N. Mungrue, et al. (2003). "Conditional expression of a dominant-negative c-Myb in vascular smooth muscle cells inhibits arterial remodeling after injury." Circ Res **92**(3): 314-321.
- Yu, H., I. Bot, et al. (2012). "Selective modulation of nuclear factor of activated T-cell function in restenosis by a potent bipartite peptide inhibitor." Circ Res **110**(2): 200-210.
- Yu, H., K. Sliedregt-Bol, et al. (2006). "Therapeutic potential of a synthetic peptide inhibitor of nuclear factor of activated T cells as antirestenotic agent." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(7): 1531-1537.
- Yuan, J., A. Kramer, et al. (2006). "Stable gene silencing of cyclin B1 in tumor cells increases susceptibility to taxol and leads to growth arrest in vivo." Oncogene **25**(12): 1753-1762.
- Yuan, J., R. Yan, et al. (2004). "Cyclin B1 depletion inhibits proliferation and induces apoptosis in human tumor cells." Oncogene **23**(34): 5843-5852.
- Yuan, P., L. Wang, et al. (2007). "Therapeutic inhibition of Sp1 expression in growing tumors by mithramycin a correlates directly with potent antiangiogenic effects on human pancreatic cancer." Cancer **110**(12): 2682-2690.
- Yumi, K., J. A. Fagin, et al. (1997). "Direct effects of somatostatin analog octreotide on insulin-like growth factor-I in the arterial wall." Lab Invest **76**(3): 329-338.
- Yun, J., H. D. Chae, et al. (2003). "Cdk2-dependent phosphorylation of the NF-Y transcription factor and its involvement in the p53-p21 signaling pathway." J Biol Chem **278**(38): 36966-36972.
- Yun, J., H. D. Chae, et al. (1999). "p53 negatively regulates cdc2 transcription via the CCAAT-binding NF-Y transcription factor." J Biol Chem **274**(42): 29677-29682.

- Yun, U. J., H. D. Park, et al. (2006). "p53 prevents immature escaping from cell cycle G2 checkpoint arrest through inhibiting cdk2-dependent NF-Y phosphorylation." Cancer Res Treat **38**(4): 224-228.
- Zemzoumi, K., M. Frontini, et al. (1999). "NF-Y histone fold alpha1 helices help impart CCAAT specificity." J Mol Biol **286**(2): 327-337.
- Zhang, M., E. P. Smith, et al. (2002). "Targeted expression of a protease-resistant IGFBP-4 mutant in smooth muscle of transgenic mice results in IGFBP-4 stabilization and smooth muscle hypotrophy." J Biol Chem **277**(24): 21285-21290.
- Zhang, S., J. Lu, et al. (2010). "A variant in the CHEK2 promoter at a methylation site relieves transcriptional repression and confers reduced risk of lung cancer." Carcinogenesis **31**(7): 1251-1258.
- Zhao, Y. and D. Bruemmer (2010). "NR4A orphan nuclear receptors: transcriptional regulators of gene expression in metabolism and vascular biology." Arterioscler Thromb Vasc Biol **30**(8): 1535-1541.
- Zhou, Y. and S. A. Ness (2011). "Myb proteins: angels and demons in normal and transformed cells." Front Biosci **16**: 1109-1131.
- Zhu, B., G. Zhao, et al. (2001). "Targeted overexpression of IGF-I in smooth muscle cells of transgenic mice enhances neointimal formation through increased proliferation and cell migration after intraarterial injury." Endocrinology **142**(8): 3598-3606.
- Zhu, J., Y. Zhang, et al. (2005). "NF-Ya activates multiple hematopoietic stem cell (HSC) regulatory genes and promotes HSC self-renewal." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(33): 11728-11733.
- Zhu, W., P. H. Giangrande, et al. (2004). "E2Fs link the control of G1/S and G2/M transcription." EMBO J **23**(23): 4615-4626.
- Zwicker, J., C. Gross, et al. (1995). "Cell cycle regulation of cdc25C transcription is mediated by the periodic repression of the glutamine-rich activators NF-Y and Sp1." Nucleic Acids Res **23**(19): 3822-3830.
- Zwicker, J., F. C. Lucibello, et al. (1995). "Cell cycle regulation of the cyclin A, cdc25C and cdc2 genes is based on a common mechanism of transcriptional repression." EMBO J **14**(18): 4514-4522.