

La vitamina D induce apoptosis en células musculares lisas

M.J. Gimeno, J.M. Bellón, C. Corrales, M. Rodríguez, R. López y J. Buján

Departamento de Ciencias Morfológicas y Cirugía. Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá. Madrid.

Fundamento. La degeneración de la capa media arterial es una de las características de la arteriosclerosis que compromete tanto a las láminas elásticas como a las células musculares y a la matriz extracelular. Uno de los factores que aumentan la calcificación arterial es la vitamina D que, administrada junto a una dieta hipercolesterolémica, favorece también el depósito de colesterol y participa en el avance de la lesión vascular. El objetivo de este trabajo fue valorar el efecto de distintas concentraciones de vitamina D₂ sobre la proliferación de células musculares lisas en cultivo.

Método. Se utilizaron células musculares procedentes de arteria abdominal de rata y se ensayaron distintas concentraciones de vitamina D₂ (0-200.000 U/ml) durante 2 h y hasta 4 días. Se realizó un análisis de la proliferación celular en el que se valoró la incorporación de ³H-timidina y se utilizó la técnica de TUNEL para medir el daño celular como fragmentación del material genético.

Resultados. Las células musculares lisas del grupo control, crecidas sólo con medio de cultivo, proliferan durante todo el tiempo de estudio. Sin embargo, la presencia de esta vitamina en los medios de incubación indujo modificaciones del índice proliferativo, y se llegó a paralizar el crecimiento del cultivo con la mayor dosis de vitamina utilizada. Estos hallazgos se corresponden con un aumento de la muerte celular por apoptosis en las mismas células.

Conclusiones. La vitamina D₂ induce sobre las células musculares una inhibición de la proliferación y un aumento de la muerte celular

por apoptosis, y ambos parámetros dependen directamente del tiempo de incubación y de la concentración de vitamina D utilizada.

Palabras clave:

Vitamina D. Arteriosclerosis. Apoptosis. Células musculares.

VITAMIN D INDUCES APOPTOSIS IN SMOOTH MUSCLE CELLS

Background. Degeneration of the arterial medial layer is one of the characteristic features of arteriosclerosis and affects the elastic laminae, as well as the muscle cells and extracellular matrix. Among other factors, vitamin D induces arterial calcification and when administered in combination with a high cholesterol diet, contributes to cholesterol deposition and to the advance of the vascular lesion. This study was designed to evaluate the effect of different vitamin D₂ concentrations on the growth of cultured smooth muscle cells.

Method. Different vitamin D₂ concentrations (0-200.000 U/ml) were applied to 2h - 4 day cultures of muscle cells from rat abdominal artery. Cell proliferation was estimated through ³H-thymidine incorporation, and cell damage, assessed as DNA fragmentation was determined using the TUNEL technique.

Results. Smooth muscle cells incubated in the absence of vitamin D₂ proliferated throughout the study period. The presence of vitamin D₂ in the culture medium induced changes in the proliferation rate and led to growth cessation at the highest vitamin concentration used. These findings were concurrent with an enhanced apoptosis that was noted in the same cells.

Conclusions. Vitamin D₂ inhibits the proliferation of smooth muscle cells and enhances cell death via apoptosis in a concentration- and time-dependent manner.

Correspondencia: Dra. J. Buján.
Departamento de Ciencias Morfológicas y Cirugía.
Facultad de Medicina. Universidad de Alcalá.
Ctra N-II, km 33.600. 28871 Alcalá de Henares. Madrid.
Correo electrónico: mjulia.bujan@uah.es

Introducción

La calcificación es uno de los signos más característicos de la aterosclerosis y se considera indicador de la evolución de la enfermedad¹. Algunos estudios inciden en la importancia de la vitamina D en la inducción de la arteriosclerosis, y la mayoría de ellos se basan en la similitud entre las lesiones producidas por altas dosis de vitamina D y la esclerosis de Monckeberg's, que implica a la capa media de las arterias musculares humanas, lo que sugiere que la calcificación de los tejidos blandos es una consecuencia directa de la hipercalcemia o es secundaria a la inducción de procesos metastásicos y distróficos debidos a la vitamina D^{2,3}.

Existen estudios en la bibliografía dirigidos a examinar la acción de las distintas formas de vitamina D con actividad biológica, los cuales han evidenciado que los efectos de las vitaminas D₂ y D₃ pueden variar, dependiendo de los distintos animales de experimentación^{4,5}, y que, sobre la rata⁶, la vitamina D₂ es más eficaz que la D₃⁶.

La lesión principal producida por la vitamina D es una degeneración muscular, caracterizada por calcificación de la media⁷, aunque también favorece el depósito de colesterol cuando se administra junto a una dieta hipercolesterolemica^{8,9}. El proceso normal afecta, en primer lugar, a las láminas elásticas y, posteriormente, favorece la aparición de hiperplasia intimal^{10,11}.

De forma experimental, *in vivo*, grandes dosis de vitamina D inducen modificaciones en la media arterial de distintos animales de experimentación^{7,12} y, en ratas, arteriosclerosis^{13,14}; además, aumenta la calcificación de la lámina elástica, existe daño en la célula muscular medida como apoptosis celular y se altera la matriz extracelular circundante¹⁵⁻¹⁷.

Existe controversia sobre el efecto de la vitamina D₂ *in vitro*. La bibliografía refleja que esta vitamina puede actuar como agente antiproliferativo en células de origen epidermal¹⁸ y, cuando se añade a células musculares que proceden de territorios con enfermedad cardíaca o en presencia de colesterol, induce muerte celular^{19,20}, directamente relacionada con apoptosis²¹. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de distintas dosis de vitamina D₂ *in vitro* sobre células musculares lisas.

Material y métodos

Cultivo de célula muscular lisa

Las células musculares lisas (CML) fueron obtenidas de la aorta abdominal de hembras Sprague-Dawley de un peso aproximado de 250 g, mantenidas en condiciones estándar (28871-22A9).

Una vez extraídas, las arterias fueron lavadas varias veces con Minimal Essential Medium (MEM) en condiciones de esterilidad, cortadas y abiertas de forma longitudinal. La capa endotelial y la adventicia fueron eliminadas por raspado. La capa media fue cortada en pequeños explantos y digerida con una solución al 0,1% de colagenasa tipo I (Worthington) en MEM (una hora a 37 °C). Las células fueron entonces cultivadas con medio F-12 (GIBCO BRL) con 2 mM de L-glutamina (Gibco BRL) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (Gibco BRL), antibióticos (100 U/ml de penicilina/100 µg/ml de estreptomycin) (Gibco BRL) y 10 mM de HEPES (Gibco BRL) a 37 °C en una estufa humidificada y una atmósfera de CO₂ al 5%.

Los experimentos se llevaron a cabo sembrando las células (5 × 10⁴ células/pocillo) sobre cubreobjetos estériles dentro de placas multipocillo con 1 ml de medio de cultivo por pocillo. Se dejaron estabilizar 48 h y, a continuación, se diseñaron los siguientes grupos experimentales: grupo control; CML crecida sólo con medio F-12, y CML incubadas durante 2, 24, 48 y 96 h con ergocalciferol (Vitamina D₂, SIGMA Chemical Co., St Louis, EE.UU.) a distintas concentraciones (200.000 U/ml, 140.000, 100.000 y 70.000 U/ml). Los metabolitos de la vitamina D se disolvieron en etanol (concentración final del 0,05%) y se añadieron al medio fresco.

Identificación morfológica

La identificación de las CML se llevó a cabo utilizando técnicas inmunocitoquímicas. Se utilizaron anticuerpos primarios antiactina de músculo liso (SIGMA) y antiactina total (donada por el Dr. Gabianni), ambos específicos para CML. El marcaje se desarrolló sobre células fijadas con metanol a -20 °C durante 5 min. Como anticuerpos secundarios, se utilizaron una IgG de conejo antirratón (Zymed laboratorios, Inc., CA, EE.UU.) y una IgG de cabra anticonejo (Nordic) diluidos 1/20 en PBS, pH 7,6, y conjugados con FITC. Las muestras se estudiaron utilizando un microscopio Zeiss Axiophot equipado con una lámpara de fluorescencia y las imágenes fueron grabadas en una película Fujichrome 400 (Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokio, Japón).

Ensayos de proliferación

Se añadió ³H-timidina (2 µCi/ml) 2 h antes de finalizar cada uno de los tiempos de estudio. Los cultivos se lavaron y se sometieron a técnicas autorradiográficas. Brevemente, el mismo día, los cubreobjetos se sumergieron en una dilución (1:1) en agua de la emulsión (NTBP-2, Eastman Kodak, Rochester, NY, EE.UU.) a 40 °C, y fueron almacenadas a 4 °C en la oscuridad durante 2 semanas. Se revelaron los cubreobjetos con D-19 (Kodak) durante 5 min con agitación. Tras un breve lavado en ácido acético al 0,5%, se fijaron con Rapid Fix (Kodak) durante 5 min, entonces se lavaron durante una hora en agua corriente y se dejaron secar a temperatura ambiente. Los cubres fueron teñidos con hematoxilina de Carazzi y se montaron.

Marcaje de ADN fragmentado *in situ*

La visualización de la fracción celular dañada *in vitro*, con el ADN fragmentado, se desarrolló por modificación del método de TUNEL²². Este método está basado en la detección *in situ* del ADN nucleosomal fragmentado característico de la apoptosis, por unión específica de deoxinucleóticos a los extremos 3-OH de la cromatina rota. Para esto, las muestras se someten a irradiación mediante la utilización de un microondas (Sanyo EM-704T) durante 5 min (350W) en tampón citrato 0,01M (pH 6). La detección del ADN fragmentado se llevó a cabo utilizando un *kit* (Calbiochem, CN Biosciences Inc., EE.UU.).

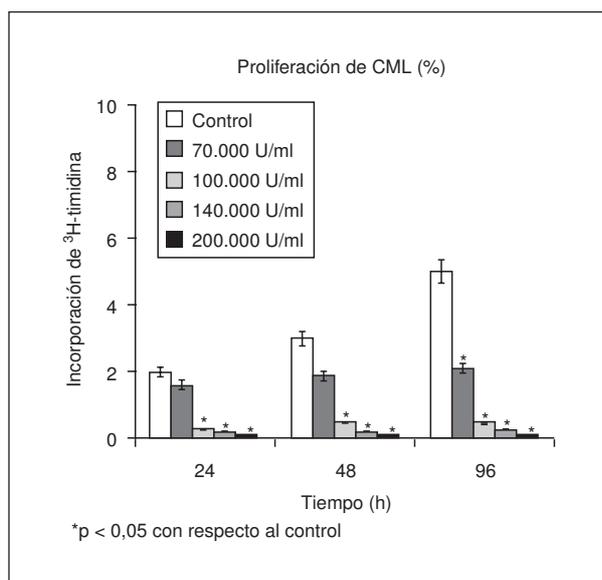


Figura 1. Proliferación celular en cultivo de las células musculares lisas (CML). La gráfica evidencia una disminución en el número de células en fase proliferativa en directa relación con el aumento de la dosis de vitamina D y el tiempo de incubación. (Los datos se representan como media \pm desviación estándar.)

Análisis estadístico

Los datos de los experimentos de proliferación y daño celular se expresan como media \pm desviación estándar. El test de la U de Mann-Whitney fue utilizado para evaluar las medidas. La significación estadística se estableció con una $p < 0,05$.

Resultados

Análisis morfológico

Todos los cultivos fueron positivos para los anticuerpos anti- α sm y antiactina, estableciéndose la pureza del cultivo en un 90-95%.

Las CML incubadas sólo con medio de cultivo tienen un índice proliferativo que aumenta, de forma gradual, a lo largo de los 4 días de estudio (fig. 1).

La presencia de vitamina D₂ en los medios de incubación de CML indujo una disminución del número de células proliferantes.

Especialmente llamativo fue el análisis de los cultivos crecidos en presencia de la máxima concentración utilizada de vitamina D₂ (200.000 U/ml). En estos grupos, las CML desde los primeros tiempos de estudio (24 h) demostraron signos de daño celular, característicos de muerte celular por apoptosis, las células tenían núcleos picnóticos y perdían adhesión al sustrato de crecimiento, y la población celular se vio drásticamente disminuida tras 4 días de incubación con la vitamina.

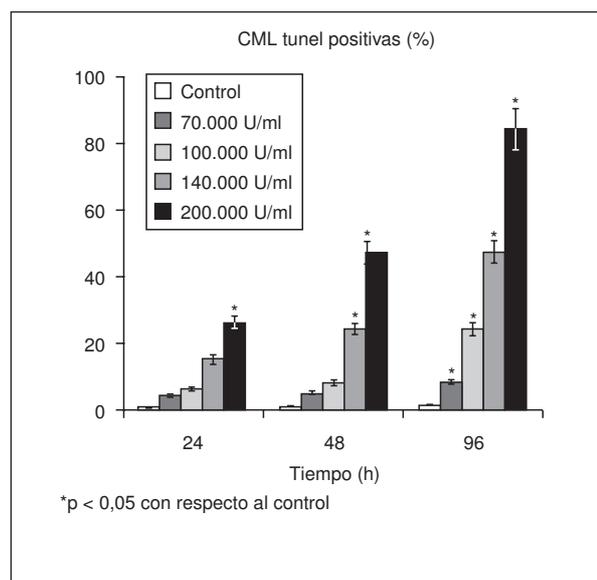


Figura 2. Porcentaje de células positivas para la técnica de TUNEL frente a células del grupo control. (Los datos se representan como media \pm desviación estándar.)

Estos signos apoptóticos fueron patentes en los cultivos de CML incubados con el resto de concentraciones de vitamina D₂ utilizadas en este estudio, siempre en proporción a la concentración utilizada y al tiempo de incubación.

Las CML in vitro son sensibles a la concentración de vitamina D₂

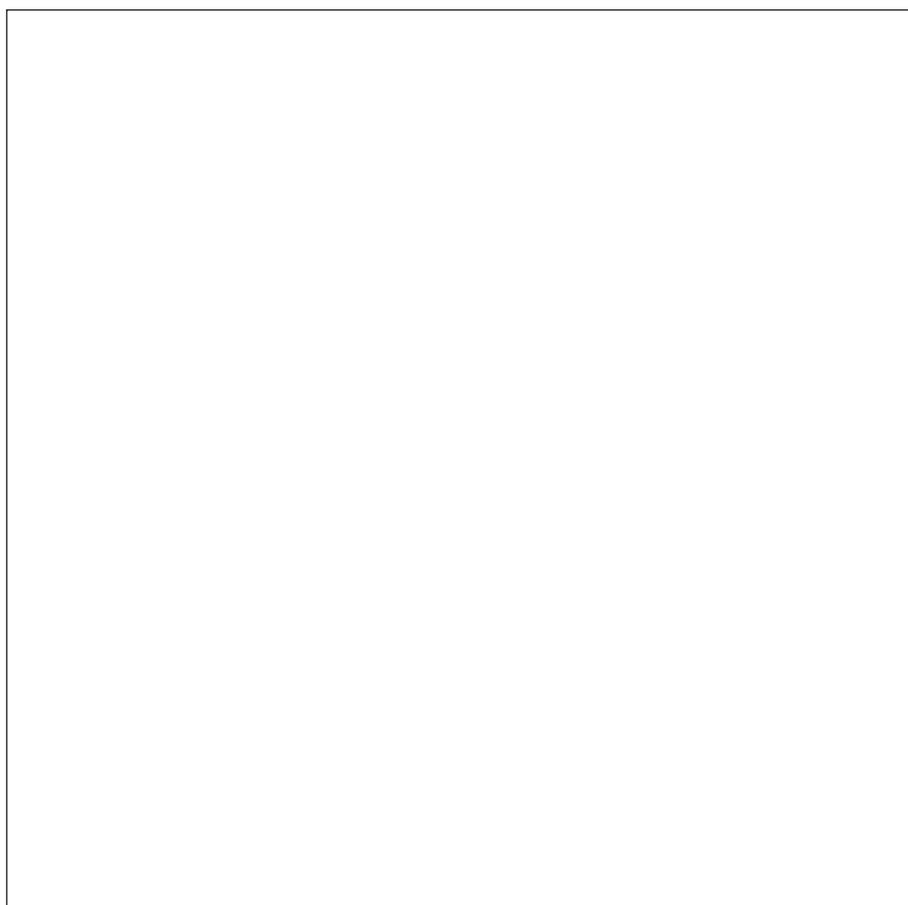
La utilización de la técnica de TUNEL demostró que la vitamina D₂, en función de la concentración y el tiempo de incubación, puede inducir fragmentación del material genético de la CML (figs. 2 y 3).

La adición exógena de vitamina D₂ a los cultivos demuestra la toxicidad de esta sustancia para las CML, dado que cuando se incuban las mismas células únicamente con medio de cultivo (control), no encontramos células cuyo ADN se encuentre fragmentado y, por tanto, no hay evidencias de daño celular.

Cuando la incubación se realiza en presencia de la máxima concentración de vitamina D₂ utilizada (200.000 U/ml) encontramos diferencias significativas, con respecto a lo observado en el grupo control, ya desde las primeras 24 h de estudio, diferencias que se mantienen hasta los 4 días de incubación con la vitamina D₂.

La concentración de vitamina D₂ más baja (70.000 U/ml) no induce la aparición de células positivas para el TUNEL hasta el último estadio analizado, 4 días de incubación, momento en que en-

Figura 3. Marcaje de células apoptóticas (flechas) con la técnica de TUNEL. Obsérvese la ausencia de CML positivas para TUNEL en el grupo control (a y b). La presencia de vitamina D (140.000 U/ml) en los medios de incubación induce la aparición de CML apoptóticas (c y d). La máxima concentración de vitamina D utilizada (200.000 U/ml) coincide con una mayor población apoptótica (e y f). (MO, 20X).



contramos diferencias significativas con respecto al grupo control.

La adición a los medios de cultivo de concentraciones de vitamina D₂ intermedias demuestran un comportamiento similar. La disminución del número de células viables sobre los cubreobjetos está en relación directa con la concentración de la vitamina D₂ y el tiempo de incubación.

Discusión

La vitamina D induce calcificación y aterosclerosis en la pared arterial en distintos animales de experimentación, aunque la calcificación no siempre es homogénea, pues depende del área vascular afectada^{2,7}. En cuanto a la aterosclerosis, la vitamina D potencia el depósito de colesterol en las arterias cuando se asocia a dietas ricas en colesterol, y sugiere que esta vitamina actúa sobre el metabolismo del colesterol¹¹.

La vitamina D actúa sobre cada tipo celular a través de sus receptores²³. Éstos, que están presentes en la mayoría de las células incluidas las musculares²⁴, se sitúan en el interior del núcleo celular

y regulan la transcripción de secuencias cromosómicas.

Existen muchos trabajos en la bibliografía sobre el efecto de la vitamina D tanto *in vivo* como *in vitro*. De especial interés resulta el trabajo de Trang et al⁵, que describe distintos efectos entre las vitaminas D₂ y D₃, en función del animal de experimentación utilizado. La mayoría de los trabajos utilizan la vitamina D₃, por su importancia y eficacia en el ser humano, pero la acción de la vitamina D₂ se ha estudiado poco. En un estudio reciente, el grupo de Rao⁶ establece que, sobre la rata, la vitamina D₂ es más eficaz que la D₃ y, por tanto, si queremos examinar la acción de la vitamina D sobre la CML en cultivo, deberemos utilizar la que más eficaz ha demostrado ser y, así, comparar con mayor fidelidad los resultados obtenidos con lo observado en las lesiones humanas.

La vitamina D promueve la absorción de fósforo y calcio, tanto en los animales como en los humanos, siendo hoy día utilizada como aditivo en distintos alimentos, como la leche. Sabemos que los requerimientos nutricionales de vitamina D₃ en el

ser humano varían en función de la edad (niños hasta 18 años, 10 µg/día) y del sexo (adultos 5-7,5 µg/día; embarazo y lactancia, dosis del adulto + 5 µg/día). Además, los valores séricos oscilarán en función de cuándo se ha producido la ingesta y de la estación del año. De ahí que los valores se muevan en rangos de 25 a 75 pg/ml en suero.

Los estudios *in vitro* han demostrado que la vitamina D₂ inhibe la proliferación celular de linfocitos, queratinocitos y células neoplásicas²⁵. No obstante, y dado que la vitamina D₂ está ligada directamente con la enfermedad cardiovascular, decidimos estudiar en profundidad el papel de esta molécula y contribuir, así, a entender su participación en el desarrollo de estos procesos patológicos. Para ello, establecimos las dosis idóneas útiles, con capacidad para inducir modificaciones sobre células musculares lisas, basándonos en un trabajo previo de nuestro grupo²⁶. En este experimento, se administraba una dieta calcificante a ratas Sprague-Dawley y se inducían lesiones ateroscleróticas, calcificación de las láminas elásticas y degeneración de células musculares lisas de la media, con una dosis de vitamina D de 100.000 U por cada 100 mg de dieta completa. Al realizar, ahora, un experimento *in vitro*, quisimos valorar distintas concentraciones, siempre con rangos similares a los utilizados *in vivo* y, así, poder determinar el efecto inducido por la vitamina D₂ sobre el músculo liso de la pared arterial de la rata.

En nuestro modelo, hemos demostrado que la vitamina D₂ induce muerte celular por apoptosis en las CML y que ésta es dependiente del tiempo de incubación con la vitamina. Utilizamos el método del TUNEL para estimar la muerte celular, aunque recientemente se ha demostrado que esta técnica también es utilizada para identificar células necróticas²⁷, células que transcriben²⁸, vesículas calcificadas de matriz²⁹ y ADN en reparación³⁰. Sin embargo, este método es el utilizado de forma generalizada para la detección de la fracción celular apoptótica^{31,32}.

La apoptosis es un fenómeno que se asocia a menudo a distintas afecciones vasculares, incluyendo aquellas que afectan a las musculares de la media³³. En nuestro modelo, la apoptosis es un fenómeno directamente asociado a la concentración de vitamina D utilizada, si bien depende de la duración del tratamiento. En cualquier caso, la vitamina D₂ demuestra ser altamente tóxica para la CML. Se ha sugerido que la apoptosis puede ser un mecanismo que, asociado al de proliferación, regula el número normal de CML cuando existe daño en la pared vascular y evita, de esta forma, la acumula-

ción excesiva de células en la región miointimal¹⁹. En la bibliografía se refleja que la vitamina D induce degeneración de la media arterial, alterando componentes como la matriz extracelular y las CML, que muestran signos característicos de apoptosis²⁰.

En este trabajo, se ha demostrado que la vitamina D₂ es tóxica para las CML en cultivo, y que está asociada a muerte celular por apoptosis. Estos hallazgos, junto a los descritos anteriormente por otros grupos, nos llevan a concluir que la administración de vitamina D induce una alteración en los componentes de la media de la pared vascular y que, junto a dietas hipercolesterolémicas o enfermedad vascular, es un factor de riesgo importante que se debe tener en cuenta. Hoy día, gran cantidad de los alimentos que se consumen llevan aportes vitamínicos exógenos, y en el caso de la vitamina D sería de interés general controlar su consumo excesivo.

Bibliografía

1. Rokita E, Cichoki T, Heck D, Jarczyk L, Strzalkowski A. Calcification of aortic wall in cholesterol-fed rabbit. *Atherosclerosis* 1991; 87: 183-193.
2. Demer LL. Effect of calcification on in vivo mechanical response at rabbit arteries to balloon dilatation. *Circulation* 1991; 83: 2083-2093.
3. Christian RC, Fitzpatrick LA. Vascular calcification. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1999; 8: 443-448.
4. Horst RL, Napoli JL, Littledike ET. Discrimination in the metabolism of orally dosed ergocalciferol and cholecalciferol by the pig, rat and chick. *Biochem J* 1982; 204: 185-189.
5. Trang HM, Cole DEC, Rubin LA, Pierratos A, Siu S, Vieth R. Evidence that vitamin D3 increase serum 25-hydroxyvitamin D more efficiently than does vitamin D2. *Am J Clin Nutr* 1998; 68: 854-858.
6. Rao DS, Dayal R, Siu-Caldera ML, Horst RL, Uskokovic MR, Tserng KY et al. Isolation and identification of 4,25-dihydroxyvitamin D2: a novel A-ring hydroxylated metabolite of vitamin D2. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999; 71: 63-70.
7. Takeo S, Anan M, Fujioka K, Kajihara T, Hiraga S, Miyake K et al. Functional changes of aorta with massive accumulation of calcium. *Atherosclerosis* 1989; 77: 175-181.
8. Kirui NA, Weisbode SE, Kinding OR. The role of dietary calcium on the development of soft tissue mineralization due to 1,25-dihydroxy vitamin D, intoxication in rats. *Virchows Arch B* 1981; 37: 251-263.
9. Bennani-Kabchi N, Kehel L, El Bouayadi F, Fdhil Hamarti A, Saidi A, Marquie G. New model of atherosclerosis in insulin resistant sand rats: hypercholesterolemia combined with D2 vitamin. *Atherosclerosis* 2000; 150: 55-61.
10. Mohtai M, Yamamoto T. Smooth muscle cell proliferation in the rat coronary artery induced by vitamin D. *Atherosclerosis* 1987; 63: 193-202.
11. Bennani-Kabchi N, Kehel L, El Bouayadi F, Amarti A, Saidi A, Marquie G. New model of atherosclerosis in sand rats subjected to a high cholesterol diet and vitamin D₂. *Therapie* 1999; 54: 559-565.
12. Stehbens WE. Localization of experimental calcification in rabbit blood vessels with particular reference to haemodynamics. *Angiology* 1988; 39: 597-608.
13. Kamio A, Taguchi T, Shirasishi M, Shitarra K, Fukushima K, Takebayashi S. Vitamin D sclerosis in rats. *Acta Pathol* 1979; 29: 545-562.

14. Kunitomo M, Kinoshita K, Bando Y. Experimental atherosclerosis in rat fed a vitamin D, cholesterol-rich diet. *J Pharmacol Dyn* 1981; 4: 718-723.
15. Eisenstein R, Zeruolis L. Vitamin D induced aortic calcification: a electron microscopic analysis. *Arch Pathol* 1964; 77: 27-35, 43.
16. Han DKM, Haudenschild CC, Hong MK, Tinkle BT, Leon MB, Lian G. Evidence for apoptosis in human atherogenesis and in rat vascular injury model. *Am J Pathol* 1995; 147: 267-277.
17. Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* 1995; 91: 2703-2711.
18. Jones G, Byford V, Makin HL, Kremer R, Rice RH, DeGraffenried LA et al. Anti-proliferative activity and target cell catabolism of the vitamin D analog 1 alpha 24(S)-(OH)₂D₃ in normal and immortalized human epidermal cells. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 133-140.
19. Bennett MR, Evan GI, Newby AC. Deregulated expression of the c-myc oncogene abolishes inhibition of proliferation of rat vascular smooth muscle cells by serum reduction, interferon gamma, heparin and cyclic nucleotide analogues and induces apoptosis. *Circ Res* 1994; 74: 525-536.
20. James TN. Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart from postnatal morphogenesis to paroxysmal arrhythmias. *Circulation* 1994; 90: 556-573.
21. Leszczynski D, Zhao Y, Luokkamaki K, Foegh ML. Apoptosis of vascular smooth muscle cells: protein kinase C and oncoprotein *Bcl-2* are involved in regulation of apoptosis in non-transformed rat vascular smooth muscle cell. *Am J Pathol* 1994; 145: 1265-1270.
22. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C et al. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem* 1996; 44: 959-968.
23. Sandgren ME, Bronnrgard M, DeLuca HF. Tissue distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D receptor in the male rat. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 611-616.
24. Kawashima H. Receptor of 1,25-dihydroxyvitamin D in a vascular smooth muscle cell line derived from rat aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 146: 1-6.
25. Pols HA, Birkenhager JC, Foeckens JA, Van Leeuwen JP. Vitamin D: a modulator of cell proliferation and differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990; 37: 873-876.
26. Buján J, Bellón JM, Sabater C, Jurado F, García-Honduvilla N, Domínguez B et al. Modifications induced by atherogenic diet in the capacity of the arterial wall in rats to respond to surgical insult. *Atherosclerosis* 1996; 122: 141-152.
27. Grasl-Kraupp B, Ruttikay-Nedecky B, Koudelka H, Bulkowska K, Bursch W, Schulte H. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995; 21: 1465-1468.
28. Kockx MM, Muhring J, Knaapen MW, De Meyer GR. RNA synthesis and splicing interferes with DNA in situ end labeling techniques used to detect apoptosis. *Am J Pathol* 1998; 152: 885-888.
29. Kockx MM, Muhring J, Bortier H, De Meyer GR, Jacob W. Biotin- or digoxigenin-conjugated nucleotides bind to matrix vesicles in atherosclerotic plaques. *Am J Pathol* 1996; 148: 1771-1777.
30. Kanoh M, Takemura G, Misao J, Hayakawa Y, Aoyama T, Nishigaki K et al. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation* 1999; 99: 2757-2764.
31. Makino Y, Shiraki K, Sugimoto K, Ito T, Yamanaka T, Fujikawa K et al. Histological features of cirrhosis with hepatitis C virus for prediction of hepatocellular carcinoma development; a prospective study. *Anticancer Res* 2000; 20: 3709-3715.
32. Proudfoot D, Skepper JN, Hegyi L, Bennett MR, Shanahan CM, Weissberg PL. Apoptosis regulates human vascular calcification in vitro: evidence for initiation of vascular calcification by apoptotic bodies. *Circ Res* 2000; 87: 1055-1062.
33. James TN, Terasaki F, Pavlovich ER, Vickhert AM. Apoptosis and pleomorphic micromitochondriosis in the sinus nodes surgically excised from five patients with the long QT syndrome. *J Clin Lab Med* 1993; 122: 309-323.