

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA



**PARTICIPACIÓN DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO EN LA
PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS DE MÚSCULO LISO DE AORTA DE UN
MODELO DE SÍNDROME METABÓLICO**

TESIS

Que para obtener el grado de Doctora en Ciencias Biológicas y de la Salud

P R E S E N T A

M. en Biol. Exp. Ocarol López Acosta

Comité Tutorial:

❖ Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa

❖ Dr. Mohammed El Hafidi Bentlakder

Departamento de Biomedicina Cardiovascular

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

❖ Dra. Angélica Ruiz Ramírez

Departamento de Biomedicina Cardiovascular

Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

Ciudad de México, diciembre de 2019

“El Programa de Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACyT, en el Nivel Consolidado y cuenta con el apoyo del mismo Consejo a través del convenio PFP-20-93”

Número de registro de la beca otorgada por CONACyT: 284105

Este trabajo fue apoyado parcialmente por el proyecto N° 185450 del CONACyT y por el Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF), por el proyecto N° PICDS08-67; Responsable técnico: Dr. Mohammed El Hafidi Bentlakder

El jurado designado por la Comisión Académica del Doctorado en Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada:

“Participación de las especies reactivas de oxígeno en la proliferación de las células de músculo liso de aorta de un modelo de síndrome metabólico”, que presentó:

Ocarol López Acosta

El día 9 de diciembre de 2019.

Jurado de examen:

Presidente: Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar
Departamento de Ciencias de Salud
Universidad Autónoma Metropolitana



Secretaria: Dra. Angélica Ruiz Ramírez
Departamento de Biomedicina Cardiovascular
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”



Vocal: Dr. Mohammed El Hafidi Bentlakder
Departamento de Biomedicina Cardiovascular
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”



Vocal: Dra. María de los Ángeles Fortis Barrera
Departamento de Ciencias de Salud
Universidad Autónoma Metropolitana



Vocal: Dra. Rebeca López Marure
Departamento de Fisiología
Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE DISERTACIÓN PÚBLICA

No. 00053

Matrícula: 2153804394

Participación de especies reactivas de oxígeno en la proliferación de las células de músculo liso de aorta de un modelo de síndrome metabólico.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 9 del mes de diciembre del año 2019 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR
- DRA. MARIA DE LOS ANGELES FORTIS BARRERA
- DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKDER
- DRA. REBECA LOPEZ MARURE
- DRA. ANGELICA RUIZ RAMIREZ



OSCAROL LOPEZ ACOSTA
ALUMNA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, se reunieron a la presentación de la Disertación Pública cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

DE: OSCAROL LOPEZ ACOSTA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción IV del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, el presidente del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

MTRA. ROSALBA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCÍA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTE

DR. FRANCISCO JAVIER ALARCON AGUILAR

VOCAL

DRA. MARIA DE LOS ANGELES FORTIS BARRERA

VOCAL

DR. MOHAMMED EL HAFIDI BENTLAKDER

VOCAL

DRA. REBECA LOPEZ MARURE

SECRETARIA

DRA. ANGELICA RUIZ RAMIREZ

Agradecimientos

Al Posgrado de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma
Metropolitana

Al CONACyT por la beca otorgada N° 284105

Al departamento de Biomedicina Cardiovascular del Instituto Nacional de
Cardiología “Ignacio Chávez” donde se realizó este proyecto

Agradecimientos

A mi comité tutorial integrado por el Dr. Mohammed El Hafidi Bentlakder, el Dr. Francisco Javier Alarcón Aguilar y la Dra. Angélica Ruiz Ramírez, gracias por su tiempo, consejos y por compartir sus conocimientos.

A la Dra. Rebeca López Marure y a la Dra. María de los Ángeles Fortis Barrera gracias por sus observaciones.

Al Dr. Vicente Castrejón Téllez por sus consejos y apoyo.

Dedicatorias

A mi familia por su apoyo y cariño, en especial a mi hijo Diego Mateo por ser mi motivación más grande.

A la Dra. Angélica Ruiz Ramírez porque además de ser mi tutora, es mi amiga y siempre me brindó su apoyo incondicional.

A cada uno de mis amigos por sus consejos y apoyo.

ÍNDICE

1. Abreviaturas y símbolos	1
2. Resumen	5
3. Summary	7
4. Introducción	9
5. Síndrome metabólico (SM)	10
6. Enfermedades cardiovasculares	12
6.1 Hipertensión	13
6.2 Aterosclerosis	14
6.3 Isquemia cardíaca	15
7. Especies reactivas de oxígeno (ERO)	16
8. ERO y enfermedades cardiovasculares	18
8.1 NADPH oxidasa	19
8.2 La mitocondria como fuente de ERO	21
9. La generación de ERO en el SM	23
10. Células de músculo liso vascular (CMLV)	28
10.1 Papel de las CMLV en el tono vascular	29
10.2 ERO y proliferación de las CMLV	32

10.3 Alteración en el fenotipo de las CMLV en enfermedades cardiovasculares	33
.....
10.3.1 Hipertensión	34
10.3.2 Aterosclerosis	34
10.3.3 Restenosis	35
11. Posibles mecanismos de ERO en la proliferación de las CMLV	35
11.1 Cliclofilina A	36
12. Antecedentes	37
12.1 SM y las CMLV	37
12.2 Modelos de SM	38
12.3 Antecedentes del modelo de SM inducido por dieta enriquecida con sacarosa	39
13. Justificación	41
14. Hipótesis	42
15. Objetivo general	42
16. Objetivos particulares	42
17. Metodología	43
17.1 Modelo experimental de SM	43
17.2 Análisis de AGL, TG, glucosa, insulina y leptina	43

17.3 Determinación de la tensión arterial	44
17.4 Cultivo primario de las CMLV	45
17.5 Proliferación celular	45
17.6 Participación de las ERO en la proliferación de las CMLV (inhibición de las fuentes de ERO: NADPH oxidasa y scavengers de O₂⁻)	46
17.7 Análisis de proteínas marcadoras de fenotipo contráctil	47
17.7.1 Obtención de proteína total	47
17.7.2 Western blot	47
17.8 Análisis de la generación de ERO	48
17.9 Análisis estadístico	49
18. Resultados	50
18.1 Características generales de los animales	50
18.2 Proliferación de las CMLV	51
18.3 Participación de ERO en la proliferación de las CMLV	52
18.4 Generación de ERO en las CMLV	54
18.5 Análisis por Western blot de ciclofilina A, receptor de ciclofilina A (CD147) y ERK 1/2	56
18.6 Proteínas de fenotipo contráctil	58
19. Discusión	60

20. Conclusiones	65
21. Perspectivas	65
22. Referencias	66

1. Abreviaturas y símbolos

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AGL	Ácidos grasos libres
AP-1	Proteína activadora 1
AEBSF	Fluoruro de 4- (2-aminoetil) bencenosulfonilo
ATP	Adenosin trifostato
Ang II	Angiotensina II
Apocinina	4'-hidroxi-3'methoxiacetofenona
Bcl-2	Células B de linfoma-2
Bcl-xL	Células B de linfoma-extra grande
[Ca⁺²]_i	Concentración de calcio intracelular
CAT	Catalasa
CD36	Cluster de diferenciación 36
CD147	Cluster de diferenciación 147
CDKs	Cinasas dependientes de ciclinas
Cdc42	Proteína del control de división celular homólogo-42
CE	Células endoteliales
CyPA	Ciclofilina A
CMLV	Células de músculo liso vascular
CTE	Cadena transportadora de electrones
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DPI	Cloruro de difenileneiodonio

ECV	Enfermedades cardiovasculares
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ESC/ESH	Sociedad Europea de Cardiología/Sociedad Europea de Hipertensión
FAD	Flavín adenín dinucleótido
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HNE	4-hidroxi-2 nonenal
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
c-IAP	Proteína inhibidora de apoptosis-c
I-CAM	Molécula de adhesión intercelular 1
IDF	Federación Internacional de Diabetes
IGF	Factor de crecimiento homólogo de insulina
IFN-γ	Interferón gamma
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LEP	Leptina
LOX-1	Receptor de LDL oxidadas-1
MDA	Malondialdehído

MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos-1
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NCEP: ATP III	Programa Nacional de Educación sobre Colesterol en el Panel III para el Tratamiento del Adulto
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NO₂[•]	Dióxido de nitrógeno
Nox	NADPH oxidasa
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
iNOS	Óxido nítrico sintetasa inducible
Nrf2	Factor nuclear 2 relacionado al factor eritroide 2
O₂^{-•}	Radical superóxido
OH[•]	Radical hidroxilo
ON[•]	Óxido nítrico
ONOO⁻	Anión peroxinitrito
8oxodG	7,8-dihidroxi-8-oxo-24'-deoxiguanosina
PA	Presión arterial
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PUFAs	Ácidos grasos poliinsaturados
Q_i	Sitio donde se forma anión superóxido orientado hacia la matriz mitocondrial

Q_o	Sitio donde se forma anión superóxido orientado hacia el espacio intermembranal
RI	Resistencia a la insulina
SM	Síndrome metabólico
SOD Cu/Zn	Superóxido dismutasa de cobre zinc
SOD Mn	Superóxido dismutasa de manganeso
SOH	Ácido Sulfénico
-SOOH	Ácido sulfinico y sulfónico
-SOOOH	Ácido sulfónico
SRA	Receptor scavenger clase A
TG	Triglicéridos
TGFβ	Factor de crecimiento transformante beta
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante-beta 1
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TPx	Tiorredoxina peroxidasa
UQ•	Radical ubisemiquinona
VAMP2	Vesículas de asociación a membrana plasmática
	2
VCAM-1	Moléculas de adhesión de células vasculares-1

2. Resumen

Estudios previos en homogenado de aorta de un modelo de síndrome metabólico (SM) inducido por alto consumo de sacarosa, mostraron marcadores de estrés oxidante aumentados, lo mismo que la actividad de la NADPH oxidasa. Además, en anillos de aorta aislados de animales con SM observó mayor constricción y menor relajación inducidas por epinefrina y acetilcolina respectivamente en comparación con los controles normales. La alteración en la reactividad vascular en los anillos podría asociarse con una disminución en la disponibilidad de óxido nítrico por aumento en la generación especies reactivas de oxígeno (ERO), como el anión superóxido, a nivel de las células del músculo liso vascular (CMLV). El objetivo de este trabajo fue evaluar la generación de ERO y su efecto en la proliferación de las CMLV aisladas de un modelo de SM, así como investigar el posible mecanismo implicado en este proceso. El modelo de SM inducido por el consumo de sacarosa durante 24 semanas mostró aumentos estadísticamente significativos de la presión sanguínea diastólica y sistólica, triglicéridos (TG), tejido adiposo intraabdominal, insulina y leptina en plasma. La proliferación de las CMLV se evaluó cuantificando la cantidad de ácido desoxirribonucleico (ADN) mediante fluorescencia, usando el 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Se observó que las CMLV aisladas del modelo de SM tienen un rango de proliferación mayor en comparación con las células aisladas de animales normales. La preincubación de las CMLV con compuestos como el cloruro de difenileneiodonio (DPI) y la apocinina (inhibidores de la NADPH oxidasa), así como el tempol (un atrapador de anión superóxido y mimetizador de la superóxido dismutasa), redujo en todos los casos de forma estadísticamente significativa la proliferación de células aisladas de animales con SM y normales,

sugiriendo la participación del anión superóxido generado a nivel de la NADPH oxidasa como posible mecanismo de proliferación. En cuanto a la participación de las ERO generadas a nivel mitocondrial, se utilizó el mitotempo, el cual funciona como atrapador de anión superóxido. Resultando en disminución en la proliferación celular de manera estadísticamente significativa sólo en las CMLV aisladas del modelo de SM. Estos resultados sugieren que las ERO mitocondriales son responsables de la diferencia en el rango de proliferación entre CMLV aisladas de animales controles y con SM.

En cuanto a las proteínas CD147 (cluster de diferenciación 147) y ciclofilina A, involucradas en el posible mecanismo de proliferación, se observó un aumento en condiciones de no confluencia en células aisladas del modelo de SM.

El análisis por Western blot de las proteínas de fenotipo contráctil, tales como α -actina, caldesmona y la cadena ligera de miosina fosforilada, indican que su contenido disminuye en las CMLV en fase de crecimiento y aumenta cuando están confluentes, indicando que recuperan su fenotipo contráctil, siendo menor el contenido de algunas proteínas en las CMLV aisladas del modelo de SM.

Nuestros resultados sugieren que las CMLV aisladas del modelo de SM tienen una mayor proliferación y que las ERO participan de manera importante en este mecanismo, ya que al inhibir la generación de ERO, la proliferación disminuye de manera significativa.

3. Summary

Previous studies conducted in aorta homogenate from an animal model of metabolic syndrome (MS) induced by a high sucrose intake, have shown that oxidative stress markers are increased, as well as the activity of NADPH oxidase. In addition, in rings of aorta isolated from animals with MS, higher constriction and lower relaxation induced by epinephrine and acetylcholine, respectively, were observed compared to controls. The alteration in the vascular reactivity observed in the rings could be due to a decrease in the availability of nitric oxide due to an increased generation of superoxide anion at the level of the vascular smooth muscle cells (VSMC). This work was undertaken to evaluate the generation and the role of reactive species of oxygen (ROS) on the proliferation of VSMC isolated from an MS model and the possible mechanism involved in this process.

The MS model induced with sucrose for 24 weeks showed statistically significant increases in diastolic and systolic blood pressure, triglycerides (TG), intraabdominal adipose tissue, insulin and plasma leptin. The proliferation of VSMC was evaluated by quantifying the amount of deoxyribonucleic acid (DNA) by fluorescence, using DAPI (4, 6-diamino-2-phenylindole). It was observed that VSMC isolated from the MS model have a higher proliferation range as compared to cells isolated from control animals. The preincubation of VSMC with compounds such as diphenylenedimethylchloride (DPI) and apocynin (an inhibitors of NADPH oxidase), as well as tempol (a superoxide anion scavenger and superoxide dismutase mimic), significantly reduced the proliferation of cells isolated from both MS and control animals, suggesting the participation of superoxide anion generated at the level of NADPH oxidase. Regarding the participation of the ROS generated by mitochondria,

mito-tempo was used as a superoxide anion scavenger. Thus mito-tempo significantly inhibited VSMC proliferation only isolated from the MS model. These results suggest that mitochondrial ROS also participate in VSMC proliferation. The ROS induced VSMC proliferation is associated with CD147 (cluster of differentiation 147) and cyclophilin A that were found increased in cells isolated from the MS model in both confluent and of non-confluent conditions and may be involved in the possible mechanism in the increased cell proliferation from MS model.

Western blot analysis of contractile phenotype proteins, such as α -actin, caldesmone and light chain myosin phosphorylation, indicate that their content decreases in the VSMC during the growth phase and increases when they are in confluent state, indicating that VSMC recuperate their contractile phenotype. In addition, the content of some proteins of contractile phenotype such as the phosphorylated light chain myosin and caldesmone are found lower in VSMC isolated from MS model as compared with control.

Our results suggest that VSMC isolated from the MS model have a greater range of proliferation and that ROS generated at NADPH oxidase and mitochondria participate in this mechanism, since the inhibition ROS generation significantly decreases the cell proliferation.

4. Introducción

En condiciones fisiológicas las células de músculo liso (CMLV) se definen por su fenotipo contráctil no proliferativo y juegan un papel primordial no únicamente estructural sino también en la regulación del tono vascular. En condiciones patológicas la proliferación de las CMLV de las arterias implica un mecanismo que se relaciona con un cambio del fenotipo contráctil a un fenotipo proliferativo o sintético, caracterizado por disminución en el contenido de proteínas contráctiles (α -actina, cadena ligera de miosina fosforilada y caldesmona) y aumento en la producción de proteínas de la matriz extracelular, que contribuyen al desarrollo de estenosis arterial en la aterosclerosis, a la remodelación arterial y al desarrollo de hipertensión arterial, entre otras patologías [1].

El síndrome metabólico (SM) es considerado un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares y diabetes tipo 2. Este padecimiento cursa con estrés oxidante a distintos niveles, el cual puede ser favorecido por la lipotoxicidad presente. Los ácidos grasos libres (AGL) son moléculas que pueden favorecer el estrés oxidante ya que afectan la función mitocondrial, así como la actividad NADPH-oxidasa, induciendo aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) [2].

Las ERO a bajas concentraciones se consideran moléculas de señalización o segundos mensajeros que influyen en la transducción de señales en diferentes sistemas biológicos, como por ejemplo en el sistema cardiovascular. Sin embargo, a altas concentraciones están catalogadas como moléculas nocivas [3].

En las CMLV, la NADPH oxidasa y la mitocondria son las principales fuentes generadoras del radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) [4] que, junto con otras ERO como el

peróxido de hidrógeno (H_2O_2), están involucradas en diferentes procesos fisiológicos y patológicos, tales como la diferenciación, proliferación y apoptosis, así como la secreción de proteínas inflamatorias y de matriz extracelular [5].

El mecanismo por el cual las ERO inducen cambios en el fenotipo contráctil de las CMLV no está del todo establecido, sin embargo, la secreción de la ciclofilina A del medio intracelular al medio extracelular inducida por el aumento de las ERO está implicada en el mecanismo de proliferación de las CMLV [6]. Estudios previos de nuestro grupo de trabajo muestran que en homogenado de aorta de un modelo de SM inducido por el alto consumo de sacarosa, los marcadores de estrés oxidante se encuentran aumentados, de igual manera que la actividad de la NADPH oxidasa [7]. Este modelo desarrolla hiperlipidemia, que se refleja en un aumento de AGL, además de hiperleptinemia y estrés oxidante. Por lo tanto, el propósito de este trabajo fue investigar la participación de las ERO en el cambio de fenotipo contráctil a fenotipo proliferativo en las CMLV de un modelo experimental de SM y el papel que juegan tanto la mitocondria como la NADPH oxidasa como fuentes de ERO en este proceso.

5. Síndrome metabólico

El SM fue descrito por Reaven en 1988 como “síndrome X”, el cual incluía patologías como resistencia a la insulina (RI), hiperglicemia, hipertensión, disminución de colesterol HDL y aumento de triglicéridos. En 1998 fue aceptado el concepto de SM, al cual se le incluyó como otro factor de riesgo importante la obesidad y fue considerado desde ese momento como un factor de riesgo para el desarrollo de diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares [8]. En años posteriores, varias

definiciones han sido propuestas, aunque las más utilizadas para el diagnóstico clínico son las establecidas por el Programa Nacional de Educación sobre Colesterol en el Panel III para el Tratamiento del Adulto (NCEP: ATP III por sus siglas en inglés) y la Federación Internacional de Diabetes (IDF) [9, 10].

En 2001, el NCEP: ATP III definió el SM como la presencia en un paciente de al menos tres de las siguientes alteraciones clínicas [11]:

- Obesidad abdominal (circunferencia de la cintura ≥ 102 cm en hombres y > 88 cm en mujeres).
- Triglicéridos ≥ 150 mg/dL.
- Colesterol HDL < 40 mg/dL en hombres y < 50 mg/dL en mujeres.
- Presión arterial (PA) $\geq 130/ \geq 85$ mm Hg.
- Glucosa ≥ 110 mg/dL.

En 2005 la IDF propuso nuevos criterios similares a los del NCEP:ATPIII, considerando a la obesidad abdominal como un factor necesario para el diagnóstico del SM, la cual está asociada con RI [12]. Además, recomendó criterios adicionales, como: biomarcadores de tejido adiposo debido a su asociación con enfermedades cardiovasculares (adiponectina y leptina), apolipoproteína B, lipoproteínas de baja densidad (LDL), proteínas circulantes derivadas de la disfunción endotelial (citocinas, moléculas de adhesión intercelular y moléculas de adhesión vascular), albúmina urinaria, marcadores inflamatorios (proteína C reactiva, factor de necrosis tumoral, interleucina-6) y marcadores de trombosis (inhibidor del activador del plasminógeno de tipo 1 y fibrinógeno) [13, 14].

En el 2007 la Sociedad Europea de Cardiología y la Sociedad Europea de Hipertensión (ESC/ESH) resumieron la definición de SM como una asociación específica entre tres de los componentes mencionados en las definiciones anteriores [15]. La Tabla 1 muestra que las definiciones del SM tienen como características comunes y más prevalentes la obesidad abdominal y la RI, que incrementan el riesgo para el desarrollo de enfermedades cardiovasculares [16, 17].

Tabla 1. Definiciones del SM de acuerdo con diferentes organizaciones

Parámetros	NCEP-ATP III (2001)	IDF (2005)	ESC/ESH (2007)
Obesidad abdominal (circunferencia de la cintura)	≥102 cm hombres ≥88 cm mujeres	≥94 cm hombres ≥80 cm mujeres	>102 cm hombres >88 cm mujeres
Triglicéridos	≥150 mg/dL	≥150 mg/dL	≥150 mg/dL
Colesterol HDL	<40 mg/dL hombres <50 mg/dL mujeres	<40 mg/dL hombres <50 mg/dL mujeres	<40 mg/dL hombres <46 mg/dL mujeres
PA (Sistólica/diastólica)	≥130/≥85 mmHg	≥130/≥85 mmHg	≥130/≥85 mmHg
Glucosa	≥100 mg/dL	≥100 mg/dL	≥100 mg/dL

En la tabla podemos observar que la NCEP-ATP III, la IDF y la ESC/ESH utilizan estos parámetros principalmente para identificar al SM clínicamente y que los valores considerados son similares entre ambas definiciones. PA: presión arterial, HDL: lipoproteínas de alta densidad.

6. Enfermedades Cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son consideradas la primera causa de muerte en México y en el mundo. La Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 indica que la prevalencia de marcadores de ECV en adultos se puede asociar a: diabetes mellitus (13.5%), tabaquismo en mujeres (10%) y hombres (30%), hipertensión arterial (26.5%), hipercolesterolemia (26.5%), sobrepeso y obesidad

con un índice de masa corporal ≥ 25 kg/m² (70%) [18, 19]. Estos factores influyen en el desarrollo de ECV, las cuales provocan una progresiva degeneración del sistema cardiovascular incrementando la morbilidad y mortalidad [20, 21]. Entre las principales ECV se encuentran: hipertensión, aterosclerosis e isquemia cardiaca.

6.1. Hipertensión.

La hipertensión, definida clínicamente como el aumento de la presión sanguínea (presión sistólica >140 mmHg/presión diastólica >90mmHG), es una enfermedad multifactorial. Entre los factores que han sido implicados en su patogénesis se encuentran la sobre-regulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona, activación del sistema nervioso simpático, señalización alterada de receptores acoplados a proteínas G, inflamación, aumento de especies reactivas de oxígeno y mal funcionamiento de las células T debido a que regulan los efectos de la angiotensina II y de los mineralocorticoides [22-24]. La hipertensión está asociada con un aumento en el riesgo de mortalidad por enfermedad arterial coronaria, falla cardiaca e infarto al miocardio [25, 26]. Durante la hipertensión se induce remodelación arterial, aumento crónico del estrés de la pared vascular o estiramiento biomecánico, los cuales, promueven la activación y migración de las CMLV dentro de la arteria. La exposición prolongada a estos factores induce la hipertrofia o hiperplasia de las CMLV, las cuales juegan un papel muy importante en la regulación de la presión sanguínea debido a que modulan el diámetro de los vasos sanguíneos [27, 28].

6.2. Aterosclerosis

La aterosclerosis es resultado de la obstrucción arterial por depósitos de lípidos (esteres de colesterol), proteínas de matriz extracelular (colágeno) y diferentes tipos de células (monocitos, macrófagos, células de músculo liso) en la pared vascular [29]. Esta patología involucra respuestas bioquímicas y moleculares muy específicas resultado del proceso inflamatorio crónico que conlleva una lesión en la pared vascular, lo cual dificulta el paso del flujo sanguíneo, resultando en disfunción endotelial [30], inflamación crónica de la pared vascular y formación de la placa ateromatosa. El proceso comienza con la lesión endotelial, que causa infiltración y acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el espacio subendotelial. Además, involucra vías de señalización proinflamatorias como la expresión de citocinas (IL-8 y TNF- α) e incremento del estrés oxidante producido por un desbalance entre la producción de ERO y la respuesta antioxidante. Las ERO juegan un papel importante en la oxidación que sufren las LDL, comenzando así el proceso aterogénico. Las LDL oxidadas (LDL_{ox}) inducen la activación del endotelio y de las CMLV por medio de la secreción de mediadores inflamatorios (interleucinas, TNF- α , proteína C reactiva, etc.) y la expresión de moléculas de adhesión, tales como moléculas de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1) y selectinas. Este proceso culmina con la acumulación de leucocitos (principalmente monocitos y linfocitos T) en la pared vascular, los cuales al interactuar con proteínas quimioatrayentes como las de monocitos (MCP-1) e interferón gama (IFN- γ), migran hacia la íntima. El reclutamiento de las células inflamatorias aumenta la oxidación de LDL llevando a un círculo vicioso. Una vez en la íntima, los monocitos se diferencian en macrófagos, los cuales expresan receptores scavengers (CD36, SRA

y LOX-1) y comienzan a internalizar a las LDLox para generar células espumosas (células con un exceso de lípidos oxidados), denominadas así debido a su apariencia; su presencia en la pared arterial es una característica muy particular de una lesión aterosclerótica temprana. Los linfocitos T y los mastocitos que migran hacia la íntima, junto con las células espumosas, liberan una variedad de citocinas que promueven el proceso inflamatorio y la generación de ERO. La liberación del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), así como de las ERO estimulan la proliferación y la migración de las células del músculo liso y la acumulación de colágeno que conduce al desarrollo de la placa ateromatosa. Las ERO inducen la expresión de receptores scavengers y su transformación en células espumosas, también inducen la liberación de metaloproteinasas (MMP) que degradan la pared fibrosa de la placa ateromatosa y la membrana basal de las células endoteliales, causando la disrupción de la placa que puede llevar a eventos aterotrombóticos, como infarto al miocardio, isquemia y eventos cerebrovasculares [31-33].

6.3. Isquemia cardíaca

La isquemia cardíaca es la disminución del flujo sanguíneo hacia el corazón debido a la oclusión de una arteria coronaria, causando una disminución en el suministro de oxígeno y de nutrientes, lo cual provoca daño celular [34]. La lesión isquémica de los cardiomiocitos se caracteriza por dos fenómenos: la incapacidad para restaurar la función mitocondrial y el progresivo daño a la membrana plasmática, que resulta en la pérdida de la viabilidad celular [35, 36]. La restauración del flujo sanguíneo (reperusión) después de un periodo prolongado de isquemia es esencial

para salvar a los cardiomiocitos y limitar el daño al miocardio y disfunción cardiaca. Sin embargo, la reperfusión puede exacerbar el daño al miocardio debido a un aumento en la producción de ERO, generadas por disfunción de la cadena respiratoria mitocondrial o por la infiltración de células inflamatorias. Por ejemplo, el peróxido de hidrogeno derivado de la dismutación de anión superóxido da lugar a radicales hidroxilos altamente tóxicos a través de la reacción de Haber-Weiss, facilitada por el aumento en la disponibilidad de hierro libre en la isquemia. Estas ERO pueden causar daño directo a membranas y proteínas o activar vías de señalización proapoptóticas [37, 38].

Entre otras ECV, también se encuentran la insuficiencia cardiaca, el infarto al miocardio y la hipertrofia cardiaca, cuyos factores de riesgo pueden ser genéticos, fisiológicos y ambientales [39-41].

7. Especies reactivas de oxígeno

Las ERO son moléculas derivadas del oxígeno que comprenden dos principales grupos: radicales libres como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}) y derivados no radicales como el H_2O_2 . También es importante considerar a las especies reactivas de nitrógeno (ERN), como el óxido nítrico (ON^{\cdot}), el dióxido de nitrógeno (NO_2^{\cdot}) y el anión peroxinitrito ($ONOO^-$) [42]. Los radicales libres pueden ser definidos como moléculas o fragmentos moleculares independientes que contienen uno o más electrones no apareados. Este electrón desapareado les confiere un alto grado de reactividad. Los derivados no radicales son menos reactivos y más estables, con una vida media más larga que los radicales libres; sin

embargo, pueden ser generadores de radicales en lugares distantes de donde se generaron [43].

En condiciones fisiológicas las ERO son consideradas como segundos mensajeros, ya que influyen en las vías de transducción de señales en varios sistemas biológicos incluyendo el sistema cardiovascular [44].

Se ha descrito al H_2O_2 como una molécula de señalización intracelular que, a bajas concentraciones, activa mecanismos de supervivencia y proliferación. Sin embargo, en condiciones patológicas donde la concentración de ERO está exacerbada causan daño a moléculas como lípidos, proteínas y ADN [45]. La respuesta celular a las ERO está mediada principalmente por la activación de diferentes factores de transcripción tales como la proteína activadora 1 (AP-1), el factor nuclear kappa B (NF- κ B) y el factor 2 relacionado con NF-E2 (Nrf2).

La AP1 se une a su secuencia consenso o elemento de respuesta en el ADN llamada TRE (Elemento de respuesta al 12-O-tetradecanoil forbol-13-acetato, TPA). La AP1 regula genes que codifican para la colágena, la ciclina D y las citocinas TGF β , IL-8, TNF α , entre otros más; se encarga de regular procesos de proliferación, reparación, fase aguda de la enfermedad hepática e inflamación.

El NF- κ B es un factor de transcripción regulado por radicales libres muy estudiado. Se han identificado varios genes que son regulados por este factor de transcripción, entre los cuales se encuentran citocinas y factores de crecimiento (IL-2, IL-8, IL-6, IFN- γ , TNF- α), receptores inmunológicos (Fas, MHC clase I), moléculas de adhesión (E-selectina, I-CAM), la óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), proteínas antiapoptóticas (Bcl-xL, Bcl-2, c-IAP), entre otras.

El Nrf2 es otro de los factores de transcripción que se activan por ERO, la importancia de Nrf2 reside en su capacidad para controlar la expresión de varias proteínas de la defensa antioxidante y del proceso de detoxificación [46]. Dentro de las enzimas antioxidantes que se encuentran bajo el control de Nrf2 están la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPx), la superóxido dismutasa (SOD), tiorredoxina, hemooxigenasa 1, ferritina y la enzima γ -glutamilcisteina sintetasa entre otras [47].

En cuanto a las enzimas de detoxificación que son reguladas por el factor Nrf2 están la NAD(P) quinona reductasa, la UDP-gluconoril-transferasa, la aflotoxina B1 aldehído reductasa y la epóxido hidrolasa microsomal [48]. Cuando hay un aumento en la generación de ERO que no es capaz de ser compensado con la respuesta antioxidante, puede promover el desarrollo de patologías como las ECV.

8. Especies reactivas de oxígeno y enfermedades cardiovasculares

Las ERO a nivel del tejido vascular son producidas por diferentes tipos de células, incluyendo células endoteliales, fibroblastos de la adventicia y células de músculo liso [43]. En estas células del tejido vascular, las fuentes generadoras de ERO son la xantina oxidasa, lipooxigenasas, la sintasa de óxido nítrico desacoplada y oxidasas mitocondriales, además de la NADPH oxidasa, considerada la principal fuente de ERO en el tejido vascular [49]. Estudios previos han demostrado que las ERO generadas por la NADPH oxidasa participan como intermediarios en la señalización para los procesos de migración y proliferación de células de músculo liso de la túnica media a la túnica íntima, eventos tempranos de respuesta a una

lesión vascular que pueden terminar en un estado patológico como la aterosclerosis o restenosis inducida por angioplastia [50, 51].

8.1. NADPH oxidasa

La NADPH oxidasa (Nox) es un complejo multiproteínico compuesto de diferentes subunidades, dependiendo del tipo celular. Las enzimas, originalmente descritas en células fagocíticas, constan de dos subunidades unidas a la membrana, la subunidad p22^{phox} con un peso molecular de 22 kDa y la subunidad catalítica NOX de 96 kDa; tres subunidades citosólicas, la p67^{phox} con un peso molecular de 67 kDa, la subunidad p47^{phox} de 47 kDa y la subunidad p40^{phox} de 40 kDa y Rac1, subunidad encontrada solo en células no fagocíticas de 21 kDa o Rac2 en células fagocíticas y la cual tiene un peso molecular de 21 kDa. Las subunidades citosólicas son reclutadas tras la activación del complejo Nox/p22^{phox} unido a la membrana plasmática, como se muestra en la Figura 1. Todas las CMLV expresan p22^{phox}, mientras que la subunidad catalítica puede ser NOX1, NOX2, NOX4 o NOX5. La distribución de las subunidades catalíticas en CMLV es específica del tejido y de la especie. Por ejemplo, las CMLV aórticas expresan NOX1 y NOX4 en roedores y también NOX5 en humanos. También puede variar su localización celular, las podemos encontrar en la membrana plasmática o en compartimentos de membrana. Hay reportes de la expresión de NOX1 en caveolas, NOX2 en la membrana plasmática de vesículas fagocíticas, NOX4 en la mitocondria y retículo endoplásmico y NOX5 en el retículo endoplásmico, lo cual se evidenció utilizando fracciones celulares por medio de inmunofluorescencia y microscopia confocal, además de Western blot [52].

La expresión de p47^{phox} y Rac1 está bien documentada mientras que la de p67^{phox} es controversial [53]. La subunidad NOX de la enzima NADPH oxidasa contiene dos grupos hemo en la región transmembranal N-terminal y dominios de unión a nicotinamida adenín dinucleótido (NADPH) y flavín adenín dinucleótido (FAD) en la región citoplasmática C-terminal. En este sistema el anión superóxido se genera al transferir los electrones desde el NADPH citosólico a través del FAD luego al hemo interno y externo y finalmente al O₂ en el citosol.

Para inhibir la generación de ERO por la NADPH oxidasa se han utilizado diferentes compuestos como el difenileneiodonio (DPI), el cual actúa como un inhibidor inespecífico de flavoproteínas, al reducir a la flavina, es por ello que distintas enzimas se ven afectadas, tal como la NOS, xantina oxidasa y proteínas mitocondriales de la cadena transportadora de electrones; la apocinina por su parte, es un compuesto que impide la unión de p47^{phox} y p67^{phox} con NOX2; además, se ha observado que tiene actividad antioxidante intrínseca. Otros inhibidores propuestos son el fluoruro de 4- (2-aminoetil) bencenosulfonilo (AEBSF) o la plumbagina, los cuales se utilizan con menor frecuencia por sus efectos inespecíficos. Se ha descrito que AEBSF inhibe proteasas de serina y la plumbagina actúa como antioxidante inhibiendo NF-κB [54-56].

En la Figura 1 se observan las diferentes subunidades que conforman a la NADPH oxidasa y la generación de O₂⁻, el cual puede activar vías de señalización involucradas en el control del tono vascular, proliferación celular, apoptosis, respuesta inflamatoria y migración de las CMLV [57, 58]. Otra fuente de ERO considerada muy importante en los sistemas biológicos es la mitocondria.

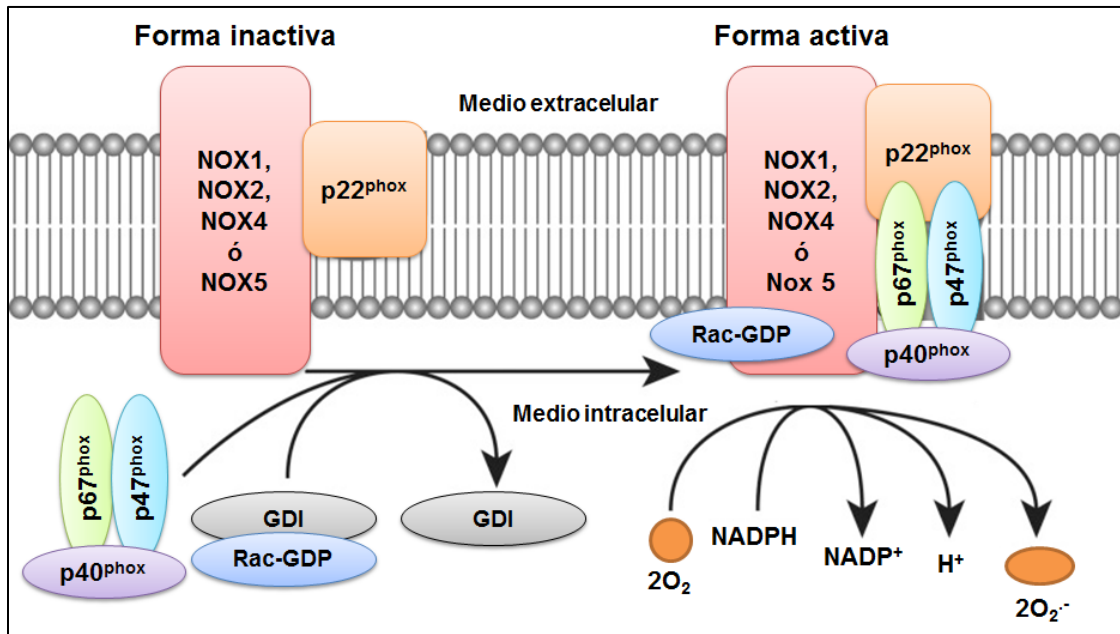


Figura 1. La NADPH oxidasa es una enzima compuesta por diferentes subunidades, algunas transmembranales (NOX y p22^{phox}) o citosólicas (p67^{phox}, p47^{phox} y p40^{phox}). Su activación implica la unión de las subunidades citosólicas a las subunidades que se encuentran en la membrana y la generación del anión superóxido (O₂⁻) requiere la presencia de NADPH como cofactor. NADPH (Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato), GDI (Inhibidor de la disociación de GDP), GDP (Guanosín difosfato) [59].

8.2. La mitocondria como fuente de ERO

En condiciones fisiológicas entre 0.1 y el 2% del total de oxígeno que se consume en la mitocondria para la producción de ATP se convierte en O₂⁻ [60]. En condiciones patológicas como en las ECV esta proporción puede exacerbarse induciendo estrés oxidante. Durante la fosforilación oxidativa la primera especie reactiva que se forma es el O₂⁻, que rápidamente se convierte en H₂O₂ por dismutación espontánea o por acción de la superóxido dismutasa de manganeso (SOD Mn) y la superóxido dismutasa de cobre/zinc (SOD Cu/Zn), localizadas en la

matriz mitocondrial y en el espacio intermembranal, respectivamente [61]. Este H_2O_2 se convierte en agua y oxígeno por acción de la glutatión peroxidasa (GPx), la catalasa (CAT) o la tiorredoxina peroxidasa (TPx). A nivel de la matriz mitocondrial puede ser también convertido en radical hidroxilo e ión hidroxilo a través de la reacción de Fenton [62]. En la cadena transportadora de electrones (CTE) el complejo I y el complejo III, son los principales formadores de ERO. El complejo I forma el O_2^- del lado de la matriz mitocondrial y el complejo III tienen 2 sitios formadores de O_2^- el primero orientado hacia la matriz mitocondrial (Q_i) y el otro orientado hacia el espacio intermembranal (Q_o). Además, durante la oxidación-reducción de la quinona en el ciclo Q, se genera el radical ubisemiquinona (UQ^\bullet), el cual reacciona con el oxígeno y genera también O_2^- (Figura 2) [63, 64]. Las ERO derivadas de la mitocondria han sido implicadas en la regulación del tono vasomotor (vasoconstricción de la arteria pulmonar y la vasodilatación de la arteria cerebral).

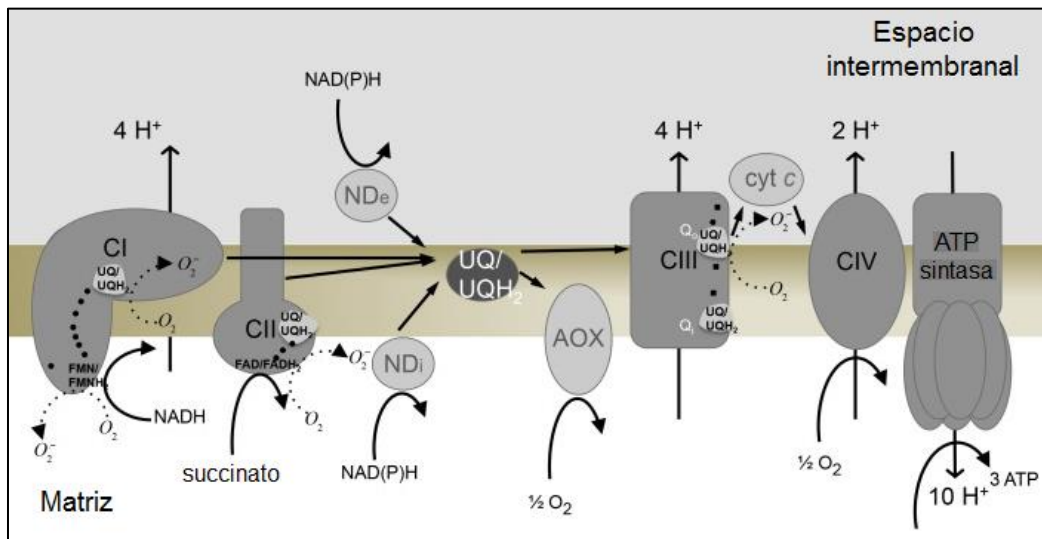


Figura 2. Generación de ERO a nivel del complejo I y III de la cadena de transporte de electrones (CTE) mitocondrial. Los electrones derivados de NADH se transfieren a la CTE a través del complejo I (CI) o del complejo II (CII), y finalmente pasan al oxígeno molecular (O_2) para formar H_2O en el

complejo IV (CIV). El transporte de electrones a través de la CTE mitocondrial se acopla al transporte de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembranal por los complejos I, III y IV, generando un potencial electroquímico que es utilizado por la ATP sintasa para la síntesis ATP. Complejo III (CIII), ciclo ubiquinona (UQ/UQH₂), espacio intermembranal (NDe), matriz mitocondrial (NDi), oxidasa alternativa (AOX), citocromo c (cyt c) [65, 66].

9. La generación de ERO en el SM


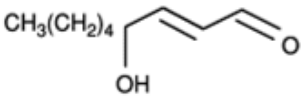
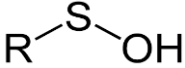
Tanto en pacientes como en distintos modelos experimentales de SM se ha descrito el aumento en los marcadores de estrés oxidante [67]. El incremento del estrés oxidante resulta en daño a componentes celulares como lípidos, proteínas y ADN. El estrés oxidante prolongado y la acumulación de modificaciones oxidativas a biomoléculas son asociadas con alteraciones patológicas de metabolismo y muerte celular [68].

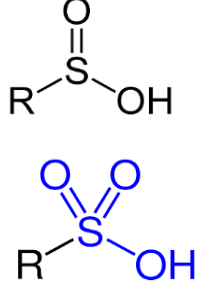
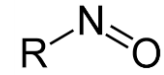
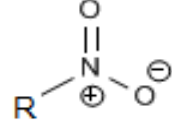
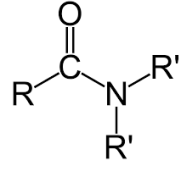
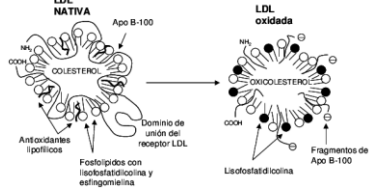
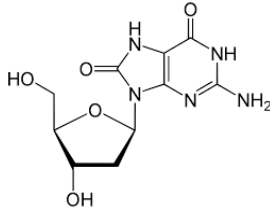
Los fosfolípidos de las membranas contienen una gran cantidad de ácidos grasos poliinsaturados, muy vulnerables a la peroxidación al estar en contacto con el radical hidroxilo (OH^{*}), el cual sustrae un átomo de hidrogeno y crea un radical orgánico el cual reacciona rápidamente con el oxígeno molecular (O₂) para dar lugar a un radical peroxilo o dioxilo, que puede reaccionar con un lípido vecino quitándole un átomo de hidrógeno para producir un hidroperóxido y un nuevo radical. Los hidroperóxidos lipídicos son estables pero en presencia de metales de transición generan productos dañinos para la célula entre ellos aldehídos como el malondialdehído y el 4-hidroxi-2 transnonenal utilizados como marcadores de lipoperoxidación por ser los productos más estables. Ambos productos se pueden determinar por espectrofotometría o por cromatografía líquida de alta resolución [69, 70].

En la molécula de ADN, los grupos nucleófilicos de la desoxirribosa y de las bases nitrogenadas quedan expuestos al ataque electrófilico de las ERO. Existen diferentes tipos de daño oxidativo al ADN, entre los que se ha reportado: ruptura del esqueleto azúcar fosfato de una o de las dos hebras, modificación de las bases nitrogenadas y formación de uniones cruzadas ADN-ADN ó ADN-proteína, a través de diferentes mecanismos. El OH* da lugar a más de veinte modificaciones y entre ellas la más frecuente es 7,8-dihidroxi-8-oxo-24'-deoxiguanosina (8oxodG), la cual puede ser detectado por HPLC [71].

La oxidación irreversible de se da por la carbonilación que ocurre principalmente en los residuos de prolina, lisina, arginina y treonina, el producto de oxidación de dichos aminoácidos más común es el semialdehído glutámico a partir de arginina y prolina. Estas modificaciones pueden ser detectadas por espectrofotometría o por inmunodetección. Otras formas de oxidación son la nitración, glutationilacion y S-nitrosilación [72]. En la Tabla 2 se muestran algunos de los marcadores de oxidación producto del estrés oxidante.

Tabla 2. Marcadores de estrés oxidante

Biomarcadores	Características	Estructura
MDA (Malondialdehído)	Marcador específico de peroxidación de ácidos grasos omega 3 y omega 6	
HNE (4-Hidroxi-2 nonenal)	Marcadores de oxidación del ácido araquidónico y linoleico	
Ácido Sulfénico (SOH)	Marcadores de oxidación de proteínas en residuos de cisteína (reacción reversible)	

<p>Ácido sulfínico (-SOOH) y sulfónico (-SOOOH)</p>	<p>Marcadores de oxidación de proteínas y enzimas en residuos de cisteína (irreversible)</p>	
<p>Nitrosilación de proteínas</p>	<p>Marcadores de modificación de proteínas en residuos de cisteína inducido por especies reactivas de nitrógeno (reversible)</p>	
<p>Nitración de proteínas</p>	<p>Modificación de proteínas en residuos de tirosina inducido por especies reactivas de nitrógeno (irreversible)</p>	
<p>Proteínas carboniladas</p>	<p>Modificación en proteínas generadas por la reacción del radical •OH con los residuos de prolina, lisina y arginina</p>	
<p>LDL oxidadas</p>	<p>Modificación de lipoproteínas de baja densidad generadas por la oxidación con ERO y ERN</p>	
<p>7,8-dihidroxi-8-oxo-24'-deoxiguanosina (8oxodG)</p>	<p>Modificaciones en la doble hélice del ADN generadas por la reacción del radical •OH con todas las bases purina o pirimidina</p>	

Como se observa en la tabla existen diferentes marcadores de estrés oxidante que ponen en evidencia las alteraciones entre la generación de ERO y la repuesta antioxidante que se refleja en daño a moléculas como lípidos, proteínas y ADN [2].

El SM está caracterizado por la presencia de obesidad definida como un exceso de lípidos en el tejido adiposo. Esto, junto con la RI, propicia un aumento en la actividad lipolítica a nivel del tejido adiposo, lo cual genera la liberación de AGL hacia la circulación y, posteriormente, la acumulación de estas moléculas en órganos como corazón, hígado y músculo, entre otros [73].

Los AGL son sustratos fisiológicos de la β -oxidación y, por consecuencia, de la generación de ATP a nivel mitocondrial. Sin embargo, cuando la capacidad de oxidación para generar ATP es rebasada, se induce su acumulación y la síntesis *de novo*, tanto de ácidos grasos como de otros lípidos mediadores de otras vías metabólicas, ejerciendo efectos nocivos sobre las células. Varios trabajos han sugerido que los AGL inducen la generación de ERO en el tejido vascular por medio de la activación de la NADPH-oxidasa [74, 75]. El mecanismo por el cual los AGL activan a la NADPH-oxidasa no está bien establecido. Sin embargo, recientemente se han propuesto que los AGL son precursores del diacilglicerol, el cual es activador fisiológico de la proteína cinasa C épsilon (PKC ξ) que a su vez fosforila a la subunidad p47phox de la NADPH-oxidasa, encargada de activar la subunidad NOX y la generación de ERO [76]. Otros trabajos mostraron que los acil-CoA, productos de activación de los AGL por medio de la acil-CoA sintetasa, inducen la generación de ERO a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial [77]. En este contexto la acetil-CoA, derivada del piruvato o procedente de la β -oxidación de los ácidos grasos, se combina con el oxaloacetato para formar citrato, el cual se incorpora al ciclo del ácido cítrico y es convertido en isocitrato. La isocitrato deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ genera NADH. Cuando el exceso de NADH supera la fosforilación

oxidativa en la mitocondria, los electrones en exceso se transfieren al oxígeno, dando lugar a la formación del radical superóxido [78].

Otra molécula que podría estar induciendo la generación de ERO en el SM es la leptina (LEP), una hormona secretada por el tejido adiposo que actúa como regulador del peso corporal y el metabolismo, inhibiendo el apetito a través de la activación de sus receptores en el cerebro expresados en el hipotálamo. Su concentración en la circulación correlaciona positivamente con el tamaño de los adipocitos y la cantidad de tejido adiposo en la cavidad intra-abdominal [79, 80]

Varios estudios muestran que la leptina actúa sobre el endotelio y los cardiomiocitos incrementando la biodisponibilidad de ON^* y estimulando la expresión de la iNOS a través de un mecanismo que involucra la vía JAK2/STAT3 y PI3K/Akt, además de inducir la generación de ERO en paralelo del ON^* por medio de la NADPH oxidasa al incrementar la expresión de la subunidad NOX2 de esta enzima [81].

En condiciones patológicas la capacidad de la leptina para producir ON^* puede ser afectada por el incremento en la formación de ERO, como se observa en células del músculo liso aisladas de aorta de ratas normotensas. Las ERO reaccionan con el óxido nítrico formando peroxinitritos una especie de nitrógeno muy reactiva y generadora del estrés nitroso. Además, la leptina inhibe el incremento del calcio citosólico inducido por angiotensina II y la vasoconstricción en células del músculo liso [82].

10. Células del músculo liso vascular

Las CMLV son el principal componente de la capa media de la arteria y juegan un papel muy importante en la reactividad vascular. En la Figura 3 se muestran las principales capas estructurales que componen una arteria.

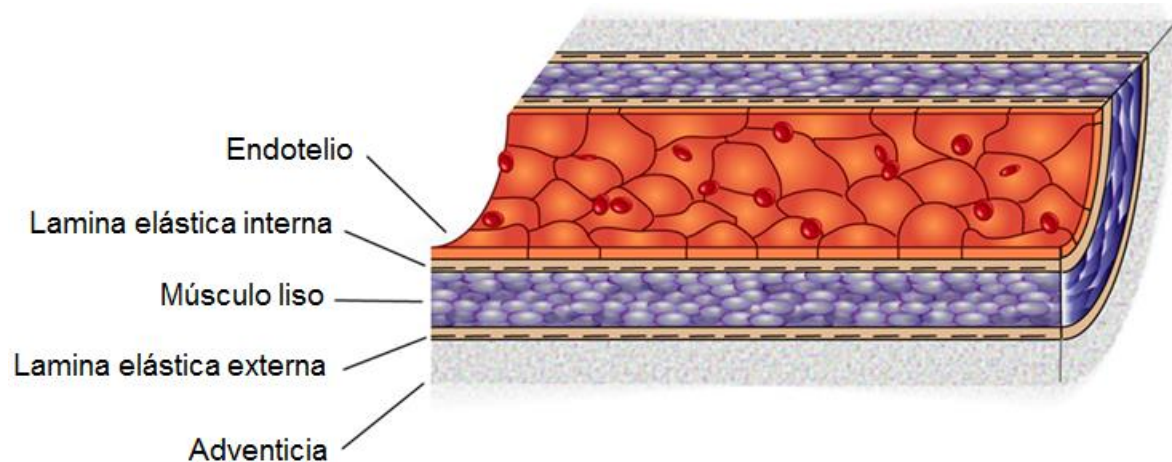


Figura 3. Componentes estructurales de las arterias. La arteria está compuesta por tres capas: la capa íntima que da hacia el lumen de la arteria formada por células endoteliales, la capa adventicia más externa y la capa media que se encuentra entre la lámina elástica interna y la lámina elástica externa, formada por las células de músculo liso [83].

En la actualidad las CMLV se han involucrado en procesos fisiológicos y patológicos, como la regulación del tono vascular, formación de la neoíntima arterial, remodelación vascular, angiogénesis, estabilización y desestabilización de la placa aterosclerótica, así como calcificación vascular [84, 85]. Por estas razones, las CMLV están asociadas directamente con la patogénesis de la hipertensión arterial, aterosclerosis y restenosis después de una angioplastia [86].

10.1. Papel de las CMLV en el tono vascular

Las CMLV de las arterias en la edad adulta tanto en humanos como en modelos experimentales se caracterizan por un fenotipo contráctil y diferenciado que se define por un bajo rango de proliferación, baja actividad sintética de la matriz extracelular y la expresión de marcadores de fenotipo contráctil, tales como la cadena ligera de miosina y su fosforilación, la α -actina, caldesmona y calponina, las cuales son proteínas importantes en el proceso de contracción [87].

Las CMLV carecen de troponina, la cual es sustituida por caldesmona, proteína característica de músculo liso y encargada de regular la unión de la miosina a la actina [88].

La contracción y la relajación en las CMLV están orquestadas por la variación en la concentración de calcio en el citosol. Un aumento en el Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) activa la bomba sodio-potasio, ATPasa responsable de llevar a cabo el transporte de tres iones sodio (Na^+) hacia el exterior de la célula y el transporte de dos iones potasio (K^+) hacia el interior para mantener la homeostasis celular [89].

El proceso de contracción tiene lugar esencialmente en los filamentos de miosina, dependiendo del estado de fosforilación de las cadenas ligeras de esta proteína; únicamente cuando se encuentran fosforiladas puede producirse la contracción muscular. Este proceso depende de dos enzimas: la primera es la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) y la segunda es la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP) [90].

La activación de la MLCK depende de la formación del complejo $[Ca^{2+}]_i$ -calmodulina. Una vez activa, la MLCK, fosforila las cadenas ligeras de miosina en residuos de serina 19, lo cual conlleva a la contracción de la fibra muscular lisa. Alteraciones en

la función de MCLK han sido asociadas con varias patologías como asma, enfermedad inflamatoria del pulmón, enfermedad inflamatoria del intestino e hipertensión [91].

La MLCP elimina el fosfato de las cadenas ligeras de miosina e induce relajación, esta fosfatasa se activa al disminuir las concentraciones de $[Ca^{2+}]_i$ e inactivarse la MCLK. La MLCP está constituida por tres subunidades: una subunidad catalítica de 38 kDa (PP1c δ), una subunidad regulatoria de 110 a 130 kDa (MYPT1) y una subunidad de unión a miosina de 20 kDa. Se ha reportado que la regulación de la MLCP está mediada por dos mecanismos: la fosforilación de la subunidad MYPT1 en el residuo treonina 853 (T853) por la cinasa RhoA (ROCK) y la fosforilación de una pequeña proteína inhibidora (CPI-17) en el residuo treonina 38 (T38) por la proteína cinasa C (PKC). Además, la fosforilación constitutiva de MYPT1 en treonina 696 y 853 (T696, T853) también inhibe la actividad de la MLCP, evitando su fosforilación por PKA y PKG en residuos de serina [92]. Por lo tanto, el balance entre las actividades de la MLCK y la MLCP determina el grado de contracción del músculo liso (Figura 4). Las señales reguladoras de la contracción y relajación del músculo liso actúan fundamentalmente sobre la activación o la inhibición de estas dos enzimas [93].

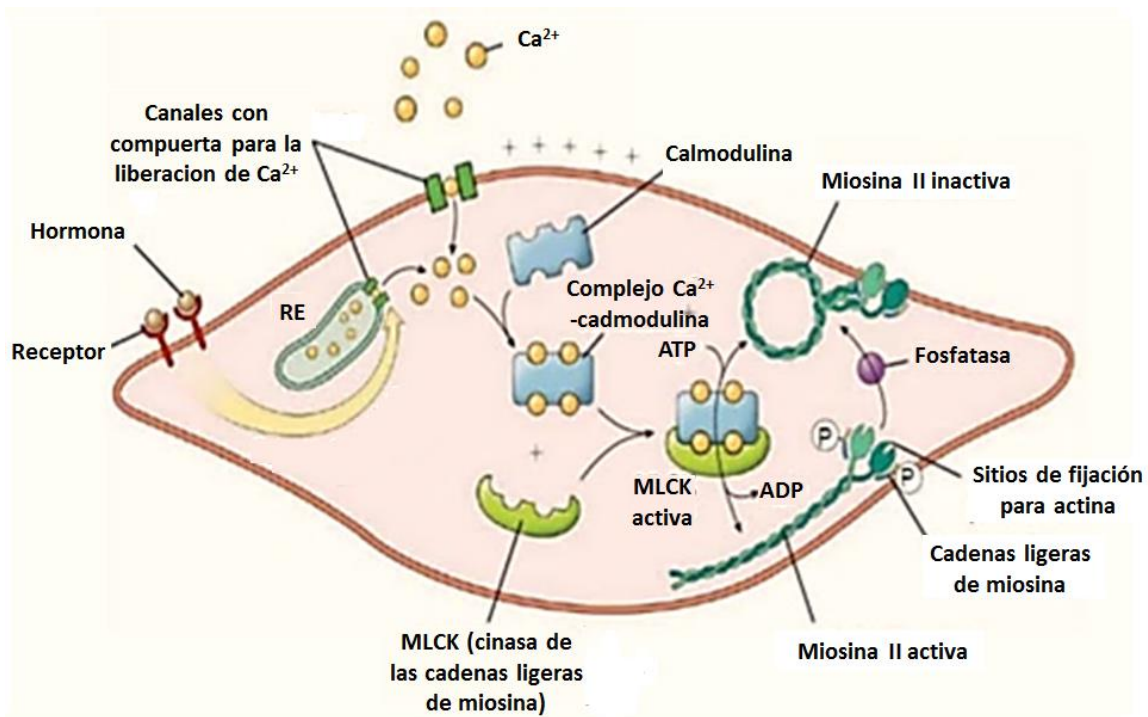


Figura 4. Mecanismo de regulación de los procesos de contracción y relajación en la CMLV [94]. En condiciones fisiológicas la entrada de Ca²⁺ desde el espacio extracelular y el Ca²⁺ liberado del retículo sarcoplásmico (RE) aumentan la concentración de Ca²⁺ en el citosol favoreciendo la formación del complejo Ca²⁺-calmodulina, que al unirse a la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) la activa. La MLCK fosforila las cadenas ligeras de miosina para contraer la CMLV (miosina II activa), mientras la fosfatasa elimina los grupos fosfato (P) y rompe la unión miosina-actina (miosina II inactiva) produciendo la relajación de la CMLV.

En una condición patológica como la hipertensión, el “shear stress” o también llamado estrés de arrastre puede inducir mayor contracción debido a un aumento en la producción de ERO, por activación indirecta de la NADPH oxidasa, ya que el O₂⁻ reacciona con el ON^{*}, uno de los principales reguladores de la relajación vascular, disminuyendo su disponibilidad al generar peroxinitrito. Por otro lado, se ha descrito que el H₂O₂ que resulta de la dismutación O₂⁻ por la SOD regula vías de señalización, activando a la cinasa RhoA e inhibiendo la MLCP, lo que resulta en un

aumento en la fosforilación de la cadena ligera de miosina y mayor contracción. Otro posible mecanismo es a través de la oxidación de los grupos tiol de la cinasa RhoA o por procesos de nitrosilación de cisteínas derivados del óxido nítrico, que resulta en la pérdida de la actividad de la cinasa RhoA contribuyendo a la hipertensión [95, 96].

Las ERO participan regulando vías de señalización involucradas en los procesos de contracción y relajación, por lo tanto un aumento de ERO podría asociarse a estados patológicos en las CMLV.

10.2. Especies reactivas de oxígeno y proliferación de las CMLV

En condiciones fisiológicas, las ERO tienen funciones esenciales en procesos de señalización celular, regulando la proliferación, diferenciación y migración de las CMLV [97]. A nivel del tejido vascular, las ERO desencadenan una serie de eventos que afectan la biodisponibilidad del ON^{*}, el cual tiene un efecto vasodilatador en las CMLV y también inhibe su proliferación [98].

En el tejido vascular la NADPH-oxidasa y la mitocondria son consideradas las principales fuentes del radical superóxido que reacciona con el óxido nítrico formando peroxinitrito, un agente oxidante de diferentes biomoléculas como proteínas y lípidos [99].

Existen evidencias experimentales del papel que juegan las ERO y las ERN en las lesiones ateroscleróticas, que resultan en una respuesta inflamatoria excesiva y que implican la migración y proliferación de CMLV, la infiltración de células inflamatorias, la neovascularización, la producción de matriz extracelular y la acumulación de lípidos oxidados [100].

Las ERO y ERN inducen la expresión de varias moléculas proinflamatorias como interleucinas (IL)-1 β , -6, -8, factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) y moléculas de adhesión endoteliales solubles como VCAM-1, ICAM-1 y E-selectina [81, 101, 102]. En las CMLV estas ERO y ERN pueden estarse generando por la NADPH oxidasa, la xantina oxidasa, la cadena respiratoria mitocondrial, las lipooxigenasas y el desacoplamiento de la NOS inducible (iNOS), que únicamente se expresa cuando las células son activadas por endotoxinas y citocinas proinflamatorias (IFN γ y TNF α) a nivel transcripcional, produciendo altas concentraciones de ON $^{\cdot}$, que actúa como radical libre y ejerce una acción citotóxica [103].

Moléculas como la angiotensina, factores de crecimiento, lípidos modificados y moléculas inflamatorias presentes en diferentes estados patológicos, como hiperglucemia, hipertensión, diabetes y aterosclerosis, inducen una sobreproducción de ERO y disminuyen la defensa antioxidante en el tejido vascular, lo cual podría afectar la función de las CMLV [104, 105].

10.3. Alteración del fenotipo de las CMLV en enfermedades cardiovasculares

Los procesos de diferenciación de las CMLV son esenciales en el desarrollo vascular, sobretodo en estados embrionarios. Sin embargo, en etapas adultas las alteraciones en el estado de diferenciación de las CMLV juega un papel crítico en la patogénesis de la aterosclerosis, restenosis e hipertensión [106], en donde se ha observado un cambio de fenotipo de las CMLV caracterizado por un incremento en la proliferación, migración, síntesis de componentes de la matriz extracelular, expresión de proteínas inflamatorias y, al mismo tiempo, disminución de las

proteínas marcadores de fenotipo contráctil (α -actina, cadena ligera de miosina, caldesmona y calponina) [107].

10.3.1. Hipertensión

Cuando el vaso sanguíneo se expone a presión alta, como el estiramiento mecánico, estas fuerzas conducirán a la hipertrofia e hiperplasia de las CMLV, así como a cambios en el fenotipo desde el estado contráctil al estado sintético y aumento en la expresión de proteínas de la matriz extracelular [108]. Además se ha reportado que las CMLV de ratas espontáneamente hipertensas muestran hiperproliferación asociada al cambio de fenotipo [109].

10.3.2. Aterosclerosis

En la aterosclerosis, las CMLV están involucradas en procesos de remodelación de la pared vascular. Una característica muy particular de esta patología es el cambio del fenotipo de las CMLV de contráctil a proliferativo, lo cual involucra procesos como la acumulación y síntesis de matriz extracelular, crecimiento de la placa aterosclerótica, migración de las mismas CMLV hacia la íntima, liberación de moléculas quimioatrayentes y factores de crecimiento [110].

Las LDL oxidadas, por su parte, también contribuyen a la patogénesis de la aterosclerosis, influyendo sobre el cambio de fenotipo de las CMLV y contribuyen a la desestabilización de la placa ateromatosa, aumentando la apoptosis de las CMLV; esto porque tanto las CMLV como la acumulación de colágeno mantienen estable a la placa aterosclerótica [111, 112].

10.3.3. Restenosis

La estenosis arterial es una reducción del lumen de las arterias grandes, generalmente resultado de la aterosclerosis. Esta patología puede empeorar con el tiempo y bloquear completamente la arteria, el tratamiento para restaurar el flujo sanguíneo consiste en un proceso quirúrgico llamado angioplastia, la cual consiste en colocar un “stent vascular” para restablecer el flujo sanguíneo. Sin embargo, un problema recurrente que se presenta después de esta intervención quirúrgica es la restenosis, que consiste en la reducción repetida del lumen de la arteria, como consecuencia de varios factores como resistencia a drogas antiproliferativas, hipersensibilidad, “shear stress” y remodelamiento vascular [113, 114].

La hiperplasia de las CMLV es una de las patologías que contribuye a la restenosis. Se ha observado una modificación de su fenotipo caracterizado por la disminución en la expresión de proteínas de fenotipo contráctil como calponina y α -actina, por lo que migran hacia la íntima y proliferan, formando una capa que obstruye el lumen de la arteria, aumento de proteínas de matriz extracelular como colágeno y proteínas como Smad3/ factor de crecimiento transformante- β 1 (TGF- β 1) que estimulan la dediferenciación de las CMLV [115].

11. Posibles mecanismos de ERO en la proliferación de las CMLV

La capacidad de contracción, proliferación y migración de las CMLV se ve afectada por una amplia gama de factores, incluyendo las fuerzas mecánicas, agonistas contráctiles como la angiotensina II, proteínas de matriz extracelular, ERO, interacciones endoteliales-CMLV, PDGF, TGF- β 1, hipoxia, entre otros [116]. Existe

un mecanismo en particular que explica la proliferación de la CMLV y que involucra la secreción de la proteína ciclofilina A promovida por el aumento en las ERO [117].

11.1. Ciclofilina A

La ciclofilina A (CyPA) es una proteína citosólica de 20 kDa involucrada en muchas funciones biológicas, como modulación de la respuesta inmune, crecimiento celular, desarrollo de tumores y enfermedades vasculares; es secretada por las CMLV en respuesta al aumento en la generación de ERO, las cuales activan la vía RhoA/Rho-quinasa, activando proteínas como Src, Rho y Cdc42, involucradas en procesos de remodelación del citoesqueleto para la formación de vesículas VAMP2 (vesículas de asociación a membrana plasmática 2), a través de las cuales se secreta la CyPA al espacio extracelular [118].

La CyPA extracelular se une a su receptor CD147, activando diferentes vías de señalización. A nivel de las células endoteliales aumenta la expresión de moléculas de adhesión, disminuye la expresión de la eNOS y activa señales proapoptóticas, mientras en las CMLV provoca la activación de ERK 1/2, Akt y JAK para su proliferación y migración. La vía ERK 1/2 activa procesos de proliferación, diferenciación, mitosis y supervivencia celular, mientras que la vía Akt tiene efectos antiproliferativos que involucran a las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) p21 y p27, encargadas de regular el ciclo celular al final de las fases G1 (crecimiento celular, síntesis de proteínas y ARN, una sola copia de ADN) y G2 (crecimiento celular: continua la duplicación de proteínas y ARN) y a la mitad de la fase M (mitosis) [119]. La vía JAK incluye las proteínas ciclina D, p21, Bcl2 y c-Myc,

involucradas directamente en crecimiento, apoptosis y programación del ciclo celular (Figura 5) [120].

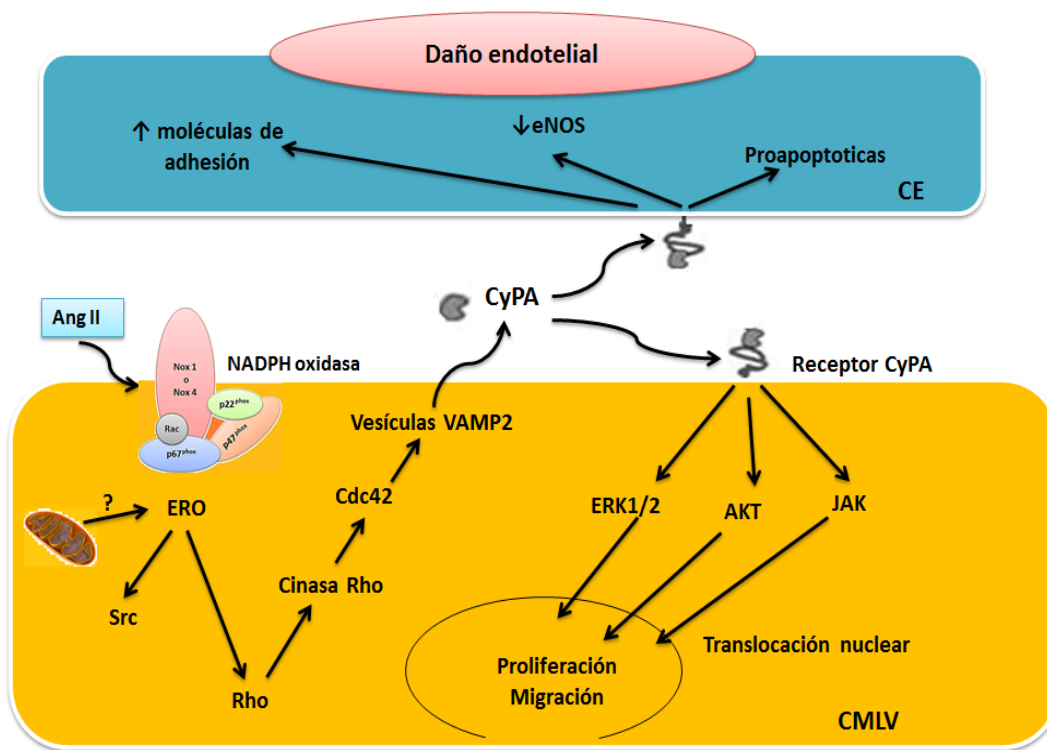


Figura 5. Mecanismo involucrado en la proliferación de las CMLV. Las ERO activan proteínas involucradas en la formación de vesículas como la cinasa Rho, a través de la formación de estas vesículas se secreta la CyPA, la cual es una proteína que se secreta en respuesta al estrés oxidante, una vez en el medio extracelular se une a su receptor activando diferentes vías de señalización a nivel de las células endoteliales y las CMLV. Ang II (angiotensina II), ERO (especies reactivas de oxígeno), Cdc42 (ciclo de división celular 42), CyPA (ciclofilina A), CE (células endoteliales), CMLV (células del músculo liso vascular).

12. Antecedentes

12.1 SM y las CMLV

El SM se caracteriza por numerosos factores de riesgo metabólico, los cuales se están involucrados en la modificación del fenotipo de las CMLV, como por ejemplo

las citocinas proinflamatorias y los lípidos (LDL, TG, AGL) que favorecen el cambio a fenotipo sintético [121].

La hipertensión participa de manera importante ya que genera estrés mecánico al aumentar la rigidez de los vasos sanguíneos debido a una mayor vasoconstricción disminuyendo el grado de relajación, así como las ERO que además de cambiar el fenotipo de las CML también favorecen el desarrollo de hipertensión [122].

12.2. Modelos de SM

Los estudios en modelos animales constituyen una valiosa herramienta para comprender los procesos fisiopatológicos asociados al SM, sus características histológicas y evaluar nuevas terapias. Los modelos más utilizados son los desarrollados en roedores (rata y ratón) por su similitud biológica con el humano y el conocimiento acumulado que se tiene de esta especie desde el punto de vista genético, molecular y enzimático, lo cual facilita la interpretación de los resultados y la interpolación con el humano.

Existen varios modelos de SM basados en alteraciones genéticas o inducidos por factores ambientales, como la dieta y el sedentarismo. Entre los modelos, inducidos genéticamente están los transgénicos, con deficiencia en la secreción de la leptina y alteraciones en la función de su receptor [123], o con mutaciones que incrementan la lipogénesis y disminuyen la β -oxidación de ácidos grasos y dificultan la eliminación del exceso de grasa hepática [124].

En cuanto a los modelos de SM inducidos por la dieta están aquellas enriquecidas en carbohidratos, como fructosa y sacarosa, o enriquecidas con grasa, o bien, la combinación de ambas dietas. Estos modelos se caracterizan por el desarrollo de

obesidad, resistencia a la insulina y alteración en el metabolismo de lípidos [125]. También existen modelos con dietas deficientes aminoácidos como la arginina, colina o metionina, con administración de estrógenos, glucocorticoides o ciertos tóxicos que incrementan la lipogénesis hepática, o disminuyen la oxidación de ácidos grasos [126]. El uso de estos modelos experimentales permite avanzar en los procesos fisiopatológicos involucrados en el SM.

12.3. Antecedentes del modelo de SM inducido por dieta enriquecida con sacarosa

Nuestro equipo de trabajo ha desarrollado un modelo de SM basado en ratas Wistar macho recién destetadas a las cuales se les administras una solución de sacarosa al 30% como agua de bebida durante 24 semanas. Este modelo no presenta diferencias significativas en el peso corporal pero presenta un incremento en el contenido de grasa intraabdominal [127]. También presenta hiperiglicéridemia, hipertensión, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina [128, 129]. El modelo presenta alteraciones en el metabolismo de ácidos grasos que se reflejan en las altas concentraciones de ácido palmítico, palmitoleico y oleico [130]. En mitocondrias de hígado se ha observado un aumento en la generación de ERO, acumulación de ácidos grasos libres y la sobreexpresión de la proteína desacoplante UCP2. También se reportó un aumento de los marcadores de estrés oxidante, como el malondialdehído, peroxidación lipídica y glutatión oxidado, así como disminución del glutatión reducido en tejido vascular del modelo de SM. Adicional a esto, se ha reportado el aumento en la actividad de la NADPH oxidasa en anillos de aorta [7, 69]. Se considera como un modelo de SM porque están

presentes los marcadores clínicos necesarios para diagnosticarse en humanos, como aumento de la grasa intraabdominal, hiperlipidemia e hipertensión.

13. Justificación

Las CMLV juegan un papel de gran importancia en el mantenimiento del tono vascular por medio del fenotipo contráctil que adquieren durante el desarrollo. En condiciones fisiológicas las CMLV se caracterizan por la expresión de diferentes proteínas contráctiles funcionales. Un cambio del fenotipo contráctil de las CMLV ha sido implicado en procesos patológicos como la aterosclerosis y la restenosis después de una angioplastia. Esto debido a una disminución en el contenido de proteínas características de su fenotipo contráctil y un aumento en la biosíntesis de proteínas de la matriz extracelular que se reflejan en una mayor proliferación. Existen varios factores que pueden modificar este fenotipo contráctil, entre los que se encuentra el estrés oxidante. En un modelo de SM inducido por alto consumo de sacarosa los marcadores de estrés oxidante están incrementados, además de que ésta condición patológica también es un factor de riesgo para desarrollar ECV. Por lo tanto, se consideró importante estudiar si el cambio del fenotipo contráctil de las CMLV aisladas de un modelo de SM involucra ERO.

14. Hipótesis

Las células del músculo liso aisladas del modelo de síndrome metabólico cambian de fenotipo contráctil a proliferativo inducido por el aumento de especies reactivas de oxígeno generadas por la mitocondria y la NADPH oxidasa.

15. Objetivo General

Determinar la participación del aumento en las especies reactivas de oxígeno en el cambio de fenotipo de las células de músculo liso en un modelo de síndrome metabólico

16. Objetivos Particulares

- Evaluar la proliferación de CMLV aisladas del modelo de SM.
- Determinar la generación de ERO a nivel de la NADPH oxidasa y de la mitocondria en CMLV aisladas del modelo de SM.
- Investigar la participación de las ERO generadas por la mitocondria y la NADPH oxidasa sobre la proliferación de las CMLV aisladas del modelo de SM.
- Evaluar las proteínas marcadoras de fenotipo contráctil en CMLV aisladas del modelo de SM.
- Asociar la participación de la ciclofilina A con el cambio de fenotipo de las CMLV aisladas del modelo de SM.

17. Material y métodos

17.1. Modelo experimental de SM

Se utilizaron ratas macho Wistar obtenidas del bioterio del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, recién destetadas, con un peso aproximado de 40 g y mantenidos y manejados según la norma de ética de tratamiento de los animales de laboratorio (NOM-062-ZOO-1999).

Los animales fueron separados en dos grupos de 6 ratas cada uno:

Grupo control (C) que recibió alimento sólido (Lab diet fórmula 5001, Ralston Purina Corp., St Louis, MO) y agua de beber *ad libitum*; Grupo síndrome metabólico (SM) que recibió el mismo alimento sólido que los animales controles y como agua de bebida una solución de sacarosa (azúcar refinada) al 30% *ad libitum*. Después de 24 semanas de tratamiento, a las ratas se les retiró el alimento durante toda la noche y al día siguiente fueron sacrificadas por decapitación.

17.2. Análisis de AGL, TG, glucosa, insulina y leptina

La sangre se recolectó de la aorta abdominal en tubos con anticoagulante (EDTA al 0.1%) y se centrifugó inmediatamente a 600 x g durante 20 min a 4 °C. Al plasma obtenido se le añadió butilato de hidroxitolueno (BHT) al 0.005% como antioxidante, se almacena a -70°C hasta la cuantificación de los lípidos e insulina.

Los AGL se determinaron por cromatografía de gases y se obtuvieron según el método de Folch [131]. La concentración de triglicéridos en plasma se midió según el método descrito por Nägele [132]. Los niveles de glucosa, insulina y leptina en plasma se midieron por radioinmunoensayo utilizando kits comerciales estándar

(Linco Research); cada ensayo comercial se calibró con los estándares del fabricante.

La grasa intraabdominal se diseccionó de la cavidad retroperitoneal y alrededor de ambos riñones e inmediatamente se pesó. La grasa visceral y duodenal no se incluyó en este procedimiento.

17.3. Determinación de la tensión arterial

Previo al término de las 24 semanas de tratamiento se procedió a realizar la monitorización de la tensión arterial y la frecuencia cardiaca en los grupos experimentales.

Se utilizó el equipo de medición de tensión arterial no invasiva Pletismógrafo LE 5002 Non Invasive Blood Pressure Meter. El equipo fue calibrado previo a su uso, basados en las instrucciones del proveedor (Panlab. Harvard apparatus, 2007).

Se realizó un adiestramiento de las ratas durante siete días en un lugar tranquilo donde se minimizara la distracción y estrés a los animales de prueba.

Quince minutos previos a las mediciones, las ratas fueron colocadas cerca de dos calentadores eléctricos para generar una vasodilatación sistémica favorable. Cada rata se introdujo al cepo de acrílico, exponiendo su cola fuera de éste cerca de una fuente de calor (lámpara y caja de calor).

Una vez comprobada la movilidad mínima del animal se procedió a realizar de cinco a diez mediciones en un lapso no mayor a 20 min. Se tomaron como tensiones aceptables aquellas con frecuencias cardiacas menores a 500 beats, mientras que mayores a esto, se consideró que los animales estaban en estado de estrés o movimiento.

17.4. Cultivo primario de las CMLV

Las CMLV se obtuvieron de la aorta de la rata en condiciones estériles. Una vez diseccionada la aorta, inmediatamente se colocó en un buffer que contenía 140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM Na₂HPO₄, 2.4 mM MgSO₄, 2 mM CaCl₂, 5.6 mM Glucosa, 0.02 mM EDTA, 25 mM HEPES, pH 7.4 y se retiró la grasa perivascular. Posteriormente, la aorta se incubó con 1 mg/ml de colagenasa (GIBCO) durante 20 min para despegar el adventis (fibroblastos) del músculo liso. Una vez que el adventis fue retirado, la aorta se incubó con 10 mM papaína (ROCHE) durante 40 min para disgregar las células musculares.

Posteriormente las CMLV obtenidas fueron filtradas a través de un tamiz con un poro de 230 µm (Tissue Grinder Kit, SIGMA) y sembradas en cajas pretratadas para cultivo primario de 25 cm² (CORNING) y en medio de cultivo D-MEM/F-12 (GIBCO) suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB) (GIBCO), el cual fue inactivado previamente a 56°C durante 30 min. Las CMLV fueron colocadas en una incubadora (Forma Scientific Steri Cult 200) a 37°C con 5% de CO₂ y 90% de humedad. Cuando las células llegaron a confluencia se dispersaron con 0.25% de tripsina-EDTA (GIBCO) y se resembraron en una caja de 75 cm², en el mismo medio de cultivo descrito anteriormente.

17.5. Proliferación celular

Cuando las cajas de 75 cm² llegaron a confluencia, las células se dispersaron con 0.25% de tripsina-EDTA (GIBCO) y se resembraron en cajas multipozo (24 pozos), colocando 8000 células por pozo. Se agregó medio de cultivo con 10% de SFB, el cual fue cambiado cada 24 h hasta cumplir los tiempos de cada experimento.

Finalmente se fijaron con etanol absoluto a diferentes tiempos 0, 24, 48, 72, 96 y 120 horas para determinar el ADN como marcador de la proliferación celular.

La cuantificación del ADN de las CMLV se determinó por el método modificado de Brunk [133], utilizando el fluoroforo diamidino-fenil-indol (DAPI), el cual se intercala en las cadenas del ADN y emite fluorescencia a una longitud de onda de excitación de 360 nm y emisión de 450 nm.

Después de fijar la células con etanol, se les adicionó 150 μ l de NaOH (1 N) y 1.35 ml de 0.15 M Na_2HPO_4 con DAPI a una concentración final de 0.5 μ M para posteriormente evaluar la cantidad de ADN por fluorescencia, utilizando un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS 50B. Como referencia para determinar la concentración de ADN de las muestras se realizó una curva con ADN comercial de salmón (SIGMA), cuya concentración real fue determinada en un NanoDrop (Thermo Scientific).

17.6. Participación de las ERO en la proliferación de las CMLV (inhibición de las fuentes de ERO: NADPH oxidasa y scavengers de $\text{O}_2^{\cdot-}$)

Las CMLV se sembraron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente en cajas de 24 pozos, en ausencia y presencia de diferentes compuestos como el 4 hidroxitempo (tempol) y mitotempo, como atrapadores de ERO; cloruro de difeniliodonio (DPI) y apocinina, como inhibidores de la NADPH oxidasa, a 5 y 10 μ M durante 72 y 120 h. Todo esto para evaluar la participación de las ERO en la proliferación de las CMLV y qué fuentes de ERO están contribuyendo a este proceso.

17.7. Análisis de proteínas marcadoras de fenotipo contráctil

17.7.1. Obtención de proteína total

La obtención de proteína de las CMLV se hizo en dos fases de crecimiento: no confluentes (72 h) y confluentes (120 h). Las CMLV fueron disgregadas con tripsina-EDTA al 0.25% y se centrifugaron a 700 x *g* durante 5 min a 4°C; se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 200 µl de buffer de lisis (25 mM HEPES, 0.1 M NaCl, 15 mM imidazol, 10% glicerol y 1% Triton X-100), pH 8, con inhibidores de proteasas (115 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)), 2 mM leupeptina, 1.5 mM aprotinina, 3 mM pepstatina) y antifosfatasas (0.2 mM ortovanadato, 50 mM NaF), y se incubaron por 30 min a 4°C. Por último, se realizó la cuantificación de proteína por el método de Bradford [134].

17.7.2 Western blot

En geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 8% y 12% se depositaron 50 µg de proteína de cada muestra para la detección de caldesmona, 20 µg para α -actina, 35 µg para la miosina de cadena ligera fosforilada y GAPDH, así como 100 µg para ERK 1/2, CyPA y CD147. Como control de carga se utilizó β -actina. Los geles se corrieron en un buffer que contenía 190 mM Glicina, 25 mM Tris, 1% SDS a 120 voltios. La transferencia se realizó en medio húmedo en membrana de nitrocelulosa (Millipore) a 350 mA durante 60 min para caldesmona, ERK 1/2 y CD147, 45 min para α -actina y 35 min para la cadena ligera de miosina fosforilada, CyPA y GAPDH. Después de la transferencia las membranas fueron bloqueadas con leche baja en grasa al 5% disuelto en TBS-T (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 0.1% Tween 20 a pH 7.4) durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente,

las membranas se incubaron con anticuerpos específicos para caldesmona (abcam, 1:20000), α -actina (abcam, 1:300), miosina de cadena ligera fosforilada (abcam, 1:1000), CD147 (abcam, 1:2000), GAPDH (abcam, 1:10000), CyPA (genetex, 1:1000), ERK1/2 (genetex, 1:1000) y β -actina (novusbio, 1:10000), diluidos en una solución que contenía 10 mM NaCl, 10 mM Tris al 3% de leche baja en grasa a pH 7.4 durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas se lavaron con TBS-T durante 10 min (5 veces) y se incubaron con los anticuerpos secundarios específicos para cada anticuerpo primario durante 2 h a temperatura ambiente. Terminado este periodo, las membranas se lavaron con TBS-T 5 veces durante 10 min cada vez. Finalmente, la detección de las proteínas se realizó por quimioluminiscencia utilizando un kit comercial (Immobilon, Millipore) y placas radiográficas (BioMax, Kodak).

Las bandas obtenidas en la placa que corresponden a la proteína de interés fueron analizadas con un fotodocumentador de alta resolución (UVP Inc., Upland, CA, USA), en donde se determinó la densidad óptica (D.O.) de cada banda.

17.8. Análisis de la generación de ERO

Las células fueron incubadas con 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF) o con MitoSOX a 5 μ M durante 15 min para la detección de ERO a nivel citoplásmico o mitocondrial respectivamente. La oxidación del DCF por ERO emite una intensidad de fluorescencia en verde (λ excitación: 326 nm, una λ emisión: 432 nm) a diferencia del MitoSOX (λ excitación: 510 nm, una λ emisión: 580 nm) que se acumula específicamente en la mitocondria y al oxidarse por la presencia de ERO, emite una

fluorescencia en color rojo. Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 1% durante 30 min a 4°C. Finalmente las células se montaron sobre cubreobjetos con glicerol para ser analizadas por microscopia confocal y la fluorescencia se analizó con un foto-documentador de alta resolución (UVP, GelDoc-It Imaging System), reportando la fluorescencia por cada célula.

17.9 Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó con el programa Sigma plot (versión 11). Los datos se presentan como el promedio \pm Error estándar (EE). Se utilizó la prueba estadística t de Student para la comparación de los grupos experimentales. La significancia estadística se consideró a una $p < 0.05$.

18. Resultados

18.1. Características generales de los animales

El tratamiento de las ratas Wistar con sacarosa al 30% durante 24 semanas indujo un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.01$) de la frecuencia cardiaca, la presión arterial diastólica y sistólica y por lo tanto de la tensión arterial. Además, se encontró un aumento significativo en los niveles de TG, AGL, insulina y leptina en plasma, junto con el aumento en la acumulación del tejido adiposo intraabdominal. Por otro lado, el análisis del colesterol total no mostró diferencia significativa entre ambos grupos; sin embargo, el colesterol asociado a las HDL disminuyó de manera significativa ($p < 0.05$) en los animales tratados con sacarosa. En el peso corporal no hubo diferencia significativa (Tabla 3). La alteración de estos parámetros en el modelo animal de SM desarrollado por la administración de sacarosa al 30% refleja el cuadro clínico observado en pacientes con este padecimiento, lo cual lo convierte en un modelo de gran utilidad para investigar los mecanismos por los cuales el SM se asocia con enfermedades cardiovasculares.

Tabla 3. Características generales de los animales.

Variables	C	SM
Peso corporal (g)	488.0 ± 19.1	477.0 ± 31.7
Frecuencia cardiaca (lat/min)	351.9 ± 5.2	371.9 ± 2.2**
Presión arterial sistólica (mm/Hg)	111.7 ± 2.3	130.2 ± 2.9**
Presión arterial diastólica (mm/Hg)	69.0 ± 2.7	97.8 ± 3.9**
Tensión arterial media (mm/Hg)	82.8 ± 2.4	108.7 ± 3.4**
Grasa intraabdominal (g)	7.4 ± 2.2	15.3 ± 2.6 *
Triglicéridos (mM)	0.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1 **
Glucosa (mM)	5.9 ± 0.1	5.9 ± 0.2
Colesterol total (mM)	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1
Colesterol-HDL (mg/dL)	42.65 ± 3.5	28.1 ± 4.1*
AGL (mM)	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.1 **
Insulina (pM)	99.6 ± 5.1	167.6 ± 7.8**
Leptina (ng/ml)	0.6 ± 0.2	2.7 ± 0.3**

Los valores fueron expresados como el promedio \pm EE de 7 animales diferentes (n=7). Los valores de todas las variables fueron obtenidos al final del periodo del tratamiento. Los triglicéridos, glucosa, colesterol, AGL, insulina y leptina fueron determinados en plasma. *p<0.05 SM vs C. **p<0.01 SM vs C. C: Control, SM: Síndrome Metabólico, AGL: Ácidos grasos libres.

18.2. Proliferación de las CMLV

En la Figura 6 se observa que la cantidad de ADN que corresponde a las CMLV aisladas del modelo de SM aumenta significativamente (p<0.05) en comparación

con la cantidad de ADN de las CMLV aisladas de animales controles, esto en presencia de 10% de SFB. El aumento en la cantidad de ADN a través del tiempo (24, 48, 72, 96 y 120 h) reflejó mayor proliferación de las CMLV aisladas del modelo de SM de un 18%, 55%, 40%, 89% y 95%, respectivamente, comparado con CMLV de animales control.

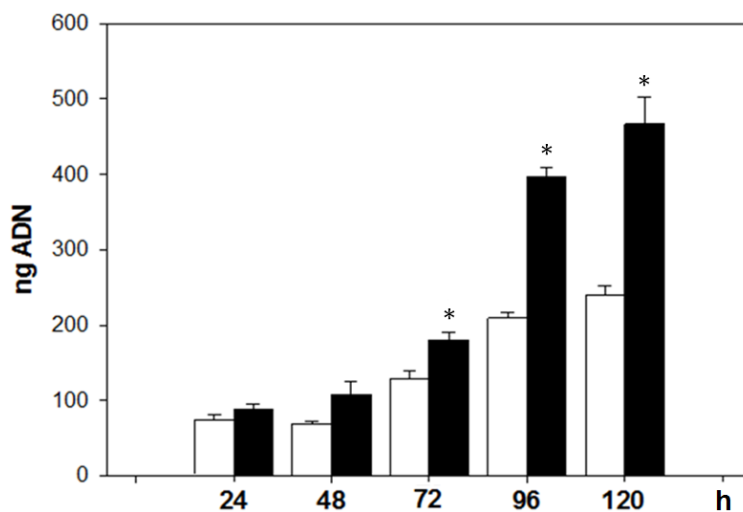


Figura 6. La proliferación de las CMLV de ratas control (barras abiertas) y con SM (barras negras) en presencia de 10% de SFB fue determinada cuantificando la cantidad de ADN por fluorescencia utilizando el DAPI (0.5 μ M). Las CMLV fueron cultivadas a diferentes tiempos de crecimiento: 24, 48, 72, 96 y 120 h. Los valores corresponden al promedio de la cantidad de ADN ng/pozo (1.9 cm²) \pm EE (n=6 experimentos independientes y cada experimento corresponde a un animal diferente).

*p<0.05 corresponde a C vs SM.

18.3. Participación de ERO en la proliferación de las CMLV

Para elucidar la participación de la generación de ERO en la proliferación celular se utilizaron diferentes compuestos inhibidores de las fuentes de ERO y atrapadores de ERO en las células: el DPI y la apocinina (APO) se utilizaron como inhibidores de la NADPH oxidasa (Figura 7), el tempol y mitotempo como atrapadores de anión

superóxido a nivel citoplasmático y a nivel de la mitocondrial respectivamente (Figura 8).

Con el DPI a 5 μM se bloqueó la proliferación en un 32% en las células aisladas del modelo de SM a 72 h (Figura 7A). Después de 120 h, ambas concentraciones, 5 y 10 μM de DPI, disminuyeron el ADN al 40% en CMLV control y 70% en las CMLV SM, respectivamente (Figura 7A).

En cuanto a la inhibición de NADPH oxidasa con la apocinina (Figura 7B), se observó la inhibición en el crecimiento celular de un 45% en el modelo de SM a 120 h y en un 20% la proliferación de células controles a 120 h.

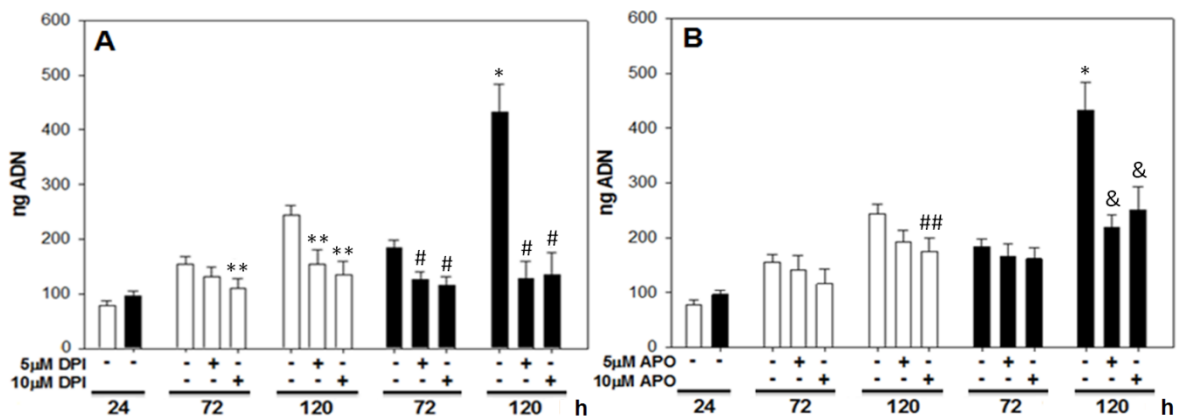


Figura 7. Inhibición de la actividad de la NADPH oxidasa con DPI (A) y APO (B) sobre la proliferación de las CMLV de ratas C (barras abiertas) y SM (barras negras) cultivadas durante 72 y 120 h a 5 y 10 μM de cada compuesto. Los valores corresponden al promedio de la cantidad de ADN ng/pozo \pm EE (n=3 experimentos independientes y cada experimento corresponde a un animal diferente). * $p < 0.05$ C vs SM, ** $p < 0.05$ C vs C + DPI, # $p < 0.05$ SM vs SM + DPI, ## $p < 0.05$ C vs C + APO, & $p < 0.05$ SM vs SM + APO.

Al incubar las CMLV con Tempol, atrapador del $O_2^{\cdot-}$ a nivel citosólico se observó una inhibición significativa de la proliferación celular a las 72 y 120 h, tanto en células controles (70%) como en las CMLV aisladas del modelo de SM (65%) (Figura 8A). Cuando las células fueron incubadas con mitotempo, como atrapador de $O_2^{\cdot-}$ el cual actúa específicamente en la mitocondria, se observó un mayor efecto inhibitor de la proliferación de las células aisladas del modelo de SM tanto a 72 h como a 120 h al disminuir de manera significativa ($p < 0.05$) la proliferación al 70%, mientras que en las células aisladas de animales control solamente reduce la proliferación al 30% a 72 y 120 h (Figura 8B).

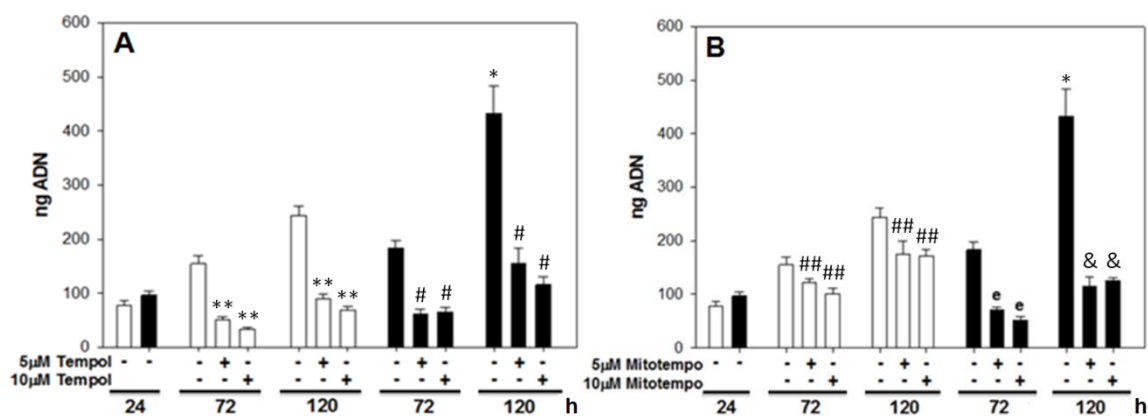


Figura 8. Efecto del Tempol (A) y Mitotempo (B) sobre la proliferación de las CMLV de ratas C (barras abiertas) y SM (barras negras) cultivadas durante 72 y 120 h a 5 y 10 μ M de cada compuesto. Los valores corresponden al promedio de la cantidad de ADN ng/pozo \pm EE ($n=3$ experimentos independientes). * $p < 0.05$ C vs SM, ** $p < 0.05$ C vs C + Tempol, # $p < 0.05$ SM vs SM + Tempol, ## $p < 0.05$ C vs C + Mitotempo, & $p < 0.05$ SM vs SM + Mitotempo.

18.4. Generación de ERO en las CMLV

El MitoSox y el DCF fueron utilizados para evaluar la generación de ERO a nivel mitocondrial y citosólico, respectivamente. En la Figura 9 se observa un incremento

significativo ($p < 0.05$) en la fluorescencia del DCF en células aisladas del modelo de SM (46%) en comparación con las células control.

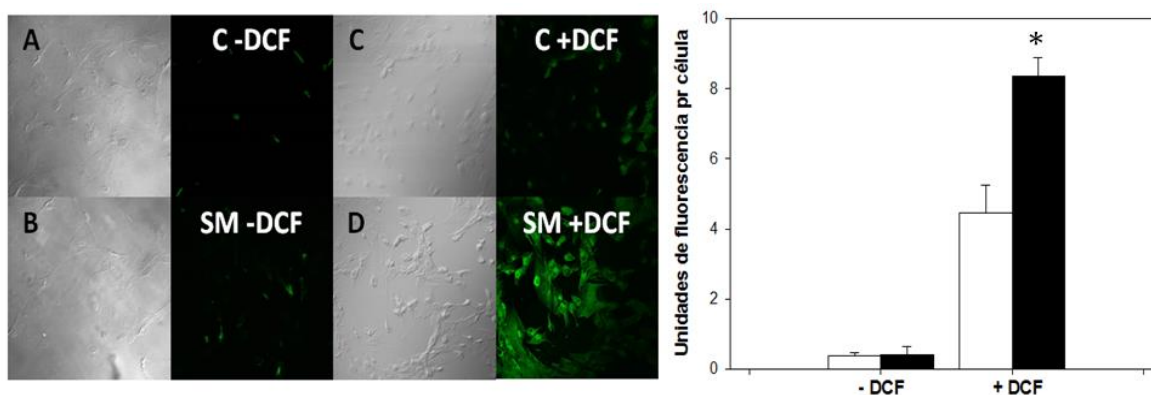


Figura 9. Generación de ERO a nivel citosólico en las CMLV de ratas control (barras abiertas) y con SM (barras negras) analizadas por microscopia confocal. Los valores corresponden a la intensidad de fluorescencia emitida por célula \pm EE ($n=3$ experimentos independientes). Paneles A, B, C y D corresponden a las imágenes de microscopia óptica de C y SM sin DCF, C+DCF y SM+DCF respectivamente. * $p < 0.05$ corresponde a C vs SM.

La participación de la mitocondria como fuente generadora de ERO se evaluó incubando las células con el fluoroforo MitoSox, que se acumula específicamente en la matriz mitocondrial debido a su carga positiva; su oxidación en presencia del anión superóxido emite fluorescencia en color rojo. En las imágenes de microscopia (Figura 10), ambos cultivos primarios de las CMLV control y SM sin MitoSox emiten fluorescencia intrínseca que no presenta diferencia significativa entre ambas células. Cuando las células fueron incubadas con MitoSox, la intensidad de fluorescencia fue 48% significativamente ($p < 0.05$) más intensa en células aisladas del modelo de SM en comparación con las células aisladas de animales controles.

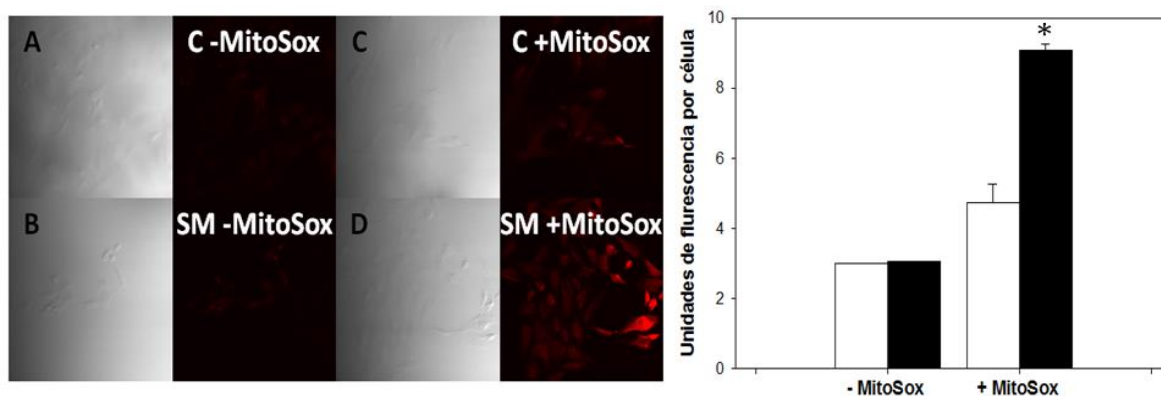


Figura 10. Generación de ERO a nivel mitocondrial en las CMLV de ratas control (barras abiertas) y con SM (barras negras) analizadas por microscopia confocal. Los valores corresponden a la intensidad de fluorescencia emitida por célula \pm EE (n=3 experimentos independientes). Paneles A, B, C y D corresponden a las imágenes de microscopia óptica de C-DCF, SM-DCF, C+DCF y SM+DCF respectivamente. * $p < 0.05$ corresponde a C vs SM.

18.5. Análisis del contenido de ciclofilina A, receptor de ciclofilina A (CD147) y ERK 1/2

La Figura 11A muestra la abundancia de CyPA, la cual en condiciones no confluentes tuvo un aumento significativo ($p < 0.05$) en las CMLV del modelo de SM en comparación con las CMLV controles. Cuando las CMLV llegan a confluencia, el contenido de esta proteína aumenta tanto en células, SM (32%) y control (40%), en comparación con su estado no confluyente.

En cuanto al contenido de CD147 (Figura 11B), en condiciones no confluentes se observó un incremento significativo ($p < 0.05$) en células aisladas del modelo de SM en comparación con los controles; sin embargo, en estado de confluencia, el contenido de esta proteína aumentó en ambos tipos celulares sin mostrar diferencia entre ambos grupos experimentales.

Con respecto al contenido de ERK 1/2, éste fue el mismo para células SM y controles en condiciones confluentes y no confluentes (Figura 11C).

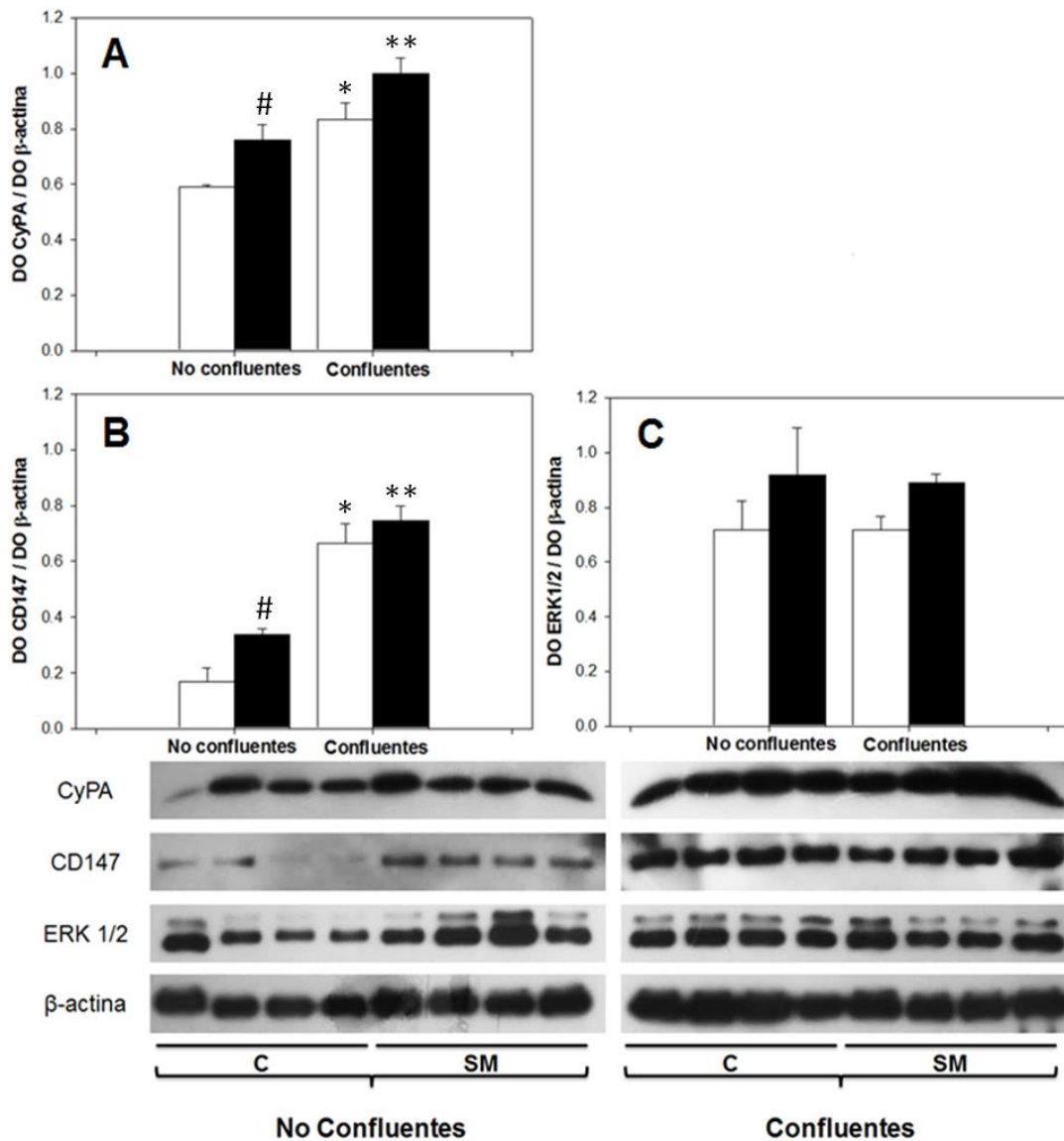


Figura 11. Análisis por Western blot de ciclofilina A (CyPA: 17kDa), receptor de ciclofilina A (CD147: 55 kDa) y ERK 1/2 (46 kDa) en las CMLV (C barras abiertas, SM barras negras) durante estado de crecimiento no confluyente (72 h) y estado confluyente (120 h). Los valores corresponden al cociente de la densidad óptica (D.O.) de CyPA/D.O. β -actina; D.O. CD147/D.O. β -actina; D.O. ERK1-2/D.O. β -actina \pm EE (n=4 animales diferentes). * p <0.05 C no confluyente vs SM no confluyente, ** p <0.05 C no confluyente vs C confluyente, # p <0.05 SM no confluyente vs SM confluyente.

18.6. Proteínas de fenotipo contráctil

Las CMLV se caracterizan por la expresión de varias proteínas de fenotipo contráctil, como caldesmona, α -actina y la miosina de cadena ligera fosforilada, las cuales dependen del estado de crecimiento de la célula. Al evaluar estas proteínas en dos condiciones de crecimiento, no confluentes (72 h) y confluentes (120 h), observamos que el contenido de caldesmona (Figura 12A) fue menor en condiciones de no confluencia, comparado con el estado confluyente, tanto en células controles como en células aisladas del modelo de SM. Además, en estado de no confluencia, la caldesmona es significativamente menor ($p < 0.05$) en las CMLV de animales con SM con respecto a los controles. Esta diferencia entre células SM y control se pierde a las 120 h.

Con respecto al contenido de α -actina (Figura 12B), el análisis de la D.O. mostró un incremento significativo ($p < 0.05$) de su contenido en estado confluyente comparado con el estado no confluyente; sin embargo, no hubo diferencia entre ambos grupos experimentales.

El contenido de miosina de cadena ligera fosforilada fue significativamente menor ($p < 0.05$) en las CMLV aisladas del modelo de SM en condiciones no confluentes. En estado confluyente, la cantidad de miosina fosforilada aumentó en las CMLV aisladas del modelo de SM en comparación con células controles (Figura 12C).

La cantidad de GAPDH no mostró diferencia significativa entre las CMLV controles y con SM en condiciones confluentes. En condiciones confluentes, el contenido de GAPDH incrementó significativamente ($p < 0.05$) en células aisladas del modelo de SM (Figura 12D).

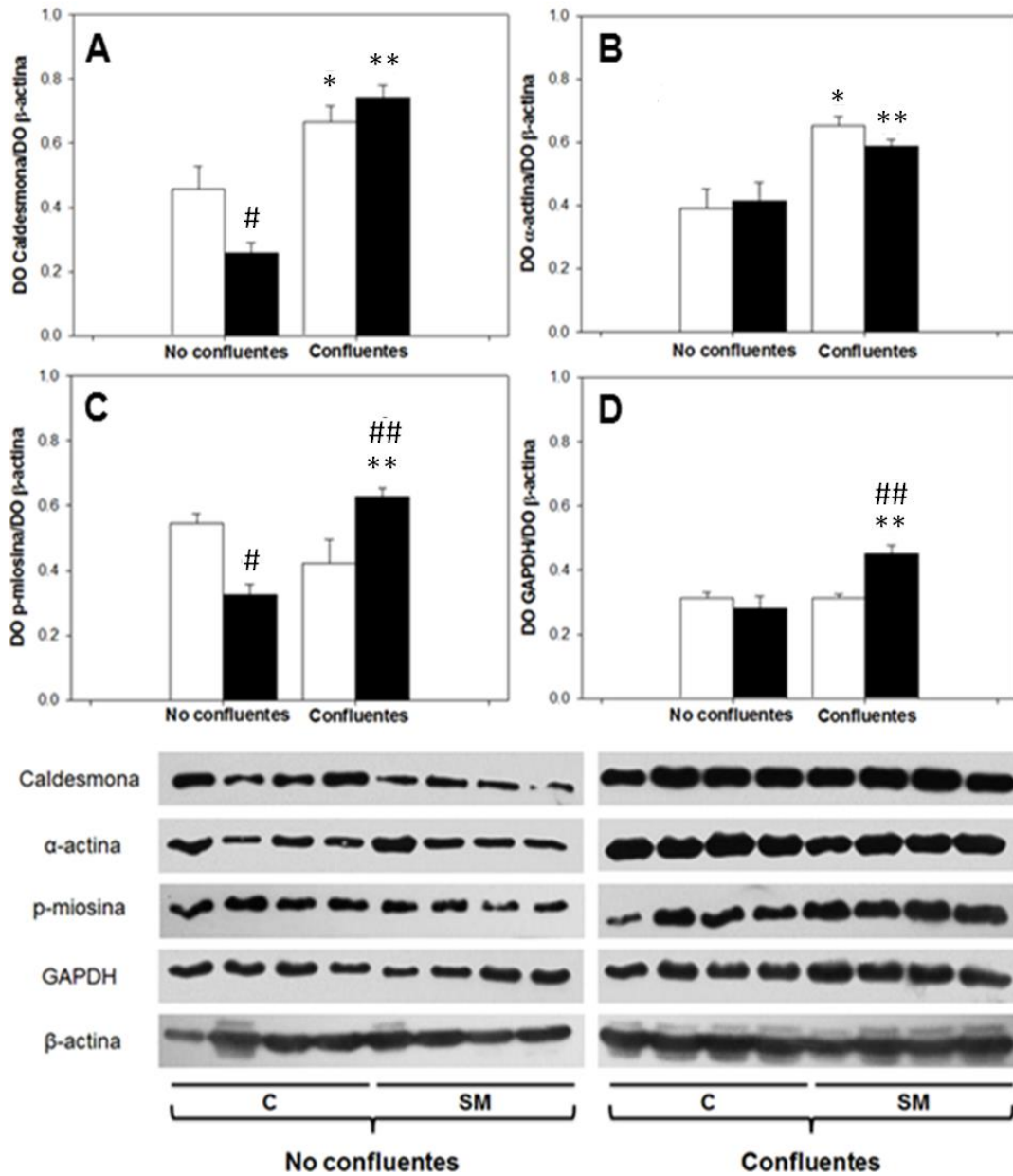


Figure 12. Análisis del contenido de caldesmona (70 kDa), α-actina (37 kDa), miosina de cadena ligera fosforilada (p-miosina: 50kDa) y GAPDH (37kDa) en las CMLV (C barras abiertas, SM barras negras) en estado de crecimiento condiciones no confluentes (72 h) y en condiciones confluentes (120 h). Los valores corresponden al cociente de la D.O. Caldesmona/D.O. β-actina; D.O. α-actina/D.O. β-actina; D.O. p-miosina/D.O. β-actina y D.O. GAPDH/D.O. β-actina ± EE (n=4 animales diferentes). *p<0.05 C no confluentes vs SM no confluyente, **p<0.05 C no confluyente vs C confluyente, #p<0.05 SM no confluyente vs SM confluyente, ##p<0.05 C confluyente vs SM confluyente.

19. Discusión

El objetivo de este trabajo fue investigar el mecanismo por el cual las ERO endógenas participan en el cambio de fenotipo y proliferación de las CMLV aisladas de un modelo de SM inducido con una dieta alta en sacarosa. En este modelo, nuestro grupo de trabajo ha reportado que hay un incremento en la generación de ERO en diferentes tejidos, incluyendo el tejido vascular [70]. Los resultados de las características del modelo muestran que las ratas que consumieron sacarosa tienen alteraciones metabólicas, como el aumento en la presión arterial diastólica y sistólica, en la frecuencia cardíaca, el tejido adiposo, los TG, la leptina e insulina, los cuales son factores asociados al aumento de las ERO, moléculas que participan en el desarrollo de ECV [135]. La proliferación y migración de las CMLV son procesos fisiológicos en respuesta a una condición patológica como el SM, asociado con hiperglucemia, hiperlipidemia, hipertensión y diabetes [136, 137]. Estas alteraciones patológicas son caracterizadas por presentar estrés oxidante asociado al aumento de la generación de ERO. Cuando la concentración basal de ERO aumenta y excede la defensa antioxidante, también puede inducir alteraciones del estado redox intracelular por la modificación de los índices GSH/GSSG y NAD(P)/NAD(P)H involucrados en la interacción entre proteínas de señalización y en la activación o inhibición de varias proteínas relacionadas con la proliferación y muerte celular [138, 139].

La diferencia en la proliferación entre las CMLV controles y SM fue debido probablemente a una mayor generación de ERO en el SM, tal como se ha propuesto en otros trabajos [26, 140]. La participación de ERO en la proliferación de la CMLV ha sido evidenciada utilizando diferentes compuestos que atrapan o inhiben las

fuentes de ERO. Al utilizar el DPI como un inhibidor de la NADPH oxidasa, se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) en la cantidad de ADN tanto en CMLV de animales controles como SM a 72 y 120 h, teniendo un mayor efecto sobre las células de SM, sugiriendo un efecto citostático. Cabe mencionar, que este compuesto aunque es ampliamente utilizado como inhibidor de la NADPH oxidasa, también se ha reportado que es capaz de inhibir otras enzimas importantes como la NADPH ubiquinona oxidoreductasa, la sintasa de óxido nítrico, la xantina oxidasa, la NADPH citocromo P450 oxidoreductasa y las colinesterasas, que pueden estar involucradas en la supervivencia celular [141].

La apocinina también es un inhibidor de la NADPH oxidasa [142], pero a diferencia del DPI, la apocinina lo hace específicamente impidiendo la unión de $p47^{\text{phox}}$ y $p67^{\text{phox}}$ con $gp91^{\text{phox}}$ subunidades de la NADPH oxidasa, sin afectar otras proteínas que pueden ser fundamentales para la vida celular [143]. Al incubar las CMLV con apocinina se observó una inhibición del crecimiento celular en células aisladas del modelo de SM sin causar disminución en la concentración de ADN por debajo a la observada a 24 h, sugiriendo que no tiene un efecto citolítico y que la participación de la NADPH oxidasa como generadora de ERO juega un papel fundamental en el mecanismo de proliferación de CMLV de la aorta del modelo de SM.

El tempol es un compuesto que funciona como atrapador del radical superóxido permeable a las membranas biológicas y favorece el metabolismo de una amplia variedad de ERO, reduciendo el estrés oxidante [144, 145]. Su efecto sobre el crecimiento de las CMLV aisladas tanto de animales controles como del modelo de SM, sugiere la participación del anión superóxido, como molécula fundamental en el mecanismo de proliferación.

A diferencia del tempol, el mitotempo tiene un grupo catiónico lipofílico llamado trifenilfosfonio que lo hace específico a la mitocondria [146]. Su efecto inhibitorio sobre la proliferación de las CMLV aisladas del modelo de SM indica que el radical superóxido que se genera a nivel mitocondrial participa de manera importante en la proliferación de las CMLV aisladas del modelo de SM.

Los experimentos para determinar la generación de ERO a nivel mitocondrial, utilizando MitoSox, el cual se acumula específicamente en la mitocondria y reacciona con el anión superóxido [147], indican un aumento en la generación de anión superóxido en las CMLV aisladas del modelo de SM con respecto a las células controles.

En un estudio previo se reportó que en mitocondrias aisladas de hígado de animales con una dieta alta en sacarosa hay un aumento en la generación de ERO, asociados a alteraciones en el metabolismo de lípidos, tales como TG y AGL, que se encuentran aumentados en el modelo de SM [140].

En CMLV de aorta del modelo de SM, las ERO pueden estar regulando los factores de transcripción que controlan la expresión génica asociada con la proliferación, como por ejemplo de la proteína AP-1 (proteína activadora 1) [148, 149].

Uno de los mecanismos propuestos para explicar la proliferación de las CMLV asociado con la liberación de ERO ha sido la secreción de varias proteínas denominadas SOXF (secreted oxidative stress-induced factors), entre ellas se encuentra la ciclofilina A (CyPA). La secreción de CyPA, es un mecanismo que involucra varias proteínas que participan en procesos de remodelación del citoesqueleto y en la formación de vesículas necesarias para la secreción de esta proteína [150]. La CyPA se une a su receptor CD147, el cual está sobre expresado

en las CMLV de aorta del modelo de SM. Esta unión puede estimular vías como JAK, Akt, ERK1/2 y promover la proliferación celular [151].

Nuestros resultados muestran que el contenido de CyPA es mayor en células aisladas del modelo de SM en estado de crecimiento (no confluentes), indicando que hay un aumento en la disponibilidad de CyPA para ser secretada al espacio extracelular e interactuar con su receptor CD147, que también está aumentado para inducir la activación de ERK1/2 y promover la biosíntesis de ADN. La participación directa de ERO en la expresión y secreción de CyPA no fue evaluada. Sin embargo, el bloqueo de la proliferación por la inhibición de la generación de ERO a nivel mitocondrial y de la NADPH oxidasa sugiere otros experimentos para evidenciar la participación de ERO en la expresión de CyPA, CD147 y ERK1/2 y su relación con la proliferación celular.

El fenotipo contráctil de las CMLV está caracterizado por la expresión de proteínas como la α -actina, la caldesmona y la miosina de cadena ligera fosforilada, así como la disminución en la proliferación. En estados patológicos la expresión de estas proteínas se ve disminuida y aumenta el rango de proliferación [152]. Nuestros resultados muestran que cuando las CMLV se encuentran en crecimiento (fase no confluyente), pierden parcialmente su fenotipo. Esto se reflejó en una disminución en el contenido de las proteínas de fenotipo contráctil y, cuando llegan a confluencia y el rango de proliferación disminuye, recuperan el fenotipo contráctil al aumentar la expresión de estas proteínas. Sin embargo, el contenido de caldesmona y p-miosina es bajo en células aisladas del modelo de SM en estado no confluyente, lo cual puede estar relacionado con una disminución en el fenotipo contráctil de las CMLV de la aorta SM y al aumento en la generación de ERO.

El aumento en el contenido de p-miosina en estado confluyente en las CMLV aisladas del modelo de SM puede estar relacionado con el incremento en la vasoconstricción encontrado en anillos de aorta y asociado con la hipertensión que caracteriza a las ratas con SM, además se ha descrito que participa en procesos de proliferación y migración de las CMLV [153].

La α -actina es una proteína que participa de manera importante en el proceso de contracción. En las células controles y SM no se observaron diferencias significativas, sin embargo, su contenido aumenta en condiciones confluentes, lo que indica que al llegar a confluencia las células tienden a recuperar su fenotipo contráctil. Con respecto al GAPDH, el cual es utilizado ampliamente como un gen de referencia o una proteína de control de carga, en las células aisladas del modelo de SM se encontró incrementado el contenido de esta proteína debido probablemente a que está involucrada en muchas funciones celulares, entre ellas la glucólisis por lo que en este modelo que implica la ingesta de sacarosa, el metabolismo glucolítico se encuentra modificado. Además, el aumento en el contenido de GAPDH se ha asociado con procesos de proliferación en algunos tipos de células tumorales, lo cual puede apoyar la idea de que el mecanismo de proliferación es mayor en las células aisladas del modelo de SM [154].

20. Conclusiones

Las CMLV del modelo de SM tienen mayor proliferación debido al aumento en la generación de anión superóxido a nivel de la NADPH oxidasa y de la mitocondria. Además, las ERO aumentan el contenido de CyPA intracelular, que puede actuar a través de su receptor CD147 para promover la proliferación de las CMLV aisladas del modelo de SM, disminuyendo la expresión de proteínas de fenotipo contráctil. Como consecuencia, las ERO generadas debido a las alteraciones del modelo de SM participan en el proceso de proliferación de las CMLV por un mecanismo asociado a la CyPA, este aumento de la proliferación se reflejó en un cambio de fenotipo asociado a la disminución de las proteínas de fenotipo contráctil.

21. Perspectivas

Evaluar el efecto de las ERO sobre el cambio de fenotipo contráctil de las CMLV y sobre la secreción de ciclofilina A, además de otras proteínas involucradas en el mecanismo de proliferación como ERK 1/2, Akt y JAK. Además de analizar la acción directa de la ciclofilina A sobre la proliferación de las CMLV.

22. Referencias

- [1] Doran AC, Meller N, et al. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008; 28(5): 812-819.
- [2] Vona R, Gambardella L, et al. Biomarkers of oxidative stress in metabolic syndrome and associated diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 2019; 2019: 8267234.
- [3] Sack MN, Fyhrquist FY, et al. Basic biology of oxidative stress and the cardiovascular system: Part 1 of a 3-Part Series. *J Am Coll Cardiol.* 2017; 70 (2): 196-211.
- [4] Yung LM, Leung FP, et al. Reactive oxygen species in vascular wall. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2006; 6(1): 1-19.
- [5] Clempus RE and Griending KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2006; 71(2): 216-225.
- [6] Satoh K, Nigro P, et al. Oxidative stress and vascular smooth muscle cell growth: A mechanistic linkage by cyclophilin A. *Antioxidant & Redox Signaling.* 2010; 12(5): 675-682.
- [7] Ruiz-Ramírez A, Ortiz-Balderas E, et al. Glycine restores glutathione and protects against oxidative stress in vascular tissue from sucrose-fed rats. *Clin Sci (Lond).* 2014; 126(1): 19-29.
- [8] Nolan CJ and Prentki M. Insulin resistance and insulin hypersecretion in the metabolic syndrome and type 2 diabetes: Time for a conceptual framework shift. *Diab Vasc Dis Res.* 2019; 16(2): 118-127.
- [9] Chedid R , Gannagé-Yared MH, et al. Impact of different metabolic syndrome classifications on the metabolic syndrome prevalence in a young Middle Eastern population. *Metabolism.* 2009; 58(6): 746-752.

- [10] Alberti, K. G., P. Zimmet, et al. The metabolic syndrome a new worldwide definition. *Lancet*. 2005; 366(9491): 1059-1062.
- [11] Grundy SM, Cleeman JI, et al. Diagnosis and management of the metabolic syndrome: an American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute Scientific Statement. *Circulation*. 2005; 112(17): 2735-2752.
- [12] Lone S, Lone K, et al. Assessment of metabolic syndrome in Kashmiri population with type 2 diabetes employing the standard criteria's given by WHO, NCEPATP III and IDF. *J Epidemiol Glob Health*. 2017; 7(4): 235-239.
- [13] Levesque J and Lamarche B. The metabolic syndrome: Definitions, prevalence and management. *J Nutrigenet Nutrigenomics*. 2008; 1 (3): 100–108.
- [14] Chow WS, Cheung BM, et al. Hypoadiponectinemia as a predictor for the development of hypertension: a 5-year prospective study. *Hypertension*. 2007; 49(6): 1455-1461.
- [15] Guize L, Pannier B, et al. Recent advances in metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Arch Cardiovasc Dis*. 2008; 101(9): 577-583.
- [16] Zhang X, Yan SM, et al. A mechanism underlying hypertensive occurrence in the metabolic syndrome: cooperative effect of oxidative stress and calcium accumulation in vascular smooth muscle cells. *Horm Metab Res*. 2014; 46(2): 126-132.
- [17] Smith SC Jr. Multiple risk factors for cardiovascular disease and diabetes mellitus. *Am J Med*. 2007; 120(3 Suppl 1): S3-S11.
- [18] Li JKJ. Dynamics of the vascular system. *World Scientific Publishing*. 2004; 1: 14.

- [19] Oláiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, *et al.* Encuesta nacional de salud y nutrición 2006. Cuernavaca, México: Instituto Nacional de Salud Pública, 2006.
- [20] Sugamura K and Keaney JF Jr. Reactive oxygen species in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med.* 2011; 51(5): 978-992.
- [21] Shayganni E, Bahmani M, *et al.* Inflammaging and cardiovascular disease: Management by medicinal plants. *Phytomedicine.* 2015; 23(11): 1119-1126.
- [22] Montezano AC and Touyz RM. Molecular mechanisms of hypertension--reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. *Can J Cardiol.* 2012; 28(3): 288-295.
- [23] Schiffrin EL. The immune system: role in hypertension. *Can J Cardiol.* 2013; 29(5): 543-548.
- [24] Schiffrin EL. Immune mechanisms in hypertension and vascular injury. *Clin Sci (Lond).* 2014; 126(4): 267-274.
- [25] Tengattini S, Reiter RJ, *et al.* Cardiovascular diseases: protective effects of melatonin. *J Pineal Res.* 2008; 44(1):16-25.
- [26] Kim Y and Je Y. Prospective association of sugar-sweetened and artificially sweetened beverage intake with risk of hypertension. *Arch Cardiovasc Dis.* 2016; 109(4): 242-253.
- [27] Cao W, Zhang D, *et al.* Biomechanical stretch induces inflammation, proliferation, and migration by activating NFAT5 in arterial smooth muscle cells. *Inflammation.* 2017; 40(6): 2129-2136.
- [28] Álvarez MI, Ciudad P, *et al.* Differences in TRPC3 and TRPC6 channels assembly in mesenteric vascular smooth muscle cells in essential hypertension. *J Physiol.* 2017; 595(5):1497-1513.

- [29] Janoudi A, Shamoun FE, et al. Cholesterol crystal induced arterial inflammation and destabilization of atherosclerotic plaque. *Eur Heart J*. 2016; 37(25): 1959-1967.
- [30] Gimbrone MA Jr and García-Cardeña G. Endothelial cell dysfunction and the pathobiology of atherosclerosis. *Circ Res*. 2016; 118(4): 620-636.
- [31] Abed J, Fadi ES, et al. Cholesterol crystal induced arterial inflammation And destabilization of atherosclerotic plaque. *Eur J Heart*. 2016; 37: 1959–1967.
- [32] Kattoor AJ, Pothineni NVK, et al. Oxidative stress in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2017; 19: 42.
- [33] Johnson JL. Metalloproteinases in atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2017; 816: 93-106.
- [34] Kozuch PL and Brandt LJ. Review article: diagnosis and management of mesenteric ischaemia with an emphasis on pharmacotherapy. *Aliment Pharmacol Ther*. 2005; 21(3): 201-215.
- [35] Bagur R, Tanguy S, et al. The impact of cardiac ischemia/reperfusion on the mitochondria-cytoskeleton interactions. *Biochim Biophys Acta*. 2016; 1862(6):1159-1171.
- [36] Buja LM and Vander Heide RS. Pathobiology of cardiovascular diseases: past, present, and future perspectives. *Cardiovasc Pathol*. 2016; 25(3): 214-220.
- [37] Braunersreuther V and Jaquet V. Reactive oxygen species in myocardial reperfusion injury: from physiopathology to therapeutic approaches. *Curr Pharm Biotechnol*. 2012; 13(1): 97-114.
- [38] Eltzschig HK and Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med*. 2011; 17(11): 1391-1401.

- [39] Voelter M, Mahlknecht S. Epigenetic associations in relation to cardiovascular prevention and therapeutics. *Clin Epigenetics*. 2016; 8: 4.
- [40] Nishat S, Khan LA, et al. Adenosine A3 receptor: A promising therapeutic target in cardiovascular disease. *Curr Cardiol Rev*. 2016; 12(1): 18-26.
- [41] Ajith TA and Jayakumar TG. Mitochondria-targeted agents: Future perspectives of mitochondrial pharmaceuticals in cardiovascular diseases. *World J Cardiol*. 2014; 6(10): 1091-1099.
- [42] Valko M, Leibfritz D, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2007; 39: 44-89.
- [43] Paravicini TM and Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008; 31: S170-S180.
- [44] Martin SS, Qasim A, et al. Leptin resistance: A possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol*. 2008; 52(15): 1201-1210.
- [45] Abdul-Aziz A, MacEwan DJ, et al. Oxidative stress responses and NRF2 in human leukaemia. *Oxid Med Cell Longev*. 2015; 2015: 454659.
- [46] Konigsberg Fainstein M. 2008. Radicales libre y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas. Capítulo 33: ERO y señalización. Ciudad de México. El Manual Moderno. 487-500.
- [47] da Costa RM, Rodrigues D, et al. Nrf2 as a potential mediator of cardiovascular risk in metabolic diseases. *Front Pharmacol*. 2019; 10: 382.
- [48] Turpaev KT. Reactive oxygen species and regulation of gene expression. *Biochemistry (Mosc)*. 2002; 67(3): 281-292.

- [49] Higashi Y, Noma K, et al. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J.* 2009; 73(3): 411-418.
- [50] Song Y, Qin X, et al. Effects of integrin $\alpha 5\beta 1$ on the proliferation and migration of human aortic vascular smooth muscle cells. *Mol Med Rep.* 2016; 13 (2): 1147-1155.
- [51] Xu S, Chamseddine AH, et al. Nox4 NADPH oxidase contributes to smooth muscle cell phenotypes associated with unstable atherosclerotic plaques. *Redox Biol.* 2014; 2: 642-650.
- [52] Altenhöfer S, Radermacher KA, et al. Evolution of NADPH oxidase inhibitors: Selectivity and mechanisms for target engagement. *Antioxid Redox Signal.* 2015; 23(5): 406-427.
- [53] Thomas LL, Stanislas M, et al. Targeting and regulation of reactive oxygen species generation by Nox family NADPH oxidases. *Antioxid Redox Signal.* 2009; 11: 10.
- [54] Filip-Ciubotaru F, Manciu C, et al. NADPH oxidase: structure and activation mechanisms (review). Note I. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 2016; 120(1): 29-33.
- [55] Magnani F and Mattevi A. Structure and mechanisms of ROS generation by NADPH oxidases. *Curr Opin Struct Biol.* 2019; 59: 91-97.
- [56] Sumimoto H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J.* 2008; 275(13): 3249-3277.
- [57] Taniyama Y and Griendling KK. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. *Hypertension.* 2003; 42(6): 1075-1081.

- [58] Perez-Vizcaino F, Cogolludo A, et al. Reactive oxygen species signaling in pulmonary vascular smooth muscle. *Respir Physiol Neurobiol*. 2010; 174 (3): 212-220.
- [59] Xin Wang, António Pinto-Duarte, et al. How Nox2-containing NADPH oxidase affects cortical circuits in the NMDA receptor antagonist model of schizophrenia. *Antioxid Redox Signal*. 2013 Apr 20; 18(12): 1444–1462.
- [60] Kausar S, Wang F, et al. The role of mitochondria in reactive oxygen species generation and its implications for neurodegenerative diseases. *Cells*. 2018; 7(12): E274.
- [61] Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol*. 2003; 552 (2): 335-344.
- [62] Kudryavtseva AV, Krasnov GS, et al. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and cancer. *Oncotarget*. 2016; 7(29): 44879-44905.
- [63] Adam-Vizi V and Chinopoulos Ch. Bioenergetics and the formation of mitochondrial reactive oxygen species. *Trends Pharmacol Sci*. 2006; 27(12): 639-645.
- [64] Brookes PS. Mitochondrial H⁺ leak and ROS generation: An odd couple. *Free Radic Biol Med*. 2005; 38(1): 12-23.
- [65] Larosa V and Remacle C. Insights into the respiratory chain and oxidative stress. *Biosci Rep*. 2018; 38(5): BSR20171492.
- [66] Yuanbin Liu and David R Schubert. The specificity of neuroprotection by antioxidants. *J Biomed Sci*. 2009; 16(1): 98.
- [67] Klisic A, Kocic G, et al. Nitric oxide products are not associated with metabolic syndrome. *J Med Biochem*. 2019; 38(3): 361-367.

- [68] Zurawska-Płaksej E, Grzebyk E, et al. Oxidatively modified forms of albumin in patients with risk factors of metabolic syndrome. *J Endocrinol Invest.* 2014; 37(9): 819-827.
- [69] Chávez R, Lascurain R, et al. Free radicals: problems and benefits. *Gac Méd Méx.* 1996; 132 (2): 183-195.
- [70] Ramana KV, Srivastava S, et al. Lipid peroxidation products in human health and disease 2016. *Oxid Med Cell Longev.* 2017; 2017: 2163285.
- [71] Cooke MS, Evans MD, et al. Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease. *FASEB J.* 2003;17(10): 1195-1214.
- [72] Curtis JM, Hahn WS, et al. Protein carbonylation and metabolic control systems. *Trends Endocrinol Metab.* 2012; 23(8): 399-406.
- [73] Ruiz A, Chávez MM, et al. High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP2 level, and proton leak in liver mitochondria. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2001; 301(6): E1198-E1207.
- [74] Inoguchi T, Li P, et al. High glucose level and free fatty acid stimulate reactive oxygen species production through protein kinase C--dependent activation of NAD(P)H oxidase in cultured vascular cells. *Diabetes.* 2000; 49(11): 1939-45.
- [75] Kuroda J and Sadoshima J. NADPH Oxidase and Cardiac Failure. *J Cardiovasc Transl Res.* 2010; 3(4): 314–320.
- [76] Chinen I, Shimabukuro M, et al. Vascular lipotoxicity: endothelial dysfunction via fatty-acid-induced reactive oxygen species overproduction in obese Zucker diabetic fatty rats. *Endocrinology.* 2007; 148(1): 160-165.

- [77] Zhang Y, Bharathi SS, et al. The fatty acid oxidation enzyme long-chain acyl-CoA dehydrogenase can be a source of mitochondrial hydrogen peroxide. *Redox Biol.* 2019; 26: 101253.
- [78] Bertelsen M, Änggard EE, et al. Oxidative stress impairs insulin internalization in endothelial cells in vitro. *Diabetologia.* 2001; 44: 605-613.
- [79] Yudkin JS, Stehouwer CD, et al. C-reactive protein in healthy subjects: associations with obesity, insulin resistance, and endothelial dysfunction: a potential role for cytokines originating from adipose tissue?. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19(6): 972-978.
- [80] Van Doorn C, Macht VA, et al. Leptin resistance and hippocampal behavioral deficits. *Physiol Behav.* 2017; 176: 207-213.
- [81] Rodríguez A, Gómez-Ambrosi J, et al. Leptin inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells induced by angiotensin II through nitric oxide-dependent mechanisms. *Mediators Inflamm.* 2010; 2010: 105489.
- [82] Gomart S, Gaudreau-Ménard C, et al. Leptin-induced endothelium-independent vasoconstriction in thoracic aorta and pulmonary artery of spontaneously hypertensive rats: Role of Calcium Channels and Stores. *PLoS One.* 2017; 12(1): e0169205.
- [83] Matsuzawa Y and Lerman A. Endothelial dysfunction and coronary artery disease: Assessment, prognosis and treatment. *Coron Artery Dis.* 2014; 25(8): 713–724.
- [84] Trovati M, Doronzo G, et al. Leptin and vascular smooth muscle cells. *Curr Pharm Des.* 2014; 20(4): 625-634.

- [85] Salabei JK and Hill BG. Autophagic regulation of smooth muscle cell biology. *Redox Biol.* 2015; 4: 97-103.
- [86] Wang DZ and Olson EN. Control of smooth muscle development by the myocardin family of transcriptional coactivators. *Curr Opin Genet Dev.* 2004; 14(5): 558-566.
- [87] Owens GK. Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells. *Physiol Rev.* 1995; 75: 487-517.
- [88] Jiang Q, Huang R, et al. Caldesmon regulates the mobility of vascular smooth muscle cells by modulating the actin cytoskeleton stability, *J Biomedic Sci.* 2010;17:6.
- [89] Zhang L, Staehr C, et al. The Na,K-ATPase in vascular smooth muscle cells. *Curr Top Membr.* 2019; 83:151-175.
- [90] Lin G, Fandel TM, et al. Modulation of smooth muscle tonus in the lower urinary tract: interplay of myosin light-chain kinase (MLCK) and MLC phosphatase (MLCP). *BJU Int.* 2011;108 (2 Pt 2); E66-E70.
- [91] Chen M, Zhang W, et al. Regulation of 130 kDa smooth muscle myosin light chain kinase expression by an intronic CArG element. *J Biol Chem.* 2013; 288(48): 34647-34657,
- [92] MacDnald JA and Walsh MP. Regulation of Smooth muscle myosin light chanin phosphatase by multisite phosphorylation of the myosin targeting subunit, MYPT1. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets.* 2018; 18(1): 4-13.
- [93] Watras JM: Músculo liso. Koeppen BM, Stanton BA eds. Berne y Levy Fisiología, 6ª Ed, pp. 268-85, Barcelona: Elsevier España; 2009.

- [94] Kang H, Liu Jiajia, et al. Vascular smooth muscle cell glycocalyx mediates shear stress-induced contractile responses via a Rho kinase (ROCK)-myosin light chain phosphatase (MLCP) pathway. *Sci.Rep.* 2017; 7: 42092.
- [95] Lin L, Xu C, et al. Rho A inactivation by S-nitrosylation regulates vascular smooth muscle contractive signaling. *Nitric Oxide.* 2018; 74: 56-64.
- [96] Menendez S. Histologia de músculo liso. 2015. <https://pt.slideshare.net/StefyLiz13/histologia-musculo-liso/5>.
- [97] MacKay CE and Knock GA. Control of vascular smooth muscle function by Src-family kinases and reactive oxygen species in health and disease. *J Physiol.* 2014; 593(17): 3815-3828.
- [98] Durgin BG and Straub AC. Redox control of vascular smooth muscle cell function and plasticity. *Lab Invest.* 2018; 98(10): 1254-1262.
- [99] Gopalakrishnan B, Nash KM, et al. Detection of nitric oxide and superoxide radical anion by electron paramagnetic resonance spectroscopy from cells using spin traps. *J Vis Exp.* 2012; 66: e2810.
- [100] Bäck M, Weber C, et al. Regulation of atherosclerotic plaque inflammation. *J Intern Med.* 2015; 278(5): 462-82.
- [101] Jackson AO, Regine MA, et al. Molecular mechanisms and genetic regulation in atherosclerosis. *Int J Cardiol Heart Vasc.* 2018; 21: 36–44.
- [102] Förstermann U, Xia N, et al. Roles of Vascular Oxidative Stress and Nitric Oxide in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Circ Res.* 2017; 120(4): 713-735.
- [103] Luo Z, Teerlink T, et al. Angiotensin II and NADPH oxidase increase ADMA in vascular smooth muscle cells. *Hypertension.* 2010; 56(3): 498-504.

- [104] Fiorentino TV, Prioletta A, et al. Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des.* 2013; 19(32): 5695-5703.
- [105] Varghese JF, Patel R, et al. Novel insights in the metabolic syndrome-induced oxidative stress and inflammation-mediated atherosclerosis. *Curr Cardiol Rev.* 2018; 14(1): 4-14.
- [106] Chiong M, Cartes-Saavedra B, et al. Mitochondrial metabolism and the control of vascular smooth muscle cell proliferation. *Front Cell Dev Biol.* 2014; 2: 72.
- [107] Owens GK, Kumar MS, et al. Molecular regulation of vascular smooth muscle cell differentiation in development and disease. *Physiol Rev.* 2004; 84: 767-801.
- [108] Huang CH, Ciou JS, et al. Identify potential drugs for cardiovascular diseases caused by stress-induced genes in vascular smooth muscle cells. *PeerJ.* 2016; 4: e2478.
- [109] Chen L, Fukuda N, et al. Increased complement 3 with suppression of miR-145 induces the synthetic phenotype in vascular smooth muscle cells From spontaneously hypertensive rats. *J Am Heart Assoc.* 2019; 8(10): e012327.
- [110] Qi M and Xin S. FGF signaling contributes to atherosclerosis by enhancing the inflammatory response in vascular smooth muscle cells. *Mol Med Rep.* 2019; 20(1): 162-170.
- [111] Chistiakov DA, Orekhov AN, et al. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol (Oxf).* 2015; 214(1): 33-50.
- [112] Cao RY, Eves R, et al. Effects of p53-knockout in vascular smooth muscle cells on atherosclerosis in mice. *PLoS One.* 2017;12(3): e0175061.

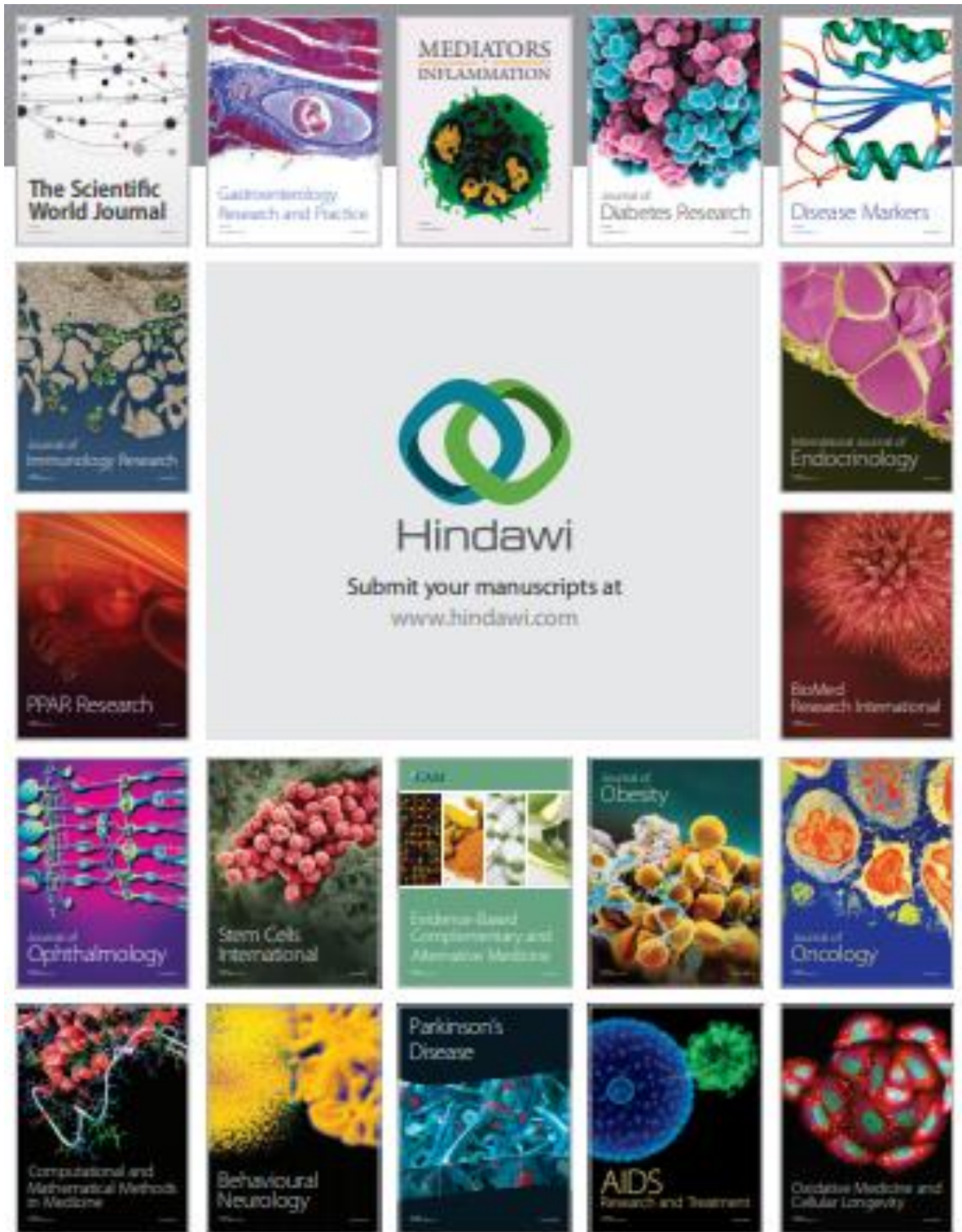
- [113] Leos Pleva, Pavel Kukla, et al. Treatment of coronary in-stent restenosis: a systematic review. *J Geriatr Cardiol.* 2018; 15(2): 173–184.
- [114] Farooq V. Restenosis: delineating the numerous causes of drug-eluting stent restenosis. *Circ Cardiovasc Interv.* 2011; 4: 195-205.
- [115] Zhu Y, Takayama T, et al. Restenosis inhibition and re-differentiation of TGF β /Smad3-activated smooth muscle cells by resveratrol. *Sci Rep.* 2017; 6(7): 41916.
- [116] Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, et al. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47(4): 333-343.
- [117] Satoh K, Matoba T, et al. Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation.* 2008; 117(24): 3088-3098.
- [118] Yang H, Li M, et al. Effects of cyclophilin A on cell proliferation and gene expressions in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells. *J Surg Res.* 2005; 123(2): 312-319.
- [119] Ravi M. Factors, mechanisms and implications of chromatin condensation and chromosomal structural maintenance through the cell cycle. *J Cell Physiol.* 2019: 29038.
- [120] Satoh K, Godo S, et al. Dual roles of vascular-derived reactive oxygen species- With a special reference to hydrogen peroxide and cyclophilin A. *J Mol Cell Cardiol.* 2014; 73: 50-56.
- [121] Mark W Majesky. Vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017; 36(10): e82-e86.

- [122] Braziene A, Tamsiunas A, et al. Association between the living environment and the risk of arterial hypertension and other components of metabolic syndrome. *J Public Health (Oxf)*. 2019: fdz046.
- [123] Fuchs T, Loureiro MP, et al. Animal models in metabolic syndrome. *Rev Col Bras Cir*. 2018; 45(5): e1975
- [124] Tsuneyama K, Nishitsuji K, et al. Animal models for analyzing metabolic syndrome-associated liver diseases. *Pathol Int*. 2017; 67(11): 539-546.
- [125] González Y, Castillo O, et al. Metabolic syndrome in Wistar rats induce by sucrose rich –diet. *Acta Bioquím Clín Latinoam*. 2015; 49 (3): 301-309.
- [126] Di Pasqua LG, Berardo C, et al. MCD diet-induced steatohepatitis is associated with alterations in asymmetric dimethylarginine (ADMA) and its transporters. *Mol Cell Biochem*. 2016; 419(1-2): 147-155.
- [127] El Hafidi M and Baños G. In vivo plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hypertension. *Hypertension*. 1997; 30(3 Pt 2): 624-628.
- [128] El Hafidi M, Valdez R, et al. Possible relationship between altered fatty acid composition of serum, platelets, and aorta and hypertension induced by sugar feeding in rats. *Clin Exp Hypertens*. 2000; 22(1): 99-108.
- [129] El Hafidi M, Pérez I, et al. Effect of sex hormones on non-esterified fatty acids, intra-abdominal fat accumulation, and hypertension induced by sucrose diet in male rats. *Clin Exp Hypertens*. 2006; 28(8): 669-681.
- [130] El Hafidi M, Cuéllar A, et al. Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal Delta9 and Delta5-desaturase activities. *J Nutr Biochem*. 2001; 12(7): 396-403.

- [131] Folch L, Lees M, et al. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957; 22: 697–709.
- [132] Nägele U, Hägele EO, et al. Reagent for the enzymatic determination of serum total triglycerides with improved lipolytic efficiency. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1984; 22: 165–174.
- [133] Brunk CF, Jones KC and James TW. Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates. *Anal Biochem.* 1979; 92(2): 497-500.
- [134] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-54.
- [135] Guzik TJ, Sadowski J, et al. Systemic regulation of vascular NAD(P)H oxidase activity and nox isoform expression in human arteries and veins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004; 24(9):1614-1620.
- [136] Tuan NQ, Lee DH, et al. Inhibition of proliferation of vascular smooth muscle cells by cucurbitanes from momordica charantia. *J Nat Prod.* 2017; 80(7): 2018-2025.
- [137] Min J, Weitian Z, et al. Correlation between insulin-induced estrogen receptor methylation and atherosclerosis. *Cardiovasc Diabetol.* 2016; 15(1): 156.
- [138] Lushchak VI. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem Biol Interact.* 2014; 224:164-175.
- [139] Chiu J and Dawes IW. Redox control of cell proliferation. *Trends Cell Biol.* 2012; 22(11): 592-601.
- [140] Tong X, Khandelwal AR, et al. Pro-atherogenic role of smooth muscle Nox4-based NADPH oxidase. *J Mol Cell Cardiol.* 2016; 92: 30-40.

- [141] Ostafin M, Pruchniak MP, et al. Different procedures of diphenyleneiodonium chloride addition affect neutrophil extracellular trap formation. *Anal Biochem.* 2016; 509: 60-66.
- [142] Sun Y, Gong F, et al. Therapeutic effect of apocynin through antioxidant activity and suppression of apoptosis and inflammation after spinal cord injury. *Exp Ther Med.* 2017; 13(3): 952-960.
- [143] Fuji S, Suzuki S, et al. The NADPH oxidase inhibitor apocynin suppresses preneoplastic liver foci of rats. *Toxicol Pathol.* 2017; 45(4): 544-550.
- [144] Abdallah DM, El-Abhar HS, et al. TEMPOL, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates gastric mucosal damage induced by ischemia/reperfusion: a key role for superoxide anion. *Eur J Pharmacol.* 2009; 603(1-3): 93-97.
- [145] Bernardy CCF, Zarpelon AC, et al. Tempol, a superoxide dismutase mimetic agent, inhibits superoxide anion-induced inflammatory pain in mice. *Biomed Res Int.* 2017; 2017: 9584819.
- [146] Trnka J, Blaikie FH, et al. Antioxidant properties of MitoTEMPOL and its hydroxylamine. *Free Radic Res.* 2009; 43(1): 4-12.
- [147] Zielonka J and Kalyanaraman B. Hydroethidine- and Mito-SOX-derived red fluorescence is not a reliable indicator of intracellular superoxide formation: Another inconvenient truth. *Free Radic Biol Med.* 2010; 48(8): 983-1001.
- [148] Clempus RE and Griending KK. Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 2006; 71(2): 216-225.
- [149] Lyle AN and Griending KK. Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species. *Physiology (Bethesda).* 2006; 21: 269-280.

- [150] Liao DF, Jin ZG, et al. Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 2000. 275(1): 189-196.
- [151] Dawar FU, Xiong Y, et al. Potential role of cyclophilin A in regulating cytokine secretion. *J Leukoc Biol*. 2017; 102(4): 989-992.
- [152] Wang CC, Gurevich I, et al. Insulin affects vascular smooth muscle cell phenotype and migration via distinct signaling pathways. *Diabetes*. 2003; 52(10): 2562-2569.
- [153] Qin B and Zhou J. Src Family Kinases (SFK) mediate angiotensin II-induced myosin light chain phosphorylation and hypertension. *Plos one*. 2015; 10(5): e0127891.
- [154] Hao L, Zhou X, et al. Elevated GAPDH expression is associated with the proliferation and invasion of lung and esophageal squamous cell carcinomas. *Proteomics*. 2015; 15(17): 3087-3100.



Research Article

Reactive Oxygen Species from NADPH Oxidase and Mitochondria Participate in the Proliferation of Aortic Smooth Muscle Cells from a Model of Metabolic Syndrome

Oscar López-Acosta,^{1,2} María de los Angeles Fortis-Barrera,³ Miguel Angel Barrios-Maya,² Angélica Ruiz Ramírez,² Francisco Javier Alarcón Aguilar,³ and Mohammed El-Hafidi^{1,2} 

¹Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Doctorado Ciencias Biológicas y de la Salud, Avenida San Rafael Atilano 186, Vicentina, Iztapalapa, 09340 Ciudad de México, México

²Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Departamento de Biomedicina Cardiovascular, Juan Badiano No 1, Colonia Sección XVI, Tlalpa, 14080 Ciudad de México, México

³Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Laboratorio de Farmacología, Departamento de Ciencias de la Salud, Avenida San Rafael Atilano 186, Vicentina, Iztapalapa, 09340 Ciudad de México, México

Correspondence should be addressed to Mohammed El-Hafidi; mohelhafidi@yahoo.com

Received 6 August 2018; Revised 27 October 2018; Accepted 1 November 2018; Published 23 December 2018

Academic Editor: Pablo Marín

Copyright © 2018 Oscar López-Acosta et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

In metabolic diseases, the increased reactive oxygen species (ROS) represents one of the pathogenic mechanisms for vascular disease probably by promoting vascular smooth muscle cell (SMC) proliferation that contributes to the development of arterial remodeling and stenosis, hypertension, and atherosclerosis. Therefore, this work was undertaken to evaluate the participation of ROS from NADPH oxidase and mitochondria in the proliferation of SMCs from the aorta in a model of metabolic syndrome induced by sucrose feeding in rats. After 24 weeks, sucrose-fed (SF) rats develop hypertension, intra-abdominal obesity, hyperinsulinemia, and hyperleptinemia. In addition SMCs from SF rats had a higher growth rate and produce more ROS than control cells. The treatment of SMCs with DPI and apocynin to inhibit NADPH oxidase and with tempol to scavenge superoxide anion significantly blocked the proliferation of both SF and control cells suggesting the participation of NADPH oxidase as a source of superoxide anion. MitoTEMPO, which targets mitochondria within the cell, also significantly inhibited the proliferation of SMCs having a greater effect on cells from SF than from the control aorta. The higher rate of cell growth from the SF aorta is supported by the increased content of cyclophilin A and CD1-7, proteins involved in the mechanism of cell proliferation. In addition, caldesmon, α -actin, and phosphorylated myosin light chain, contractile phenotype proteins, were found significantly lower in SF cells in no-confluent state and increased in confluent state but without difference between both cell types. Our results suggest that ROS from NADPH oxidase and mitochondria significantly participate in the difference found in the rate of cell growth between SF and control cells.

1. Introduction

Vascular smooth muscle cells (SMCs) under physiological conditions present a differentiated contractile/quiescent phenotype, characterized by a considerably low proliferation rate and low synthetic activity of the extracellular matrix and by the expression of signaling molecules for cell contractile functions [1, 2]. The SMC proliferative phenotype may be

characterized by a decreased content of contractile proteins such as α -actin, phosphorylated myosin light chain, and caldesmon and by an increased production of extracellular matrix proteins that contribute to the development of arterial stenosis, arterial remodeling, hypertension, and atherosclerosis, among other pathologies [3–5]. In cardiovascular tissue, several physiological processes such as the differentiation, proliferation, and apoptosis involve ROS generation.

Mitochondria and NADPH oxidase are considered as the main sources of ROS in cardiovascular tissue and are involved in different physiological and pathological processes depending on the intensity of ROS generation [8–9]. Under physiological conditions, ROS levels are found in a steady state which is defined by the generation and elimination of ROS. In pathological conditions, this steady-state ROS concentration is transiently or chronically increased and results in intermediate-intensity oxidative stress or high-intensity oxidative stress which are associated with cellular metabolism alteration or with cellular component damage allowing cell death by apoptosis or necrosis [10–13]. In intermediate-intensity oxidative stress, ROS were described to play a role as a second messenger to influence signal transduction and to reprogram general cellular functions by upregulating the expression of antioxidant enzymes and certain genes of cell proliferation [13]. Indeed, it was described that ROS-induced vascular SMC proliferation is mediated by the secretion of cyclophilin A (CyPA) which acts through its receptor CD147 and activates JAK-ERK1/2-Akt signaling pathways to enhance DNA biosynthesis and proliferation of SMCs [7, 14, 15]. This mechanism of ROS-induced oxidative stress and SMC proliferation may be considered as a mechanism involved in the development of cardiovascular disease in metabolic diseases such as abdominal obesity, insulin resistance, and hypertension [16, 17]. It is well known that obesity promotes the release of several factors such as cytokines and lipotoxic free fatty acids (FFAs) that interact and accumulate in the cell and affect mitochondrial function and NADPH oxidase activity to increase ROS generation [18–21]. In this context, ROS by enhancing cell dysfunction and altering vascular SMC phenotype and cell environment may contribute to the activation of mechanisms that promote vascular SMC proliferation and migration or death. Thus, the study of SMC proliferation from a model of intra-abdominal obesity induced by sucrose feeding, in where NADPH oxidase activity and oxidative stress markers were found increased in vascular tissue, is of great interest to elucidate the mechanisms of metabolic syndrome (MS) inducing cardiovascular diseases and involving the participation of ROS generation. Moreover, the model develops resistance to insulin, hypertension, and alterations in vascular reactivity by increasing vasoconstriction in response to phenylephrine and reduced vasodilatation in response to acetylcholine [22] and this makes it useful to investigate the mechanism by which SMC proliferation is a risk factor of cardiovascular disease development in metabolic diseases. Thus, the use of SMCs extracted from the aorta of this model to elucidate the mechanism by which ROS contributes to SMC proliferation and their altered contractile proteins *in vitro* represents a relevant approach for understanding the *in vivo* ROS action. In addition, there is no data about the behavior of SMC in this model of abdominal obesity induced by sucrose nor about the participation of mitochondria or NADPH oxidase in ROS generation and SMC proliferation. As NADPH oxidase, mitochondria are considered as the main source of ROS such as superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) generated by leak of electrons from the redox centers of respiratory complexes I

and III to molecular oxygen [23]. In this model of obesity induced by sucrose diet, we also reported several metabolism alterations such as high circulating FFA and oxidative stress associated with mitochondrial ROS generation in the liver [24]. Therefore, the objective of this research was to investigate the participation of mitochondria and NADPH oxidase as sources of ROS on SMC proliferation, the protein profile of contractile phenotype, and cell signaling involving CyPA in a model of central obesity induced by high-sucrose diet.

2. Materials and Methods

2.1. Experimental Animals. Newly weaned male Wistar rats weighing 55 ± 5 g were used. Animals were obtained from the animal facility of the National Institute of Cardiology Ignacio Chávez and were processed according to the National Institutes of Health *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*. The animals were divided into groups of 6 rats each: the control groups (C) received solid food (Lab Diet Formula 5001, Ralston Purina Corp., St. Louis, MO) and water ad libitum. The sucrose-fed (SF) groups received a solution of sucrose (refined sugar) at 30% as drinking water and the same solid food ad libitum. After 24 weeks of treatment, rats were fasted overnight and the next day they were sacrificed by cervical dislocation. After 24 weeks of sucrose treatment, systolic and diastolic blood pressure was measured as described previously [25].

2.2. Leptin, Insulin, FFA, TG, and Glucose. The blood was collected from the abdominal aorta into tubes containing anticoagulant (0.1% EDTA) and immediately centrifuged at $600 \times g$ for 20 min at $4^\circ C$. To plasma thus obtained, 0.005% of butylated hydroxytoluene (BHT) was added as an antioxidant and the mixture was stored at $-70^\circ C$ until analysis. FFAs were determined by gas chromatography as described previously [25] and were obtained according to the method of Folch et al. [26]. TG plasma concentration was measured according to the method described by Nägele et al. [27]. Glucose levels, plasma insulin, and leptin were measured by radioimmunoassay using standard commercial kits (Linco Research). The intra-abdominal fat was dissected off retro-peritoneal cavity and around both kidneys and weighed immediately. Visceral and duoderal fat was not included in this procedure.

2.3. Primary SMC Culture. SMCs were obtained from the aorta under sterile conditions. The aorta was collected and immediately placed in a buffer containing 140 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.2 mM Na_2HPO_4 , 2.4 mM $MgSO_4$, 2 mM $CaCl_2$, 5.6 mM glucose, 0.02 mM EDTA, 25 mM HEPES, and pH 7.4 and fat was removed. In a first step, the defatted aorta was incubated with 1 mg/ml of collagenase type II (125 U/mg activity, Gibco) for 20 min to remove the adventitia (fibroblasts) from smooth muscle. The second step consisted of incubating the aorta without adventitia for 40 min with 10 mM papain (30 U/mg activity, Roche) to disaggregate the cells. Subsequently, the obtained suspension was filtered through a $250 \mu m$ pore sieve (Tissue Grinder Kit, Sigma) and seeded in 25-cm^2 cell culture flasks (Corning) in D-

MEM/F-12 culture medium (Gibco) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) inactivated at 56°C for 30 min. SMCs were grown at 37°C with 5% CO₂ and 90% humidity. When the cells reached confluent state, they were treated with 0.25% trypsin-EDTA (Gibco) and reseeded in a 75-cm² cell culture flask, in the same culture medium described above [5].

When cells reach a confluent state in the 75-cm² flasks, they were treated with 0.25% trypsin-EDTA (Gibco) and reseeded in multiwell cell culture plates (24 wells) at 8000 cells per well in the medium containing 10% FBS and the medium was removed every 24 h. After washing, SMCs were finally fixed at different times 0, 24, 48, 72, 96, and 120 h with absolute ethanol to determine DNA quantity. DNA was determined according to the modified method of Brunk et al. [26] using 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as a fluorescent probe at 360 nm (excitation wavelength) and 430 nm (emission wavelength) using a Perkin Elmer LS50B spectrofluorometer. Cells fixed in ethanol were treated with 0.150 ml of NaOH (1 N) and 1.35 ml of 0.15 M Na₂HPO₄ containing DAPI at a final concentration of 0.5 μM. To further evaluate the amount of DNA in samples, a curve was performed with DNA extracted from salmon (Sigma) whose concentration of the stock solution was adjusted with Nano-Drop (Thermo Scientific).

2.4. SMC ROS Generation. Cells were grown on coverslips treated with poly-L-lysine (0.1%). Once cells were adherent, they were preincubated with 5 μM of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA) for 15 min and then washed with PBS to remove excess DCF. Cells were washed again with PBS and mounted on slides with glycerol. The oxidized DCF was detected by confocal microscopy.

2.5. Mitochondria as a Source of ROS. SMCs were incubated with MitoSOX (5 μM) for 15 min. MitoSOX is accumulated selectively in mitochondria and it emits red fluorescence when oxidized by superoxide anion. Then, cells were fixed with 1% paraformaldehyde for 30 min at 4°C. Finally, cells were mounted on coverslips with glycerol for analysis by confocal microscopy.

2.6. ROS Participation in SMC Proliferation. SMCs were seeded under the same conditions described above in 24 multiwell plates in the absence and presence of hydroxy-TEMPO (tempol) and MitoTEMPO, superoxide anion scavengers, in cytosol and mitochondria, respectively, and in the presence of diphenylethodonzium chloride (DPI) and apocynin (APO), NADPH oxidase inhibitors. All inhibitors were tested at different concentrations, from 1 to 10 μM for 72 and 120 h to assess the participation of ROS in cellular proliferation and which sources of ROS are contributing to this process.

2.7. Contractile Phenotype Protein Markers. Proteins were extracted from SMCs in two proliferative states: in exponential growth state (72 h) and in the confluent state (120 h). At the end of experiments in different conditions, cells were harvested and lysed in a buffer containing 25 mM HEPES, 0.1 M NaCl, 15 mM imidazole, 10% glycerol, 1% Triton X-100,

TABLE 1: General characteristics of animals.

Variables	C	SF
Body weight (g)	488.0 ± 19.1	477.0 ± 31.7
Heart rate (beat/min)	351.9 ± 5.2	371.9 ± 2.2**
Systolic blood pressure (mmHg)	111.7 ± 2.3	130.2 ± 2.9**
Diastolic blood pressure (mmHg)	69.0 ± 2.7	97.8 ± 3.9**
Medium blood tension (mmHg)	82.8 ± 2.4	108.7 ± 3.4**
Intra-abdominal fat (g)	7.4 ± 2.2	15.3 ± 2.6 *
TG ₀ (mM)	0.8 ± 0.1	1.8 ± 0.1 **
Glucose (mM)	5.9 ± 0.1	5.9 ± 0.2
Total cholesterol (mM)	1.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1
Cholesterol-HDL (mg/dl)	42.65 ± 3.5	28.1 ± 4.1*
FFAs (mM)	0.6 ± 0.1	1.1 ± 0.1 **
Insulin (pM)	99.6 ± 5.1	167.6 ± 7.8**
Leptin (ng/ml)	0.6 ± 0.2	2.7 ± 0.3**

The values were expressed as a mean ± SE (*n* = 7 different animals). The values of all the variables were obtained at the end of the treatment period (24 weeks). **p* < 0.05 and ***p* < 0.01 correspond to SF vs. C.

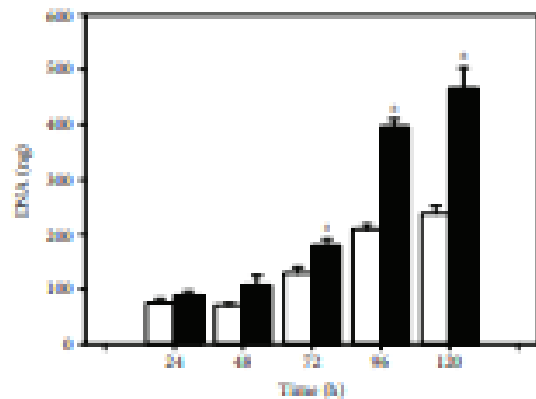


FIGURE 1: The proliferation of SMCs from C rats (open bars) and SF (black bars) in the presence of 10% SF was determined by quantifying DNA using DAPI (0.5 μM) as a fluorescent probe. The SMCs were cultured at different growth times 24, 48, 72, 96, and 120 h. The values correspond to the mean of the amount of DNA (ng) ± SE (*n* = 6 independent experiments and each experiment corresponds to one animal). **p* < 0.05 corresponds to C vs. SF.

protease inhibitors (115 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 2 mM leupeptin, 1.5 mM aprotinin, and 3 mM pepstatin), and antiphosphatases (0.2 mM orthovanadate, 50 mM NaF).

The suspension was then incubated for 30 min at 4°C. At the end of incubation time, the sample was centrifuged at 8000 × *g* for 10 min at 4°C to remove cell debris. The homogenate protein level was quantified using the method of Bradford [29]. Two hundred micrograms of protein of each sample was collected, suspended in 25 μl of buffer load containing 125 mM Tris-HCl (pH 6.8), 20% glycerol, 4% SDS, 10% 2-mercaptoethanol, and 0.004% bromophenol blue,

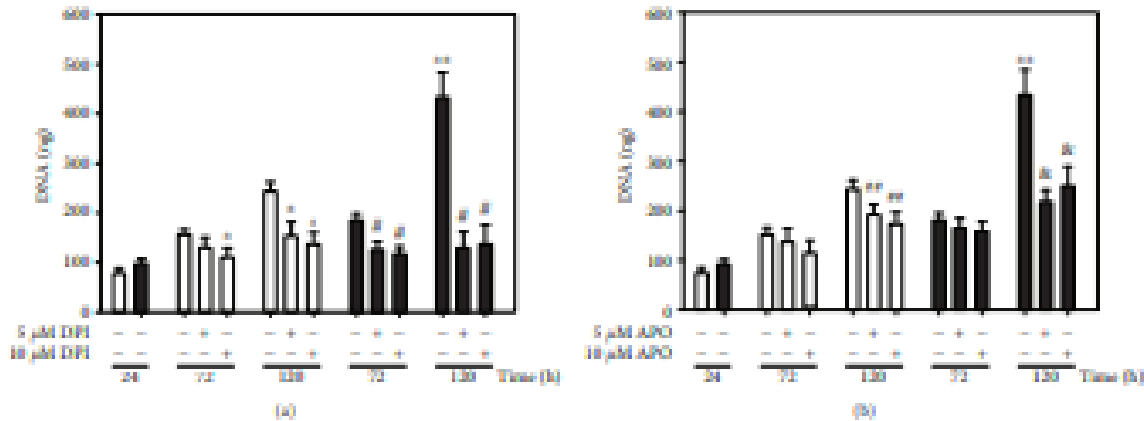


FIGURE 2 | Effect of DPI (a) and APO (b) on the proliferation of SMCs from control rats (open bars) and SF (black bars) cultivated during 72 and 120 h to 5 and 10 μM of each compound. The values correspond to the average of the amount of DNA (ng) \pm SE ($n = 3$ independent experiments and each experiment corresponds to one animal). ** $p < 0.05$ C vs. SF, * $p < 0.05$ C vs. C+DPI, # $p < 0.05$ SF vs. SF+DPI, ## $p < 0.05$ C vs. C+APO, and # $p < 0.05$ SF vs. SF+APO.

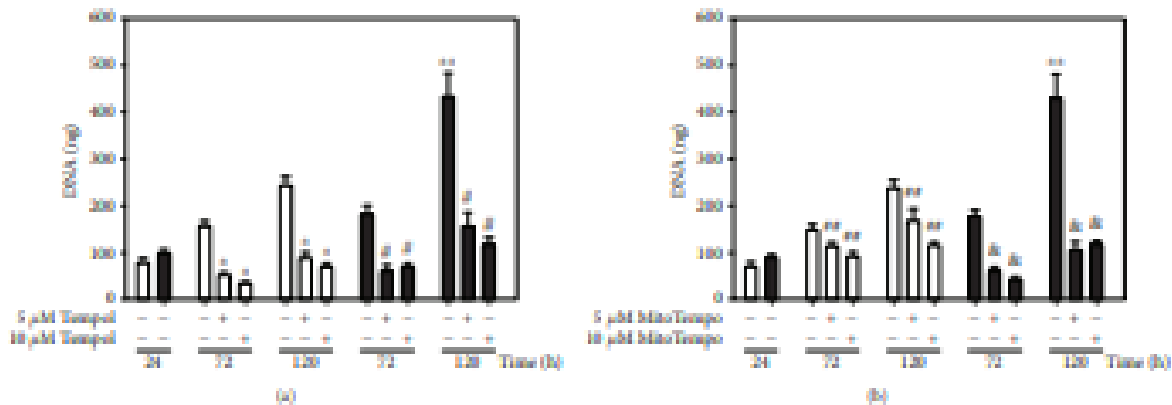


FIGURE 3 | Effect of tempol (a) and MitoTEMPO (b) on SMC proliferation of control rats (open bars) and SF (black bars) cultured during 72 and 120 h to 5 and 10 μM of each compound. The values correspond to the amount of DNA (ng) \pm SE ($n = 3$ independent experiments). ** $p < 0.05$ C vs. SF, * $p < 0.05$ C vs. C+tempol, # $p < 0.05$ SF vs. SF+tempol, ## $p < 0.05$ C vs. C+MitoTEMPO, and # $p < 0.05$ SF vs. SF+MitoTEMPO.

and completed to 50 μl with Laemmli solution (40 mM Tris, 1% SDS, and 1% β -mercaptoethanol).

Eighty micrograms of protein of each sample was loaded in SDS-PAGE gel which acrylamide percentage depended on the protein to analyze. The electrophoresis was run for 3 h at 120 V. The protein transfer was performed onto a nitrocellulose membrane (pore size 0.22 μm , Bio-Rad) at 350 mA for 60 min for caldesmon, CD147, 45 min for α -actin, ERK 1/2 and GAPDH, and 35 min for phosphorylated myosin light chain and CyPA in a chamber of semidry transfer (Bio-Rad, Trans-Blot SD). The nonspecific protein detection was reduced by blocking membranes with TBS (25 mM Tris base, 150 mM NaCl) containing 5% nonfat milk and 0.1% Tween 20. Then, the membranes were incubated with monoclonal antibodies against anti-caldesmon (Abcam, 1:20000), anti- α -actin (Abcam, 1:300), antiphosphorylated myosin

light chain (p-MLC) (Abcam, 1:1000), anti-CyPA (Abcam 1:500), anti-CD147 (Abcam, 1:2000), anti GAPDH (Abcam, 1:10000), anti-ERK 1/2 (GenStatex, 1:1000), and anti-beta actin as a load control (Novusbio, 1:10000). The secondary antibodies used were peroxidase conjugated. Proteins were revealed by chemiluminescent reagent (Immobilion, Millipore), and membranes were exposed to radiography plates (BioMax, Kodak) for 5 min. The image was scanned with an imaging system GelDoc-It (UVP Inc., Upland, CA, USA). Bands were analyzed by a UVP image analyzer, and optical density was evaluated with the VisionWorks LS software (UVP Inc., Upland, CA, USA).

2.8. Statistical Analysis. Statistical analysis was performed using the SigmaPlot program (version 11). Data are presented as the mean \pm SE (standard error). The number of

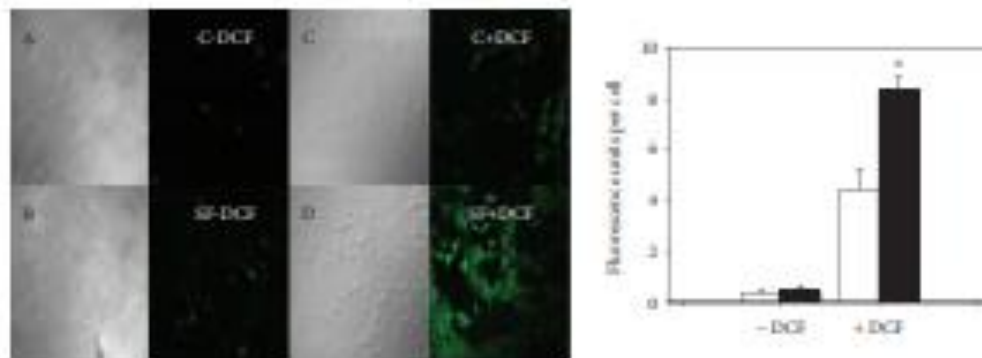


FIGURE 4: Generation of ROS at cell wall level in SMCs of control rats (open bar) and with metabolic syndrome (black bar) analyzed by confocal microscopy. The values correspond to the intensity of the fluorescence emitted by cell + SE ($n = 3$ independent experiments). A, B, C, and D correspond to the images of optic microscopy of C-DCF, SF-DCF, C+DCF, and SF+DCF, respectively. * $p < 0.05$ correspond to C vs. SF.



FIGURE 5: Generation of ROS at the mitochondrial level in SMCs of control rats (open bar) and with metabolic syndrome (black bar) analyzed by confocal microscopy. The values correspond to the intensity of the fluorescence emitted by cell + SE ($n = 3$ independent experiments). A, B, C, and D correspond to the images of optic microscopy of C-DCF, SF-DCF, C+DCF, and SF+DCF, respectively. * corresponds to C vs. SF ($p < 0.05$).

experiments varied depending of the type of experiment ($n = 4$ to 8). One-way ANOVA was used for comparing the data from different groups. The difference between groups was considered statistically significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. General Characteristics of Animals. The treatment of rats with sucrose diet for 24 weeks induced a statistically significant increase in heart rate and diastolic and systolic blood pressure ($p < 0.01$). In addition, triglycerides, FFA, insulin, and leptin in plasma and intra-abdominal fat tissue were found higher in SF rats ($p < 0.01$). On the other hand, analysis of total cholesterol and glucose and body weight showed no significant difference between the two groups. Cholesterol associated with HDL decreased significantly in SF animals ($p < 0.05$) (Table 1).

3.2. Smooth Muscle Cell Proliferation. Figure 1 shows that the amount of DNA corresponding to SMCs from SF rats increased significantly across the time as compared to control cells and at any time of cell growth ($p < 0.05$). After 24, 48, 72,

96, and 120 h of cell seeding, DNA amount corresponding to SMCs from SF animals increased by 18%, 55%, 40%, 89%, and 95%, respectively, as compared with SMCs from control animals. The increase of DNA over time reflected a greater proliferation of SMCs isolated from the SF model than that from the control animals.

In order to elucidate the involvement of ROS generation in SMC proliferation, several inhibitors of ROS sources within cell were used. Apocynin (APO) and DPI were used as inhibitors of NADPH oxidase (Figure 2), while tempol was used as a superoxide anion scavenger. Moreover, MitoTEMPO, a superoxide radical scavenger at the mitochondrial level, was used to elucidate the participation of mitochondria in ROS-induced cell proliferation (Figure 5).

With DPI at $5 \mu\text{M}$, a proliferation-blocking effect by 32% was observed in SF cells at 72 h (Figure 2(a)). At 120 h, both at 5 and $10 \mu\text{M}$, DPI decreased DNA in cells from SF control animals (by 70% and 40%, respectively). In the case of apocynin, Figure 2(b) shows that the proliferation of SMCs from the SF aorta was blocked by 45% at 120 h. When SMCs were incubated with tempol, a significant inhibition of cell growth ($p < 0.05$) was observed at 72 and 120 hours by 70% in

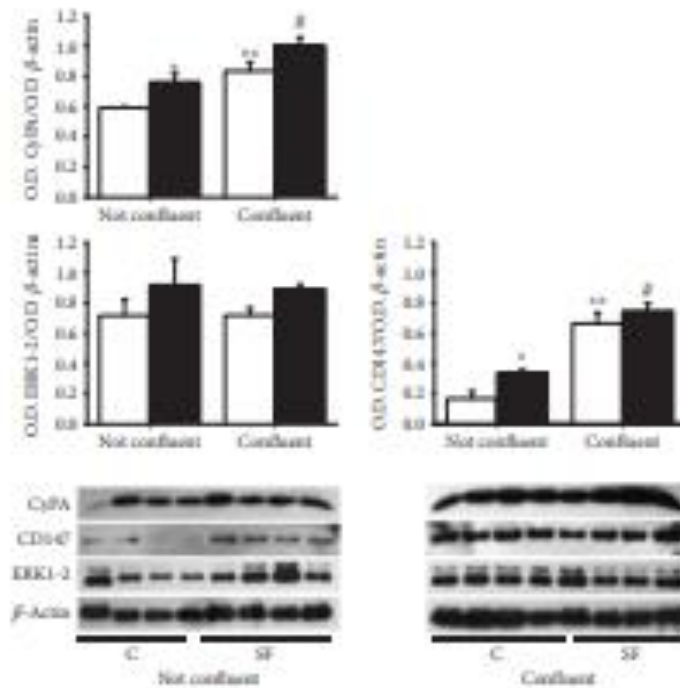


FIGURE 6 Analysis by western blot of cyclophilin A (CypA; 17 kDa), cyclophilin A receptor (CD147; 55 kDa), and ERK1-2 (46 kDa) in SMCs (C, open bars; SF, black bars) during nonconfluent growth state (72 h) and confluent state (120 h). The values in the graphs correspond to the ratio of optic density (O.D.) CypA/O.D. β -actin, O.D. CD147/O.D. β -actin, and O.D. ERK1-2/O.D. β -actin + SE ($n = 4$ different animals). ^a $p < 0.05$ C not confluent vs. SF not confluent, ^{**} $p < 0.05$ C not confluent vs. C confluent, and ^b $p < 0.05$ SF not confluent vs. SF confluent.

control SMCs and by 65% in SF cells (Figure 3(a)). When SMCs were incubated with MitoTEMPO that selectively targets mitochondria, a greater inhibitory effect was observed on the proliferation of SMCs isolated from the SF aorta by 70% and in control SMCs by 30% (Figure 3(b)). SMCs from SF rats were more sensitive to the proliferation-inhibiting effect of MitoTEMPO than control cells at both 72 and 120 h of culture.

3.3. Smooth Muscle Cell ROS Generation. MitoSOX and DCF, two ROS probes, were used to monitor ROS generation at mitochondria and cell wall levels, respectively. Figure 4 shows a significant increase ($p < 0.05$) of DCF fluorescence in SF cells by 46% compared with control cells. To evaluate ROS generation from SMCs at mitochondria level, MitoSOX, a fluorogenic dye specifically targeted to mitochondria, was used. It emits red fluorescence when oxidized by superoxide. In microscopy images (Figure 5), both control and SF primary cultured SMCs without MitoSOX emitted intrinsic fluorescence. When cells were incubated with MitoSOX, the intensity of fluorescence was 48% significantly more intense in cells from SF model compared with cells from control animals ($p < 0.05$).

3.4. Analysis of Cyclophilin A, Cyclophilin A Receptor (CD147), and ERK-1/2. Figure 6 shows the expression of cyclophilin A whose content was 28% higher under nonconfluent conditions in SF cells compared to control cells.

When cells reach confluence, the content of this protein increased in both SF and control cells by 32% and by 40%, respectively, in comparison with nonconfluent control and SF cells. However, the difference between both cell types is lost in confluent state.

In regard to CD147 under nonconfluent conditions, a significant increase ($p < 0.05$) in SF cells was observed compared to control cells, but at confluent state, the content of this protein was enhanced in both cell types and there was no difference between SF and control cells (Figure 6).

With respect to ERK 1/2, the content was the same for SF and control cells at nonconfluent conditions and confluent conditions (Figure 6).

3.5. Contractile Phenotype Protein. SMCs are well characterized by the expression of several contractile phenotype proteins, such as caldesmon, α -actin, and the phosphorylated myosin light chain (p-MLC). Their abundance may depend on the cell growth state. Thus, nonconfluent (72 h) and confluent (120 h) growth conditions were tested to evaluate the expression of these proteins. Figure 7 shows that the content of caldesmon was lower under conditions of nonconfluence compared to that in the confluent state, in both cell types. Moreover, the O.D. corresponding to caldesmon band level at 72 h was significantly lower in SMCs from the SF aorta compared to control cells ($p < 0.05$). This difference between SF and control cells was lost at 120 h. In regard to α -actin content, the O.D. analysis shows a significant increase in its

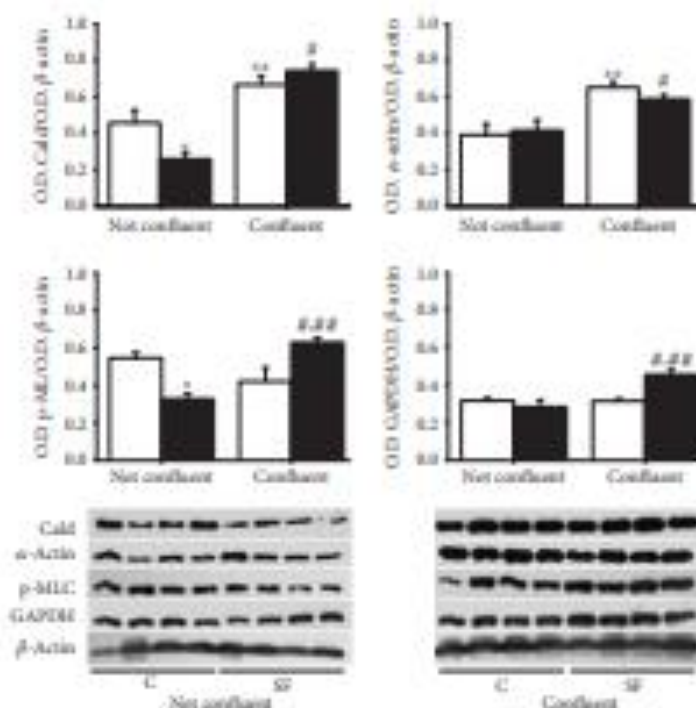


FIGURE 7 | Content analysis of caldesmon (CalD; 70 kDa), α -actin (37 kDa), phosphorylated myosin light chain (p-MLC; 50 kDa), and GAPDH (37 kDa) quotient in SMCs (C, open bars; SF, black bars) during nonconfluent growth state (72 h) and confluent state (120 h). The values in the graph correspond to the ratio of O.D. CalD/O.D. β -actin, O.D. α -actin/O.D. β -actin, O.D. p-MLC/O.D. β -actin, and O.D. GAPDH/O.D. β -actin; SE ($n = 4$ different animals). * $p < 0.05$ C not confluent vs. SF not confluent, ** $p < 0.05$ C not confluent vs. C confluent, # $p < 0.05$ SF not confluent vs. SF confluent, and ## $p < 0.05$ C confluent vs. SF confluent.

content when cells were in confluence as compared with growing state (72 h) and no difference was observed between SF and C cells (Figure 7). The content of p-MLC in nonconfluent state was significantly lower in SMCs from SF compared to that from control rats ($p < 0.05$). In confluent state, the distribution of p-MLC was inverted and the amount of p-MLC was shown enhanced in SMCs from SF animals as compared with control cells (Figure 7). The GAPDH tended to be lower in both control and SF cells in nonconfluent state compared with confluent cells. In addition, GAPDH content increased in the isolated SMCs of the SF model in confluent conditions (Figure 7).

4. Discussion

This study was undertaken to investigate the role of endogenous ROS in the contractile and proliferative phenotype of SMCs isolated from SF model, since it is reported that a high-sucrose diet increases the generation of ROS in different tissues including vascular tissue [24, 30]. The proliferation and migration of SMCs is a physiological process in response to pathological conditions such as metabolic syndrome associated with hyperglycemia and hyperlipidemia, hypertension, and diabetes [31]. All these pathological alterations are characterized by oxidative stress due to the enhanced steady-state

concentration of ROS. When the basal concentrations of ROS increases and exceeds antioxidant defense, it also may induce alterations of intracellular redox status by the modification of GSH/GSSG and NAD(P)⁺/NAD(P)H involved in the interaction between signaling protein (docking) and in the activation or depression of several proteins involved in cell proliferation and cell death [13, 32]. Our results of metabolic alterations induced by sucrose feeding, such as high adipose tissue, hypertriglyceridemia, hyperleptinemia, and hyperinsulinemia, are associated with increased diastolic and systolic blood pressure and heart rate and may contribute to the generation of ROS [33]. The participation of ROS in cell proliferation is evidenced by incubating cells with different scavengers and inhibitors of ROS sources. As an inhibitor of NADPH oxidase, DPI acts differentially from APO and it decreases the amount of DNA in both SF and control cell types at 72 and 120 h, having a greater effect on SF cells, suggesting a cytolytic effect. In addition to its wide use as an inhibitor of NADPH oxidase, DPI has been reported to inhibit other important enzymes such as NADPH ubiquinone oxidoreductase, nitric oxide synthase, xanthine oxidase, NADPH cytochrome P450 oxidoreductase, and cholinesterase that may be involved in cell survival [34]. Apocynin however is a specific inhibitor of NADPH oxidase [35]. It acts more specifically by inhibiting the association of p40phox

and of p67phox with gp91phox as NADPH oxidase subunits, without affecting other proteins that may be vital for cell survival [36, 37]. In our work, it significantly blocks cell growth without causing a decrease in DNA concentration in SF suggesting that there is no cytolytic effect and the participation of NADPH oxidase in the proliferation of SMCs from the SF aorta. In regard to the use of tempol as a selective scavenger of superoxide anion and permeable to biological membranes [38], the results suggest the participation of superoxide anion generated at different levels such as NADPH oxidase and mitochondria.

Unlike tempol, MitoTEMPO selectively targets mitochondria because of its chemical structure having triphenyl phosphonium as a lipophilic cationic functional group [39]; its selective inhibitory effect on SF cell proliferation indicates that the superoxide radical generated at mitochondria level also plays a very important role in the proliferation of SMCs from SF rats. Indeed, the experiments of ROS generation at mitochondrial level, using MitoSOX that accumulates in the mitochondria and that reacts specifically with superoxide anion, indicate an increase in superoxide anion generation by SMCs isolated from SF rats compared to control cells.

In a previous study, mitochondria isolated from the liver of animals with sucrose diet generated ROS at high rate probably due to lipid metabolic alterations such as TG and FFA found increased in SF rats [24]. In SMCs from the SF aorta, ROS may be a modulating signal for growth factors, by regulating transcription factors that control the expression of genes associated with proliferation [8, 40]. SMC proliferation associated with ROS release has been described to be related to the secretion of several proteins called SOFX (secreted oxidative stress-induced factors), among them CyPA. CyPA secretion involves several proteins that participate in a cytoskeleton remodeling process and in the formation of vesicles necessary for CyPA secretion [41]. CyPA upon binding to its CD147 receptor overexpressed in SMCs from the SF aorta may stimulate JAKR/Akt/ERK1/2 pathways and promote cell proliferation [7, 42].

In this work, the amount of CyPA found higher in isolated cells from SF model in growing state (nonconfluent) indicates the increased availability of CyPA to be secreted out of cell and to interact with CD147 also found increased to induce ERK1/2 expression and activity involved in DNA biosynthesis. The direct involvement of ROS in CyPA expression and secretion was not addressed. However, the blocking cell proliferation by inhibiting ROS generation in both mitochondria and NADPH oxidase suggests further experiments to evidence the ROS involvement in CyPA, CD147, and ERK1/2 expression activity and their relation to cell proliferation. Indeed, the increased CyPA expression and secretion was described to be blocked by antioxidants in Nox1-transfected cells [14].

In regard to the SMC contractile phenotype characterized by the expression of proteins such as α -actin, caldesmon, and phosphorylated myosin light chain [43–45], our results suggest that SMCs did lose partially the contractile phenotype during the growth state (not

confluent), and when the cells reach confluent state, they totally recover the contractile phenotype. These results suggest that the method using papain for enzymatic dispersion of SMCs from the rat aorta keeps cell with a contractile phenotype. However, the lesser content of caldesmon and p-MLC in nonconfluent SF cells could be related with a decrease in contractile phenotype of SMCs from the SF aorta, higher ROS generation, and lipotoxicity in SF animals. The finding of increased p-MLC in confluent state of SMCs isolated from SF may be related to the increased vasoconstriction found in aorta ring and associated with the hypertension that characterizes SF rats [46, 47].

In summary, SMCs from SF model have a higher proliferation rate due to a higher generation of superoxide anion at the level of NADPH oxidase and mitochondria. In addition, ROS favors the expression and probably the secretion of cyclophilin A that may act through its CD147 receptor to promote SF SMC proliferation, decreasing contractile phenotype proteins. As a consequence of the finding of ROS involvement in cell proliferation suggests to implement of strategies using ROS generation inhibitors to control SMC proliferation in SF rats.

Abbreviations

APC:	Apocynin
BHT:	Butylated hydroxytoluene
Cald:	Caldesmon
C:	Control
CyPA:	Cyclophilin A
DAPI:	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DCF-DA:	2',2'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate
DPI:	Diphenyliodonium chloride
FFAc:	Free fatty acids
FBS:	Fetal bovine serum
NADPH:	Nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced
MS:	Metabolic syndrome
PMSE:	Phenylmethylsulfonyl fluoride
p-MLC:	Phosphorylated myosin light chain
ROS:	Reactive oxygen species
SMCs:	Smooth muscle cells
SF:	Sucrose-fed
Tempol:	4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl
TG:	Triglycerides.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgments

This study was supported by the CONACYT (scholarship no. 284105 to Oscar Lopez Acosta) through the Doctorate in Biological Sciences and Health of the Metropolitan Autonomous University, Iztapalapa (UAM-I). This work was also supported in part by CONACYT (Grant no. 185450) and by the Institute of Science and Technology of the Federal District, Mexico City (ICyTDF), Mexico (Grant no. PICDS08-87).

References

- [1] M. Chiang, P. E. Morales, G. Torres et al., "Influence of glucose metabolism on vascular smooth muscle cell proliferation," *VASA*, vol. 42, no. 1, pp. 8–16, 2013.
- [2] M. Belacel-Ouari, L. Zhang, F. Hubert et al., "Influence of cell confluence on the cAMP signalling pathway in vascular smooth muscle cells," *Cellular Signalling*, vol. 35, pp. 118–128, 2017.
- [3] D. Z. Wang and E. N. Olson, "Control of smooth muscle development by the myocardin family of transcriptional coactivators," *Current Opinions in Genetics & Development*, vol. 14, no. 5, pp. 558–566, 2004.
- [4] A. C. Doran, N. Müller, and C. A. McNamara, "Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis," *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology*, vol. 28, no. 5, pp. 812–819, 2008.
- [5] M. Fardoun, T. Al-Shahabi, A. El-Yazbi et al., "Ziripras nomulacta inhibits inflammation-induced atherogenic phenotype of human aortic smooth muscle cells," *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, vol. 2017, Article ID 4134093, 10 pages, 2017.
- [6] R. Prieto-Bernabeo and A. Hernández-Hernández, "The importance of NADPH oxidases and redox signaling in angiogenesis," *Antioxidants*, vol. 6, no. 2, 2017.
- [7] K. Satoh, P. Nigam, and B. C. Berk, "Oxidative stress and vascular smooth muscle cell growth: a mechanistic linkage by cyclophilin A," *Arteriosclerosis & Redox Signaling*, vol. 12, no. 5, pp. 675–682, 2010.
- [8] R. Clempus and E. Griending, "Reactive oxygen species signaling in vascular smooth muscle cells," *Cardiovascular Research*, vol. 71, no. 2, pp. 216–225, 2006.
- [9] Y. Lang, D. Chen, D. Li et al., "Luteolin inhibited hydrogen peroxide-induced vascular smooth muscle cells proliferation and migration by suppressing the Src and Akt signalling pathways," *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, vol. 64, no. 4, pp. 597–603, 2012.
- [10] A. Engin, "Non-alcoholic fatty liver disease," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 960, pp. 443–467, 2017.
- [11] S. Pereira, E. Park, Y. Mori et al., "FFA-induced hepatic insulin resistance in vivo is mediated by PKC δ , NADPH oxidase, and oxidative stress," *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, vol. 307, no. 1, pp. E34–E46, 2014.
- [12] M. Xiao, H. Zhang, L. Xia, Y. Tao, and H. Yin, "Pathophysiology of mitochondrial lipid oxidation: role of 4-hydroxynonenal (4-HNE) and other bioactive lipids in mitochondria," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 111, pp. 316–327, 2017.
- [13] V. I. Lushchak, "Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification," *Chemico-Biological Interactions*, vol. 224, pp. 164–175, 2014.
- [14] Z. G. Jin, M. G. Melaragno, D. F. Liao et al., "Cyclophilin A is a secreted growth factor induced by oxidative stress," *Circulation Research*, vol. 87, no. 9, pp. 789–796, 2000.
- [15] K. Satoh, T. Matsuda, J. Suzuki et al., "Cyclophilin A mediates vascular remodeling by promoting inflammation and vascular smooth muscle cell proliferation," *Circulation*, vol. 117, no. 24, pp. 3088–3098, 2008.
- [16] F. Forti, G. L. Pirazzoli, B. Maltoni et al., "Metabolic syndrome and all-cause mortality in older men and women," *European Journal of Clinical Investigation*, vol. 42, no. 9, pp. 1000–1009, 2012.
- [17] M. Ahmadianfar, S. R. Arefhosseini, M. R. Parizadeh et al., "Association between serum uric acid, high sensitive C-reactive protein and pro-oxidant-antioxidant balance in patients with metabolic syndrome," *Biofactors*, vol. 44, no. 3, pp. 263–271, 2018.
- [18] V. Higgins and K. Adeli, "Pediatric metabolic syndrome: pathophysiology and laboratory assessment," *EBPCC*, vol. 28, no. 1, pp. 25–42, 2017.
- [19] R. A. Nelson and A. A. Bremer, "Insulin resistance and metabolic syndrome in the pediatric population," *Metabolic Syndrome and Related Disorders*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2010.
- [20] R. P. Brandes, N. Weissmann, and E. Schröder, "Nou family NADPH oxidases: molecular mechanisms of activation," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 76, pp. 208–226, 2014.
- [21] O. Rebolledo, C. Marra, A. Raichia, S. Rodriguez, and J. Gagliardino, "Abdominal adipose tissue: early metabolic dysfunction associated to insulin resistance and oxidative stress induced by an unbalanced diet," *Hormone and Metabolic Research*, vol. 40, no. 11, pp. 794–800, 2008.
- [22] A. Ruiz-Ramirez, E. Ortiz-Balderas, G. Cardozo-Saldana, E. Diaz-Diaz, and M. El-Hafidi, "Glycine restores glutathione and protects against oxidative stress in vascular tissue from sucrose-fat rats," *Clinical Science*, vol. 126, no. 1, pp. 19–29, 2014.
- [23] M. D. Brand, "Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 100, pp. 14–31, 2016.
- [24] A. Ruiz-Ramirez, M. Chávez-Salgado, J. A. Peñeda-Flores, E. Zapata, F. Maso, and M. El-Hafidi, "High-sucrose diet increases ROS generation, FFA accumulation, UCP1 level, and proton leak in liver mitochondria," *American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism*, vol. 301, no. 6, pp. E1198–E1207, 2011.
- [25] M. El-Hafidi, A. Cuñillar, J. Ramirez, and G. Baltes, "Effect of sucrose addition to drinking water, that induces hypertension in the rats, on liver microsomal Delta9 and Delta5-desaturase activities," *Journal of Nutritional Biochemistry*, vol. 12, no. 7, pp. 390–403, 2001.
- [26] J. Folch, M. Lees, and G. H. Sloane Stanley, "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 226, no. 1, pp. 497–509, 1957.
- [27] U. Nigam, E. O. Högala, G. Sauer et al., "Reagent for the enzymatic determination of serum total triglycerides with improved lipolytic efficiency," *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, vol. 22, no. 2, 1984.

- [28] C. F. Brank, E. C. Jones, and T. W. James, "Assay for nanogram quantities of DNA in cellular homogenates," *Analytical Biochemistry*, vol. 92, no. 2, pp. 497-500, 1979.
- [29] M. M. Bradford, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding," *Analytical Biochemistry*, vol. 72, no. 1-2, pp. 248-254, 1976.
- [30] T. J. Guzik, J. Sadowski, B. Kapulik et al., "Systemic regulation of vascular NAD(P)H oxidase activity and non isoform expression in human arteries and veins," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 24, no. 9, pp. 1614-1620, 2004.
- [31] N. Q. Tuan, D. H. Lee, J. Oh et al., "Inhibition of proliferation of vascular smooth muscle cells by Cucurbitacin from *Momordica charantia*," *Journal of Natural Products*, vol. 80, no. 7, pp. 2018-2025, 2017.
- [32] J. Chin and I. W. Dawes, "Radex control of cell proliferation," *Trends in Cell Biology*, vol. 22, no. 11, pp. 592-601, 2012.
- [33] J. Min, Z. Wotian, C. Peng et al., "Correlation between insulin-induced estrogen receptor methylation and atherosclerosis," *Cardiovascular Diabetology*, vol. 15, no. 1, p. 156, 2016.
- [34] M. Ostafin, M. P. Prochaznik, O. Ciaptala, A. Z. Ruznick, and U. Durskose, "Different procedures of diphenylpicosulfoniam chloride addition affect neutrophil extracellular trap formation," *Analytical Biochemistry*, vol. 509, pp. 60-66, 2016.
- [35] Y. Sun, F. Gong, J. Yin et al., "Therapeutic effect of apocynin through antioxidant activity and suppression of apoptosis and inflammation after spinal cord injury," *Experimental and Therapeutic Medicine*, vol. 13, no. 3, pp. 952-960, 2017.
- [36] S. Fuji, S. Suzuki, A. Nishi-Ito et al., "The NAD(P)H oxidase inhibitor apocynin suppresses proapoptotic liver foci of rats," *Toxicologic Pathology*, vol. 45, no. 4, pp. 544-550, 2017.
- [37] D. M. Abdallah, H. S. El-Abhar, and D. H. Abdal-Aziz, "TEMPO, a membrane-permeable radical scavenger, attenuates gastric mucosal damage induced by ischemia/reperfusion: a key role for superoxide anion," *European Journal of Pharmacology*, vol. 603, no. 1-3, pp. 95-97, 2009.
- [38] C. C. F. Bernardy, A. C. Zarpelon, F. A. Pinho-Ribeiro et al., "Tempol, a superoxide dismutase mimetic agent, inhibits superoxide anion-induced inflammatory pain in mice," *BioMed Research International*, vol. 2017, Article ID 9584819, 15 pages, 2017.
- [39] J. Trnka, V. H. Blauk, A. Logan, R. A. J. Smith, and M. P. Murphy, "Antioxidant properties of MitoTEMPO and its hydroxylamine," *Free Radical Research*, vol. 43, no. 1, pp. 4-12, 2009.
- [40] A. N. Lyle and K. K. Grondling, "Modulation of vascular smooth muscle signaling by reactive oxygen species," *Physiology*, vol. 21, pp. 269-280, 2006.
- [41] D. F. Liao, Z. G. Jin, A. S. Baas et al., "Purification and identification of secreted oxidative stress-induced factors from vascular smooth muscle cells," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 1, pp. 189-196, 2000.
- [42] K. Satoh, H. Shimokawa, and B. C. Berk, "Cyclophilin A: promising new target in cardiovascular therapy," *Circulation Journal*, vol. 74, no. 11, pp. 2249-2256, 2010.
- [43] A. Horita, A. Karata, S.-I. Ohno et al., "Immaturity of smooth muscle cells in the neointima is associated with acute coronary syndrome," *Cardiovascular Pathology*, vol. 24, no. 1, pp. 26-32, 2015.
- [44] F. Y. Chen, L. Qin, G. Li, G. Tellides, and M. Simons, "Fibroblast growth factor (FGF) signaling regulates transforming growth factor beta (TGF β)-dependent smooth muscle cell phenotype modulation," *Scientific Reports*, vol. 6, no. 1, 2016.
- [45] S. Yoshiyama, Z. Chen, T. Okagaki et al., "Nicotine exposure alters human vascular smooth muscle cell phenotype from a contractile to a synthetic type," *Atherosclerosis*, vol. 237, no. 2, pp. 464-470, 2014.
- [46] H. Qin and J. Zhou, "Src family kinases (SFK) mediate angiotensin II-induced myosin light chain phosphorylation and hypertension," *PLoS One*, vol. 10, no. 5, article e0127891, 2015.
- [47] H. S. Li, Q. Lin, J. Wu et al., "Myosin regulatory light chain phosphorylation is associated with leiomyosarcoma development," *Hematology and Pharmacotherapy*, vol. 92, pp. 830-838, 2017.