

# Las proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*) como potenciales dianas terapéuticas en aterosclerosis

Julio Madrigal-Matute<sup>a</sup>, Óscar López-Franco<sup>a</sup>, Luis M. Blanco-Colio<sup>a</sup>, Begoña Muñoz-García<sup>a</sup>, Priscila Ramos-Mozo<sup>a</sup>, Melany van Oostrom<sup>a</sup>, Olivier Meilhac<sup>b</sup>, Jean-Baptiste Michel<sup>b</sup>, Jesús Egido<sup>a</sup> y José L. Martín Ventura<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Patología Vascular. Fundación Jiménez Díaz. Universidad Autónoma. Madrid. España.

<sup>b</sup>Unit 698 Inserm. París. Francia.

Las *heat shock proteins* (HSP) son una familia de proteínas que se producen en grandes cantidades por la mayoría de las células como respuesta al estrés. Las HSP se localizan tanto en arterias sanas, como en placas ateroscleróticas, aunque su papel en la aterosclerosis está aún por definir. En el presente estudio, nuestro objetivo fue analizar el efecto de la modulación de las HSP en procesos involucrados en la formación de la placa de ateroma, como el estrés oxidativo, la inflamación y la apoptosis. Para ello, hemos usado un inhibidor de la HSP90 (17-AAG), el cual es capaz de inducir un aumento en los valores de expresión de la HSP70/HSP27. Inicialmente, hemos observado que el tratamiento con 17-AAG es capaz de reducir la actividad de la NAD(P)H oxidasa inducida por factor de necrosis tumoral alfa. Asimismo, el tratamiento moduló distintas vías de señalización proliferativas (p. ej., MAPK), así como la activación del factor nuclear kappa B (NF-κB) inducidas por un cócktail de citocinas (interferón gamma/

interleucina 6 [IL-6]). En estas condiciones, se observó una disminución en los niveles de citocinas proinflamatorias (p. ej., IL-6). Por último, mientras el tratamiento con 17-AAG provocó una disminución en la apoptosis después de la incubación con diversos estímulos proapoptóticos, la inhibición de la HSP27 mediante transfección con un siARN específico aumentó la apoptosis celular inducida por elastasa. Estos resultados indican que la modulación de los valores de ciertas HSP puede representar una nueva aproximación terapéutica en el tratamiento de enfermedades inflamatorio-proliferativas como la aterosclerosis.

**Palabras clave:**

Aterosclerosis. Inflamación. Apoptosis. *Heat shock proteins*.

## HEAT SHOCK PROTEINS AS POTENTIAL THERAPEUTIC TARGETS IN ATHEROSCLEROSIS

Heat shock proteins (HSP) are a family of proteins present in the majority of cells and are produced as a cell protection mechanism against adverse conditions. HSP are present in both atherosclerotic plaques and healthy arteries, although their role in atherosclerosis remain to be defined. Our objective was to investigate the effect of HSP90 inhibitors in the modulation of the different processes involved in atherogenesis. We have used an HSP90 inhibitor (17-AAG), which is able to increase the heat shock response. Treatment of monocytes and vascular smooth muscle cells with 17-AAG increased HSP70 expression. Under

Correspondencia: Este estudio ha recibido una beca de la Sociedad Española de Arteriosclerosis, Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 2007/60896; SAF2007/63648), Comunidad de Madrid (S2006/GEN-0247), Fondo de Investigaciones Sanitarias (CP04/00060), Ministerio de Sanidad y Consumo, Instituto de Salud Carlos III (RETICS RD06/0014/0035), Fundación Ramón Areces.

Correspondencia: Dr. J. Egido.  
Laboratorio de Patología Vascular. Fundación Jiménez Díaz.  
Avda. de los Reyes Católicos, 2. 28040 Madrid. España.  
Correo electrónico: jegido@fjd.es

Recibido el 17-2-2009 y aceptado el 16-4-2009.

these conditions, 17-AAG was able to decrease NADPH oxidase activity induced by TNF- $\alpha$ . Stimulation of cells with cytokines induced the activation of different signalling pathways (e.g. MAPKs and NF- $\kappa$ B) and increased the levels of cytokines such as IL-6, which was diminished by HSP90 inhibitors. Finally, while treatment with 17-AAG prevented the apoptosis of cells induced pro-apoptotic stimuli, HSP27 silencing increased apoptosis induced by elastase. HSP90 inhibitors decrease pro-atherogenic processes, suggesting that these drugs may have beneficial effects in the treatment of atherosclerosis.

*Key words:*

Atherosclerosis. Inflammation. Apoptosis. Heat shock proteins.

## Introducción

La aterosclerosis es la mayor causa de mortalidad en el mundo occidental. Es un proceso complejo que empieza a desarrollarse desde la juventud y progresa de manera asintomática hasta la edad adulta<sup>1</sup>, y se caracteriza por la selección de células inflamatorias, proliferación de células del músculo liso vascular (CMLV), neovascularización y apoptosis<sup>2</sup>. La ruptura de la placa es el punto de partida que da lugar a complicaciones cardiovasculares, como el infarto de miocardio o el ataque al corazón<sup>3</sup>.

Diversos estudios han mostrado la implicación de las especies reactivas del oxígeno (ERO) en la aterosclerosis, aunque no están del todo claros los mecanismos moleculares a través de los cuales participan en el desarrollo de la placa de ateroma<sup>4</sup>. El sistema NAD(P)H oxidasa es la principal fuente de producción de ERO en la pared de los vasos y está presente en células endoteliales, CMLV y en monocitos/macrófagos<sup>5</sup>. La NAP(P)H oxidasa fagocítica consiste en un complejo asociado a membrana que incluye al citocromo b<sub>558</sub>, el cual a su vez comprende las subunidades gp91<sup>phox</sup> y p22<sup>phox</sup>, y a las subunidades citosólicas p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup> y rac<sup>6</sup>. Recientemente, se ha mostrado que hay una correlación positiva entre la actividad NAD(P)H oxidasa y el grosor de la íntima-media, un marcador de aterosclerosis<sup>7</sup>.

En la actualidad, la aterosclerosis se describe como una enfermedad inflamatoria crónica<sup>8</sup>. Las lesiones ateroscleróticas están formadas por un núcleo rico en lípidos recubierto de una capa fibrótica, la cual confiere resistencia a las lesiones y está compuesta de colágeno y otras proteínas de matriz

extracelular sintetizadas por las CMLV. Las células inflamatorias, principalmente macrófagos, sintetizan y secretan metaloproteinasas (MMP) que degradan la cápsula fibrosa, la debilitan y favorecen su rotura por acción de las fuerzas hemodinámicas<sup>9</sup>. La rotura de la capa fibrosa dará lugar a la formación de un trombo que, si ocluye la luz vascular, puede ocasionar un síndrome coronario agudo<sup>10</sup>. De acuerdo con estas consideraciones, se ha observado que las placas ateroscleróticas causantes de un episodio coronario están infiltradas por macrófagos, linfocitos T y CMLV activadas con mayor frecuencia que las placas consideradas estables. En un trabajo realizado en nuestro laboratorio, hemos confirmado que en los hombros de las lesiones ateroscleróticas, que es la región con mayor predisposición a la rotura, hay más células inflamatorias y menos CMLV que en otras zonas de la lesión aterosclerótica<sup>11</sup>.

La apoptosis, o muerte celular programada, representa el mecanismo principal por el cual el organismo elimina células indeseables y mantiene la homeostasia celular. El desequilibrio entre supervivencia y muerte celular afecta a la integridad de los diferentes tejidos y puede contribuir al desarrollo de diferentes enfermedades, como la aterosclerosis. En diferentes estudios se ha demostrado la presencia de apoptosis en aterosclerosis coronaria, carotídea y arteria aórtica<sup>12</sup>. Las CMLV localizadas en la zona fibrótica de la placa aterosclerótica y los macrófagos localizados en la íntima muestran un índice elevado de apoptosis comparado con el vaso normal<sup>13</sup>. Hay diferentes estímulos capaces de inducir apoptosis en las células que componen la placa, entre los que se encuentran las lipoproteínas de baja densidad (LDL) oxidadas, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) o el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ).

Las HSP son una familia de proteínas que están presentes en la mayoría de las células y se clasifican según su peso molecular (p. ej., HSP70 por su peso de 70 kDa). Estas proteínas se producen en grandes cantidades por las células como respuesta al estrés mecánico, a la estimulación con citocinas o a las altas temperaturas, como mecanismo de protección frente a estas condiciones adversas<sup>14</sup>. En el ámbito intracelular, las HSP actúan como chaperonas, facilitando el ensamblaje correcto de las proteínas, así como la translocación de oligómeros, pero también favorecen la eliminación de las proteínas que están dañadas de forma irreversible. Las HSP, entre ellas las HSP27 y HSP70, se han localizado en placas ateromatosas avanzadas<sup>15,16</sup>, aunque aún se desconoce el papel que pueden de-

sempeñar en la aterosclerosis. Las HSP pueden modular diversos procesos involucrados en la formación de la placa de ateroma<sup>17</sup>. Así, las CMLV expresan HSP27 y su expresión aumenta en respuesta a estrés hemodinámico, lo cual indica que podría prevenir la proliferación de estas células<sup>18</sup>. También se ha observado que la sobreexpresión de la HSP27 mediante tratamiento con herbamicina es capaz de disminuir el proceso proliferativo asociado a la formación de la placa de ateroma<sup>19</sup>. Finalmente, en un estudio reciente, se ha observado que la HSP27 no se expresa en biopsias de corazones transplantados en las que se forma una vasculopatía, lo cual muestra que la desaparición de la HSP27 podría estar implicada en el desarrollo de la aterosclerosis<sup>20</sup>.

Dentro de las HSP, la HSP90 es una proteína chaperona que participa en el correcto ensamblaje de múltiples proteínas, incluidos mediadores de señales de transducción y reguladores transcripcionales<sup>21</sup>. Las ansomicinas benzoquinonas son un tipo de antibiótico que ha demostrado tener actividad inhibitoria de HSP90. La geldamicina es el compuesto más usado dentro de este grupo, el cual compete con el ATP por la unión al extremo N-terminal de HSP90. Así, los inhibidores de la HSP90 pueden aumentar de forma indirecta la expresión de otras HSP (p. ej., HSP70), y favorecen la disociación del HSF1 del complejo formado con HSP90. A pesar de su actividad inhibitoria, su estudio clínico en pacientes con cáncer se detuvo debido a la inestabilidad del compuesto y a su toxicidad<sup>22</sup>, que dieron lugar al desarrollo de nuevos análogos, como el 17-N-alilamino-17-demetoxigeldanamicina (17-AAG). El 17-AAG tiene efectos similares a la geldamicina, pero con una estabilidad metabólica mayor y una toxicidad menor<sup>23</sup>. Aunque la principal aplicación terapéutica de los inhibidores de la HSP90 ha sido en el campo del cáncer, recientemente se ha observado que estos fármacos pueden tener efectos antiinflamatorios<sup>24</sup>. En cambio, no se ha descrito hasta el momento el posible efecto de estos inhibidores en el campo cardiovascular. El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de la modulación HSP en diversos procesos implicados en aterosclerosis.

## Materiales y métodos

### *Estudios in vitro*

#### Reactivos

El inhibidor de la HSP90, 17-AAG (Biomol, Plymouth Meeting) se disolvió en DMSO estéril. El cóctail de citocinas proinflamatorias está compuesto por 100 unidades/ml de interleucina

humana 6 (IL-6, PeproTech, Rocky Hill) combinado con 1.000 U/ml de interferón gamma humano (IFN- $\gamma$ , PeproTech, Rocky Hill). El TNF- $\alpha$  se usó a 25 ng/ml (R&D systems, Minneapolis). La elastasa se adquirió en Calbiochem (Darmstadt [Alemania]).

### Líneas celulares

Las células THP-1 crecieron en medio RPMI 1640 (BioWittaker, Verviers [Bélgica]) con 10% suero fetal bovino de complementado (FBS), L-glutamina 1% (2 mM), y penicilina-estreptomicina 1% (100 U/ml y 100 ug/ml, respectivamente; Invitrogen, Carlsbad).

Las CMLV humanas crecieron en medio Ham's F-12 (Cambrex, Verviers [Bélgica]) suplementado con 10% FBS, penicilina-estreptomicina 1%, insulina-transferina-selenio (ITS, Invitrogen), y 30  $\mu$ g/ml de suplemento de crecimiento para células endoteliales (ECGS, Sigma-Aldrich, St. Louis). CMLV de rata crecieron en medio DMEM (BioWittaker, Verviers [Bélgica]) suplementado con 10% FBS, L-glutamina 1% y penicilina-estreptomicina 1%. Las células se cultivaron a 37 °C en atmósfera de 5% CO<sub>2</sub>.

### Estudios de ARN

El ácido ribonucleico (ARN) total de células se aisló con Trizol (Invitrogen) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y la pureza del ARN se determinaron por espectrofotometría a 260 y 280 nm. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real se realizó en un sistema TaqMan ABI 7700 según Muñoz-García et al<sup>25</sup>.

### Estudios de proteínas

#### 1. Western Blot

La expresión de proteínas y la activación de las diferentes cinasas en células en cultivo se determinaron mediante Western blot, como se describe previamente<sup>26</sup>. Los anticuerpos primarios usados fueron: HSP70 (1:1000; SPA-810 D, Stressgen), pHSP27 (1:5000, Epitomics), pP38 (1:500; sc-7973, Santa Cruz) y  $\alpha$ -tubulina (1:1000; T-5168, Sigma).

#### 2. Ensayo de retardo de movilidad electroforética

En extractos nucleares de células (10 ug), se realizaron ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA). Los extractos se incubaron con 0,035 pmol del oligonucleótido [<sup>32</sup>P- $\gamma$ ]-NF- $\kappa$ B (Promega, Madison) y se resolvió en un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. La especificidad se confirmó con una sonda sin marcar<sup>27</sup>.

### Transfecciones

La transfección de siARN para HSP27 (human HSP27 siARN sc-29350; Santa Cruz Biotechnology) se realizó siguiendo lo descrito previamente<sup>26</sup>.

### Estudios de viabilidad celular

#### 1. MTT

Las CMLV crecieron hasta estar confluentes y se les privó de suero durante 24 h. Al final del experimento, el cultivo se lavó con suero salino y las células que permanecían adheridas se cuantificaron mediante el ensayo de viabilidad con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil bromido tetrasodio (MTT) según se describe en Meilhac et al<sup>28</sup>.

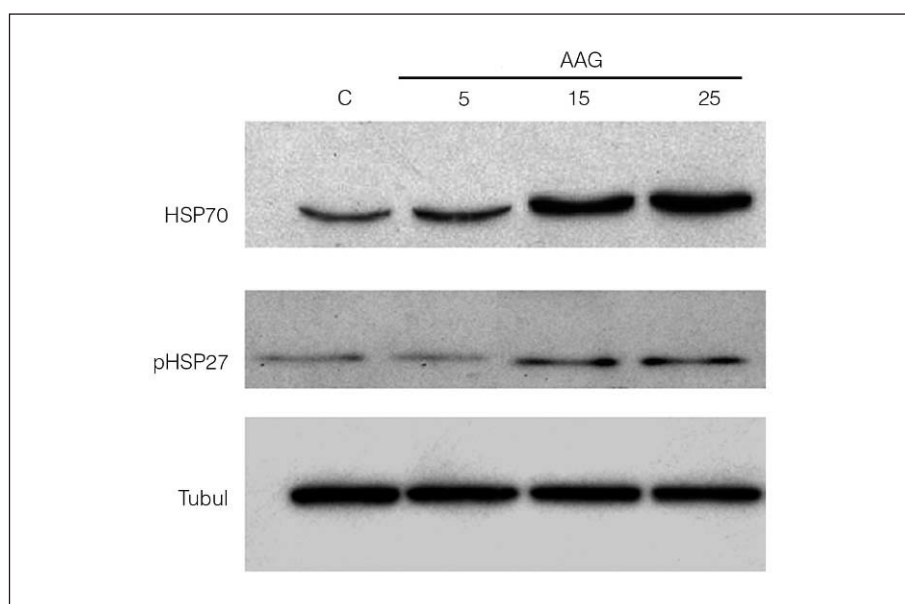


Figura 1. Modulación de la expresión de HSP por 17-N-alilamino-17-demetoxigeldanamina (17-AAG). Aumento en los valores de expresión de HSP70 y de fosforilación de HSP27 tras la preincubación con diferentes concentraciones de 17-AAG en monocitos. Resultados similares se obtuvieron con células del músculo liso vascular.

## 2. *Kit apoptosis*

El grado de apoptosis celular se cuantificó mediante un inmunoanálisis enzimático (Cell death detection ELISAPLUS; Roche) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## Actividad NAD(P)H

Para determinar la actividad de la NAD(P)H oxidasa se usó el ensayo de quimioluminiscencia de la lucigenina, como se describe en Zalba et al<sup>7</sup>. La reacción se midió durante 5 min cada 10 s en un luminómetro Berthold Sirius.

## Producción de especies reactivas de oxígeno

La generación de ERO se midió por fluorescencia con DCF como se describe previamente en Manea et al<sup>4</sup>. Cada placa individual se midió por triplicado en un lector de placas de 96 GENios Tecan.

## Estudios in vivo

### Muestras procedentes de endarterectomía carotídea

En el estudio se incluyó a 20 pacientes que se sometieron a endarterectomía carotídea en nuestra institución. Cada paciente firmó un consentimiento informado antes de incluirlo en el estudio. El estudio lo revisó y aprobó el comité ético de la Fundación Jiménez Díaz. El día de la operación, los especímenes de endarterectomía se extrajeron para el estudio. También se incluyó un grupo de arterias mamarias sanas procedentes de *bypass*.

## Inmunohistoquímica

Para los estudios histológicos, se siguió lo descrito previamente en Blanco-Colio et al<sup>29</sup>. Los anticuerpos primarios utilizados en las muestras humanas procedentes de endarterectomía carotídea fueron caspasa 3 activa (1:100; G7481, Promega) y HSP27 (1:100; sc-1049, Santa Cruz). La cuantificación de la

expresión proteica en placas humanas se realizó según lo descrito en Martín-Ventura et al<sup>26</sup>.

## Análisis estadístico

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa Instat, aplicando los test de ANOVA, Student-Newman-Keuls y Tukey-Kramer. Las diferencias se consideraron significativas con valores de  $p < 0,05$ . Los resultados se expresaron como la media  $\pm$  error estándar. Para los estudios in vitro se emplearon al menos 3 cultivos celulares independientes.

## Resultados

### Modulación de los valores de HSP: inhibidores de HSP90

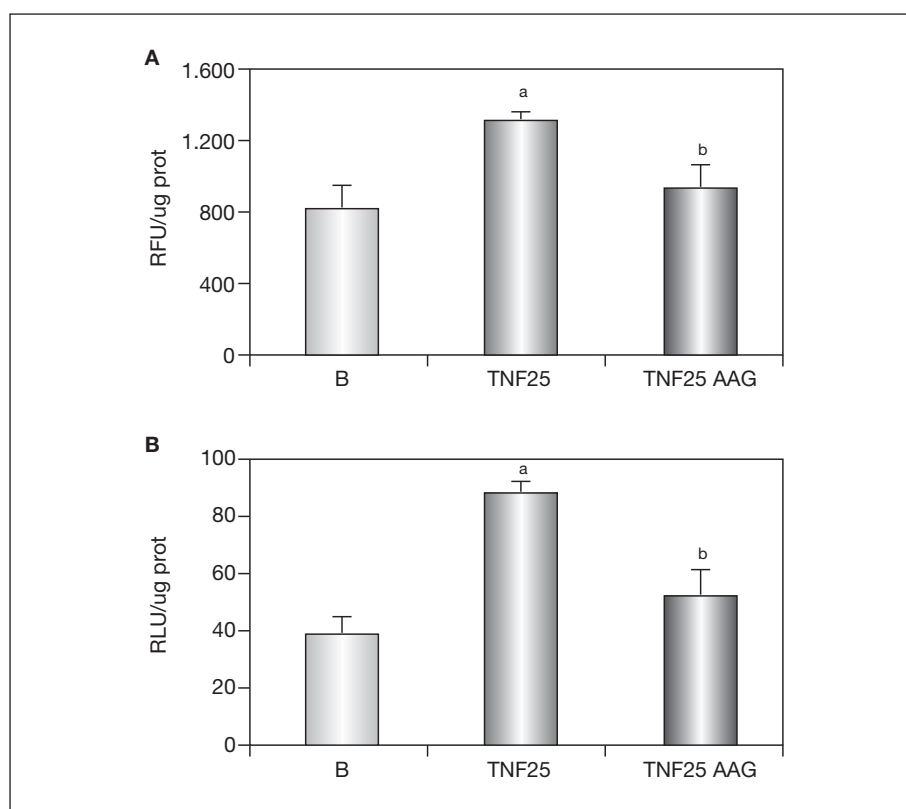
Inicialmente, quisimos comprobar el efecto de un inhibidor de la HSP90 (derivado de la geldanamina, 17-AAG) en monocitos y células de músculo liso vascular. Para ello, se realizó la incubación de las células durante 4 h con el 17-AAG y observamos un incremento de la expresión proteica de HSP70 (fig. 1). En esas mismas condiciones, no observamos cambios significativos en la expresión de HSP27 (posiblemente debido a su alta expresión constitutiva), pero sí en la forma fosforilada de HSP27.

### Estrés oxidativo

Posteriormente, quisimos comprobar si el tratamiento con los inhibidores de la HSP90 podría modular el estrés oxidativo. La incubación con TNF- $\alpha$  produjo un incremento notable en la producción de ERO en CMLV (fig. 2a) y en la actividad de la



Figura 2. Efecto del tratamiento con 17-N-alilamino-17-de-metoxigeldanamicina (17-AAG) en el estrés oxidativo. Efecto de 17-AAG en la producción de ROS total (A) o en la activación de la NAD(P)H oxidasa inducida por un agente prooxidante como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (B). <sup>a</sup>p < 0,05 frente a basal. <sup>b</sup>p < 0,05 frente a estimulado.



NAD(P)H oxidasa en monocitos (fig. 2b), mientras que la preincubación con el 17-AAG redujo de manera clara ambos procesos.

#### Vías de señalización implicadas en proliferación e inflamación

La estimulación durante 30-60 min con un cócktail de citocinas proinflamatorias (IFN- $\gamma$ /IL-6) aumentó la activación de cinasas implicadas en la proliferación, como p38 (fig. 3a), y del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (no mostrado), efecto que se revirtió cuando las células se preincubaron con 17-AAG. Asimismo, el tratamiento con 17-AAG produjo una disminución significativa de los valores de expresión de IL-6 inducida por las citocinas proinflamatorias (fig. 3b).

#### Apoptosis

En numerosos estudios, las HSP han mostrado su papel regulador en la supervivencia de la célula. En nuestro estudio, para determinar si el incremento de las HSP mediante el inhibidor de la HSP90, 17-AAG, podía tener efectos citoprotectores, sometimos a las células a 2 tipos de estrés: oxidativo (0,5 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 4 h) y térmico (60 min a 45

°C). Las CMLV estimuladas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o con calor mostraron un descenso en la viabilidad, que se revirtió con 17-AAG (fig. 4a). Al analizar la apoptosis producida tras el choque térmico, se observó que la incubación con AAG disminuía de forma considerable el porcentaje de apoptosis en monocitos (fig. 4b).

Para intentar dilucidar si el efecto producido en la apoptosis al tratar las células con los inhibidores de la HSP90 se debía al incremento en la síntesis de determinadas HSP, como la HSP27 o la HSP70, o a la inhibición de diferentes rutas de señalización, se diseñó un experimento de inhibición de HSP27 mediante transfección con siARN. Dado que la elastasa está presente en placas ateroscleróticas humanas<sup>30</sup> e induce apoptosis en CMLV, quisimos analizar si la HSP27 era capaz de modular este efecto. Para ello, se transfectaron las CMLV con un siARN específico dirigido contra el ARN mensajero (ARNm) de la HSP27 mediante la técnica del fosfato cálcico. Tras 72 h, observamos que las células transfectadas con siARN presentaban valores de expresión proteica menores respecto a las células basales (no mostrado). El efecto fue específico de la HSP27, ya que los valores de la HSP70 no variaron

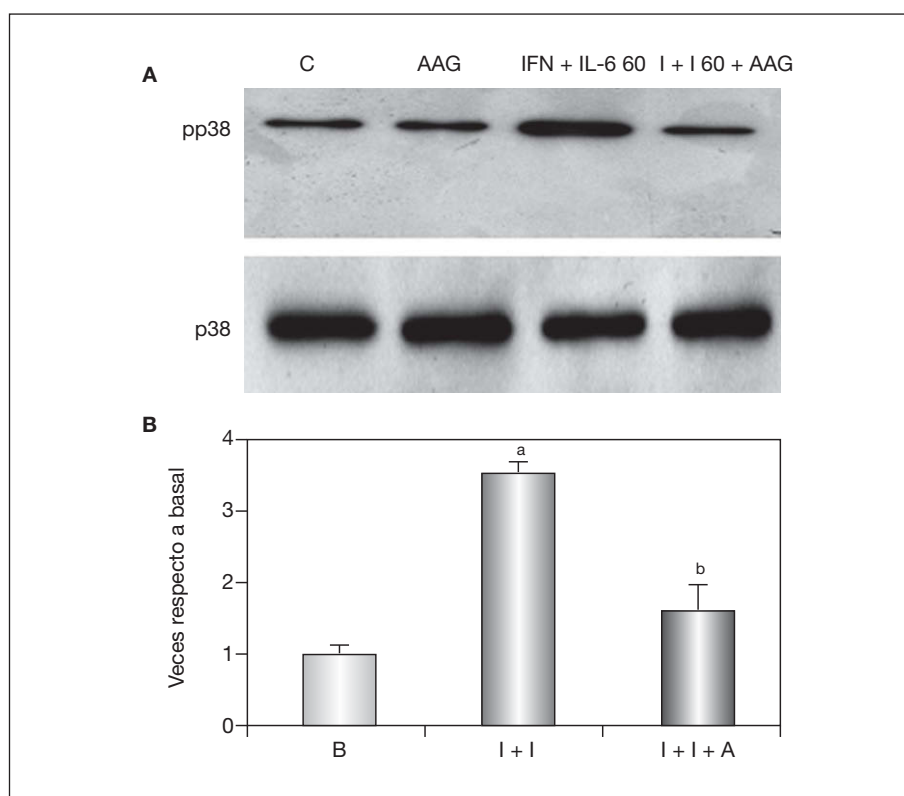


Figura 3. Efecto de 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) en las vías proliferativas e inflamatorias. Inhibición de la fosforilación de p38 (A) y de la expresión de la interleucina 6 (IL-6) en monocitos humanos (THP-1) tras preincubación con 17-AAG (15nM, 4 h) y posterior estimulación con un cóctail de citocinas proinflamatorias (interferón gamma [IFN- $\gamma$ ]/IL-6) (B). ARNm: ácido ribonucleico mensajero. <sup>a</sup>p < 0,05 frente a basal. <sup>b</sup>p < 0,05 frente a estimulado.

después de la transfección. Tras transfectar con siARN, incubamos las CMLV con elastasa durante 18 h, lo que provocó el anoikis de CMLV. La viabilidad de las CMLV se redujo de forma significativa cuando las células se incubaron con elastasa y se transfectaron con el siARN de la HSP27, en comparación con las células estimuladas con elastasa, pero sin transfectar ( $18 \pm 4$  frente a  $42 \pm 18\%$ ;  $p < 0,05$ ) (fig. 5a). En este sentido, observamos que la disminución de la viabilidad celular observada tras la transfección con el siARN de la HSP27 estaba asociado a un aumento en la apoptosis ( $11 \pm 1$  frente a  $26 \pm 3$  A405\* $10^{-3}$  min $^{-1}$ ;  $p < 0,05$ ) (fig. 5b). Finalmente, para ver si los mecanismos descritos podrían tener relevancia in vivo, analizamos la expresión de la HSP27 y de la caspasa 3 activa en placas ateroscleróticas humanas, y observamos que había una correlación inversa entre ambos parámetros ( $r = -0,62$ ;  $p = 0,006$ ) (fig. 6).

## Discusión

La aterosclerosis es la primera causa de muerte en la sociedad occidental. Aunque se ha profundizado en el conocimiento de los mecanismos que subyacen en esta enfermedad, todavía quedan aspectos sin definir. En este sentido, un campo activo

de investigación es la búsqueda de nuevas dianas diagnósticas y terapéuticas, que puedan ayudar tanto a la prevención como al tratamiento de esta enfermedad. Hemos observado la presencia de las HSP27 y HSP70 en arterias sanas y placas ateroscleróticas avanzadas, aunque aún se desconoce el papel que pueden desempeñar en la aterosclerosis. Nuestro objetivo fue analizar los efectos que tendría la modulación de los valores de estas proteínas en diversos procesos involucrados en la formación de la placa de ateroma. Para ello, empleamos inicialmente un inhibidor de la HSP90 como el 17-AAG, ya que la inhibición de la HSP90 puede dar lugar a una regulación positiva en la síntesis de otras HSP (p. ej., HSP70) a través de la translocación al núcleo de HSF1. Así, comprobamos que el aumento en los valores de HSP70 al estimular las células con este inhibidor de HSP90 era notable en los diferentes tipos celulares implicados en aterosclerosis, como los monocitos y CMLV. Una vez que confirmamos que la inducción de la síntesis de estas proteínas in vitro es posible dentro de nuestro sistema, se procedió a estudiar su efecto en diferentes procesos implicados en el desarrollo de la aterosclerosis. Aunque la actividad NAD(P)H oxidasa es esencial para el organismo, se ha asociado con ate-

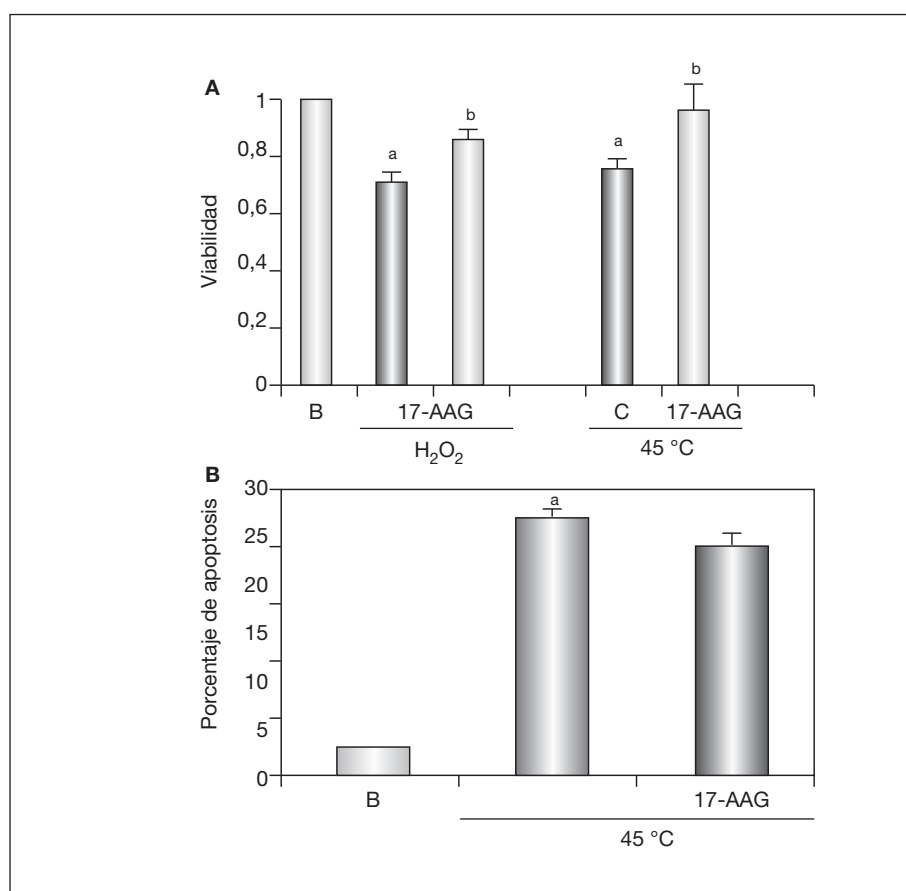


Figura 4. Efecto del 17-N-alilamino-17-demetoxigeldanamina (17-AAG) en la apoptosis. A. Las células del músculo liso vascular se estimularon con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM) o 45 °C durante 60 min preincubados o no con 17-AAG. La viabilidad se estimó mediante MTT. B. Cuantificación de la fragmentación de ADN en THP que se sometieron a 45 °C durante 60 min y preincubados o no con 17-AAG. <sup>a</sup>p < 0,05 frente a basal. <sup>b</sup>p < 0,05 frente a estimulado.

rosclerosis en pacientes asintomáticos<sup>7</sup>, lo que indica que la producción de ERO mediada por la NAD(P)H oxidasa puede tener un papel crucial en la iniciación y el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica. Además, hay estudios que correlacionan la gravedad de la lesión aterosclerótica con la sobreexpresión de p22<sub>phox</sub>; a su vez, la producción de ERO, fundamentalmente producido por células inflamatorias, se asocia con p22<sub>phox</sub> en arterias coronarias humanas con aterosclerosis<sup>31</sup>. Todos estos datos muestran que puede haber un nexo causal entre la NAD(P)H oxidasa y el desarrollo de la lesión. Por ello, quisimos comprobar si la preincubación con los inhibidores de la HSP90 podía reducir la producción de ERO y disminuir la actividad NAD(P)H oxidasa en células que hubieran sido sometidas a estímulos prooxidantes. Nuestro estudio muestra que las células que se habían tratado con el 17-AAG tienen valores inferiores tanto en la producción de ERO, como de actividad NAD(P)H oxidasa respecto a células sin tratar. Por otro lado, se ha observado que durante la proliferación y la diferenciación de células del miocardio, la chaperona

HSP25/27 puede reducir el daño y el estrés oxidativo y prevenir la apoptosis gracias a un mecanismo dependiente de redox<sup>32</sup>. En este sentido, el equilibrio entre proliferación y apoptosis es clave dentro del desarrollo de la placa, siendo uno u otro más predominante dependiendo del estadio de ella. En estadios tempranos, la proliferación de las CMLV contribuye de manera considerable a la formación de la placa, mientras que en estados más avanzados la apoptosis de CMLV puede contribuir a la formación del trombo mediante el debilitamiento de la capa fibrosa<sup>33</sup>. Los resultados obtenidos en este estudio muestran también que la preincubación de células vasculares con los inhibidores de la HSP90 produce la atenuación en la activación de la ruta de señalización de las MAP cinasas y del NF-κB inducida por un cóctail de citocinas. La modulación de estas vías de señalización puede ser la causa de la disminución observada en los valores de ARNm de importantes citocinas proinflamatorias, como IL-6. Este efecto de modulación de la inflamación puede deberse a la función de HSP90 como chaperona, en la cual muchas proteínas cliente requieren de su

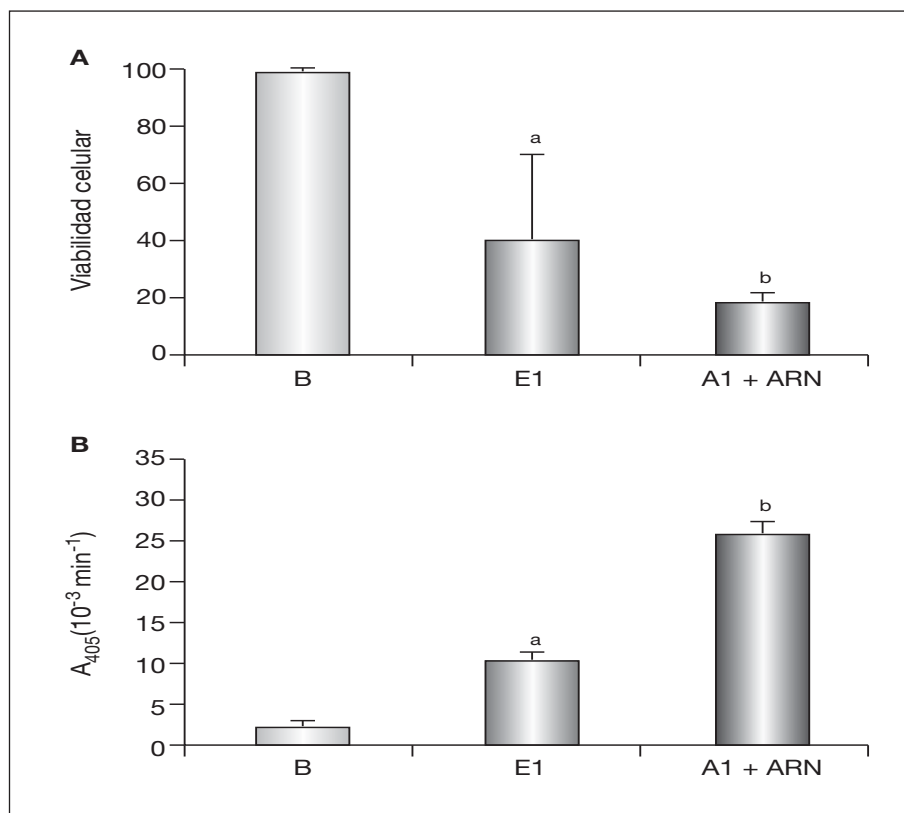


Figura 5. Efecto de HSP27 en apoptosis. A. Las células del músculo liso vascular (CMLV) humanas se incubaron con elastasa (El) en células transfectadas o no con un siARN para HSP27 (25 nmol, El + siARN). La viabilidad se determinó mediante MTT. B. Cuantificación de la fragmentación de ADN en CMLV incubadas con El y transfectadas o no con un siARN para HSP27 (25 nmol, El + siARN). <sup>a</sup>p < 0,05 frente a basal. <sup>b</sup>p < 0,05 frente a tratados con El.

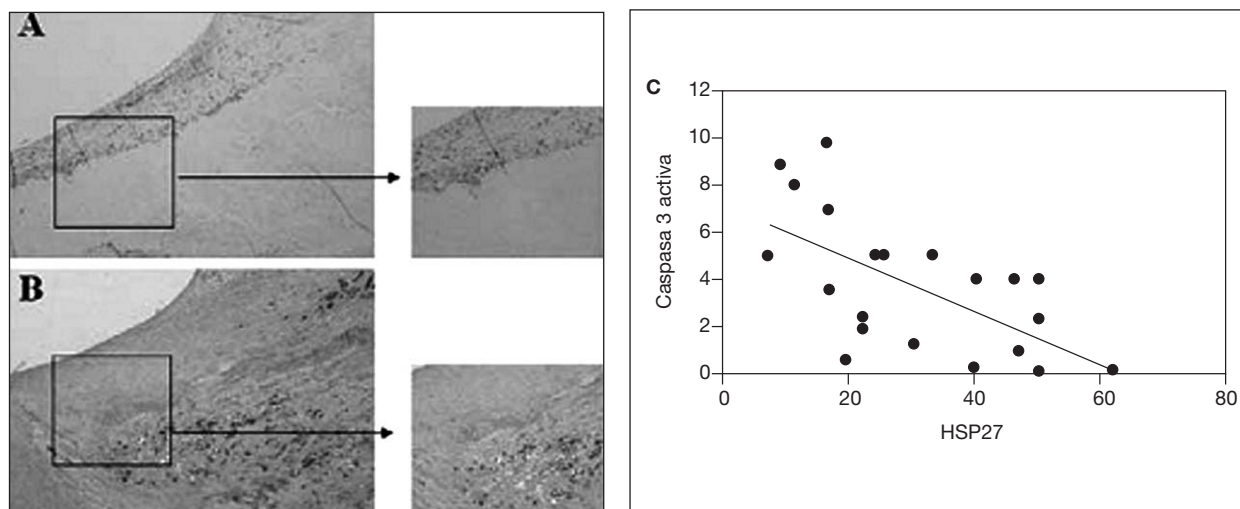


Figura 6. Inmunotinción de HSP27 y caspasa 3 en placas ateroscleróticas humanas carotídeas. Inmunohistoquímica para HSP27 (A) y caspasa 3 activa (B). C. Cuantificación relativa de la expresión de HSP27 y caspasa 3 activa.

actividad para la maduración y el ensamblaje, mientras que su inactivación da lugar a la ubiquitinación y posterior degradación proteasomal de proteínas cliente<sup>23</sup>. El aumento en la síntesis de HSP asegura el mantenimiento de la homeostasa

celular y la supervivencia. Previamente, se había observado que el incremento de las HSP mediante estrés subletal con calor protege la mitocondria contra el estrés oxidativo y previene su muerte por apoptosis<sup>34</sup>. Dado que la sobreexpresión de HSP70



ha mostrado inhibir la apoptosis en diferentes tipos celulares<sup>35-37</sup>, se quiso comprobar si la modulación de las HSP podría proteger de la apoptosis inducida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o calor, observando que el nivel de apoptosis era significativamente inferior en las células que se han tratado con los inhibidores de HSP90. Estos datos, en concordancia con datos previos de otros grupos, indican que la HSP70 pudiera desempeñar un papel clave en la protección de las CMLV frente al estrés oxidativo<sup>38</sup>. Posteriormente, se quiso estudiar si este efecto modulador de la apoptosis podía tener lugar por la regulación específica de una HSP. Mediante el uso de un siARN para HSP27, se observó que las células que no tenían HSP27 eran más sensibles a la apoptosis inducida por elastasa que las que tenían valores normales de HSP27. Así, estos datos parecen mostrar que HSP27 podría modular el efecto de la elastasa y otros mediadores de la apoptosis en CMLV. La relevancia y la consistencia de estos resultados se completan con un último estudio en el que se demuestra una correlación en placas ateroscleróticas de pacientes entre los valores de HSP27 y caspasa 3 activa. Estos datos parecen indicar que la disminución de los valores de HSP27 ofrece un escenario en la placa aterosclerótica en el que se está produciendo un proceso patológico de remodelado vascular caracterizado por un aumento de la apoptosis.

En conclusión, los datos de este estudio demuestran que la modulación de los valores de HSP puede regular diversos procesos relacionados con la aterosclerosis, como el estrés oxidativo, la inflamación y la apoptosis. Serán necesarios estudios in vivo en marcha para demostrar el posible efecto terapéutico de la modulación de las HSP en la aterosclerosis.

## Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado gracias a la beca SEA 2006 de Investigación Básica I.

## Bibliografía

- Viles-Gonzalez JF, Fuster V, Badimon JJ. Atherothrombosis: a widespread disease with unpredictable and life-threatening consequences. *Eur Heart J*. 2004;25:1197-207.
- Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352:1685-95.
- Aikawa M, Libby P. The vulnerable atherosclerotic plaque: pathogenesis and therapeutic approach. *Cardiovasc Pathol*. 2004;13:125-38.
- Manea A, Raicu M, Simionescu M. Expression of functionally phagocyte-type NAD(P)H oxidase in pericytes: effect of angiotensin II and high glucose. *Biol Cell*. 2005;97:723-34.
- Griendling KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase. Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000;86:494-501.
- Bokoch GM, Knaus UG. NADPH oxidases: not just for leukocytes anymore! *Trends Biochem Sci*. 2003;28:502-8.
- Zalba G, Belouqui O, San José G, Moreno MU, Fortuño A, Díez J. NADPH oxidase-dependent superoxide production is associated with carotid intima-media thickness in subjects free of clinical atherosclerotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1452-7.
- Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26.
- Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation*. 1996;94:2013-20.
- Van der Wal AC, Becker AE, Van der Loos CM, Das PK. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation*. 1994;89:36-44.
- Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, Gómez-Hernández A, Arribas A, Ortega L, et al. NF-kappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability. *Stroke*. 2004;35:458-63.
- Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation*. 1995;91:2703-11.
- Bjorkerud S, Bjorkerud B. Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of gruel and plaque instability. *Am J Pathol*. 1996;14:367-80.
- Xu Q. Role of heat shock proteins in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2002;22:1547-59.
- Berberian PA, Myers W, Tytell M, Challa V, Bond MG. Immunohistochemical localization of heat shock protein-70 in normal-appearing and atherosclerotic specimens of human arteries. *Am J Pathol*. 1990;136:71-80.
- Martín-Ventura JL, Duran MC, Blanco-Colio LM, Meilhac O, Leclercq A, Michel JB, et al. Identification by a differential proteomic approach of heat shock protein 27 as a potential marker of atherosclerosis. *Circulation*. 2004;110:2216-9.
- Beere HM. "The stress of dying": the role of heat shock proteins in the regulation of apoptosis. *J Cell Sci*. 2004;117:2641-51.
- McGregor E, Kempster L, Wait R, Gosling M, Dunn MJ, Powell JT. F-actin capping (CapZ) and other contractile saphenous vein smooth muscle proteins are altered by hemodynamic stress: a proteomic approach. *Mol Cell Proteomics*. 2004;3:115-24.
- Connolly EM, Kelly CJ, Chen G, O'grady T, Kay E, Leahy A, et al. Pharmacological induction of HSP27 attenuates intimal hyperplasia in vivo. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 2003;25:40-7.
- De Souza AI, Wait R, Mitchell AG, Banner NR, Dunn MJ, Rose ML. Heat shock protein 27 is associated with freedom from graft vasculopathy after human cardiac transplantation. *Circ Res*. 2005;97:192-8.
- Pratt WB, Toft DO. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp Biol Med* (Maywood). 2003;228:111-33.
- Supko JG, Hickman RL, Grever MR, Malspeis L. Preclinical pharmacologic evaluation of geldanamycin as an antitumor agent. *Cancer Chemother Pharmacol*. 1995;36:305-15.
- Powers MV, Workman P. Targeting of multiple signalling pathways by heat shock protein 90 molecular chaperone inhibitors. *Endocr Relat Cancer*. 2006;13:S125-S135.
- Poulaki V, Iliaki E, Mitsiades N, Mitsiades CS, Paulus YN, Bula DV, et al. Inhibition of Hsp90 attenuates inflammation in endotoxin-induced uveitis. *FASEB J*. 2007;21:2113-23.
- Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, Martínez E, Sánchez S, Hernández G, Ortega L, et al. Fln4 is upregulated in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells and is expressed in human carotid atherosclerotic plaques: modulation by atorvastatin. *Stroke*. 2006;37:2044-53.
- Martín-Ventura JL, Nicolas V, Houard X, Blanco-Colio LM, Leclercq A, Egido J, et al. Biological significance of decreased HSP27 in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2006;26:1337-43.
- Duque N, Gomez-Guerrero C, Egido J. Interaction of IgA with Fc alpha receptors of human mesangial cells activates transcription

- factor nuclear factor-kappa B and induces expression and synthesis of monocyte chemoattractant protein-1, IL-8, and IFN-inducible protein 10. *J Immunol.* 1997;159:3474-82.
28. Meilhac O, Ho-Tin-Noé B, Houard X, Philippe M, Michel JB, Anglés-Cano E. Pericellular plasmin induces smooth muscle cell anoikis. *FASEB J.* 2003;17:1301-3.
  29. Blanco-Colio LM, Muñoz-García B, Martín-Ventura JL, Lorz C, Díaz C, Hernández G, et al. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors decrease Fas ligand expression and cytotoxicity in activated human T lymphocytes. *Circulation.* 2003;108:1506-13.
  30. Sukhova GK, Shi GP, Simon DI, Chapman HA, Libby P. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1998;102:576-83.
  31. Azumi H, Inoue N, Ohashi Y, Terashima M, Mori T, Fujita H, et al. Superoxide generation in directional coronary atherectomy specimens of patients with angina pectoris: important role of NAD(P)H oxidase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1838-44.
  32. Mehlen P, Schulze-Osthoff K, Arrigo AP. Small stress proteins as novel regulators of apoptosis. Heat shock protein 27 blocks Fas/APO-1- and staurosporine-induced cell death. *J Biol Chem.* 1996;271:16510-4.
  33. Walsh K, Smith RC, Kim HS. Vascular cell apoptosis in remodeling, restenosis, and plaque rupture. *Circ Res.* 2000;87:184-8.
  34. Polla BS, Kantengwa S, François D, Salvio S, Franceschi C, Marsac C, et al. Mitochondria are selective targets for the protective effects of heat shock against oxidative injury. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:6458-63.
  35. DeMeester SL, Buchman TG, Qiu Y, Jacob AK, Dunnigan K, Hotchkiss RS, et al. Heat shock induces IkappaB-alpha and prevents stress-induced endothelial cell apoptosis. *Arch Surg.* 1997;132:1283-7.
  36. Garcia-Bermejo L, Vilaboa NE, Perez C, Galan A, De Blas E, Aller P. Modulation of heat-shock protein 70 (HSP70) gene expression by sodium butyrate in U-937 promonocytic cells: relationships with differentiation and apoptosis. *Exp Cell Res.* 1997;236:268-74.
  37. Mosser DD, Caron AW, Bourget L, Is-Larose C, Massie B. Role of the human heat shock protein hsp70 in protection against stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 1997;17:5317-27.
  38. Johnson AD, Berberian PA, Tytell M, Bond MG. Differential distribution of 70-kD heat shock protein in atherosclerosis. Its potential role in arterial SMC survival. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:27-36.