

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Dpto de BIOQUÍMICA Y BILOGÍA MOLECULAR

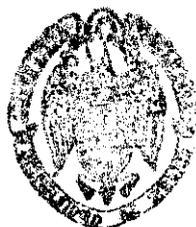
**EXPRESIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA
INDUCIBLE EN LA PARED VASCULAR TRAS
DENUDACIÓN ENDOTELIAL POR BALÓN:
PAPEL DE LAS PLAQUETAS**



TESIS DOCTORAL

FERNANDO GONZÁLEZ FERNÁNDEZ

Madrid, 1998



ARCHIVO



Fundación Jiménez Díaz

CLINICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCION

Avda. de los Reyes Católicos, 2 (Ciudad Universitaria)
28040 - MADRID

TELÉFONO
550 48 00

**D. ANTONIO LÓPEZ FARRÉ, DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS,
ADJUNTO DE INVESTIGACIÓN DE LA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ Y
PROFESOR HONORARIO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID,**

CERTIFICA:

Que *D. Fernando González Fernández, Licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección y supervisión la tesis titulada: "Expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en la pared vascular tras denudación endotelial por balón: papel de las plaquetas" en el Laboratorio de Nefrología, Hipertensión e Investigación Cardiovascular de la Fundación Jiménez Díaz.*

El presente trabajo reúne las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral y para que conste, firmo la presente en Madrid a 19 de Mayo de mil novecientos noventa y ocho.

Fdo. Dr. Antonio López Farré
Adjunto de Investigación FJD.



Fundación Jiménez Díaz

CLINICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCION

Avda. de los Reyes Católicos, 2 (Ciudad Universitaria)
28040 - MADRID

TELÉFONO
550 48 00

D. SANTOS CASADO PÉREZ, DOCTOR EN MEDICINA, JEFE DEL SERVICIO DE NEFROLOGÍA DE LA FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ, PROFESOR ASOCIADO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID,

CERTIFICA:

Que D. Fernando González Fernández, Licenciado en Ciencias Químicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado bajo mi dirección y supervisión la tesis titulada: "Expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en la pared vascular tras denudación endotelial por balón: papel de las plaquetas" en el Laboratorio de Nefrología, Hipertensión e Investigación Cardiovascular de la Fundación Jiménez Díaz.

El presente trabajo reúne las condiciones para ser presentado como Tesis Doctoral y para que conste, firmo la presente en Madrid a 19 de Mayo de mil novecientos noventa y ocho.

Fdo. Dr. Santos Casado Pérez
Jefe del Servicio de Nefrología FJD

ABREVIATURAS EMPLEADAS

AMPc : Adenosín monofosfato cíclico

Ang I: Angiotensina I

CE: Células endoteliales

CMLV: Células de músculo liso vascular

ECA: Enzima convertidora de angiotensina I

EDRF: Factor relajante dependiente del endotelio

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EEM: Error estándar de la media

FCS: Suero de ternera fetal

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos

GP Ib: Glicoproteína plaquetaria Ib

GP IIb/IIIa: Glicoproteína plaquetaria IIb/IIIa

IGF-1: Factor de crecimiento semejante a la insulina

L-NAME: N^w-nitro-L-arginina-metil ester

LPS: Lipopolisacárido de E. coli

NO: Óxido nítrico

NOS: Óxido nítrico sintasa

NOSe: Óxido nítrico sintasa endotelial

NOSi: Óxido nítrico sintasa inducible

PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas

TGF- β : Factor transformante del crecimiento β

TNF- α : Factor de necrosis tumoral α

t-PA: Activador tisular del plasminógeno

A mis padres

“El hombre es siempre esclavo de lo que dice y dueño de lo que calla”

AGRADECIMIENTOS

El trabajo que hay detrás de esta tesis es un trabajo que se ha realizado en equipo, y por tanto son muchas las gentes a las que hay que agradecer de una u otra forma su participación en ella.

Quiero agradecer al Dr. Casado por darme la oportunidad de formar parte de su equipo, y le agradezco sus comentarios serenos y certeros propios de su “joven alma de hidalgo castellano”.

Al Dr. López-Farré, por ofrecerme el regalo maravilloso de poder trabajar en esta tesis y por permitir que me asomase a ese mundo difícil y apasionante de la investigación básica, de la que él es un máximo ejemplo.

A la Fundación Jiménez Díaz por utilizar durante todo este tiempo sus instalaciones, y a la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz, por concederme la beca que lleva su nombre para poder realizar este trabajo.

A Inma, cuyas manos han tenido mucho que ver en esta tesis, mi más sincero agradecimiento, y espero que las musas de las artes inspiren tus ideas tan bien como manejan tus manos.

A Mirentxu, que siempre vigila mi salud nutricional y por ayudarnos a todos cuando algo del sistema informático no va bien.

Gracias a mis compañeros de laboratorio por haber tenido la paciencia de enseñarme las técnicas de laboratorio: Mercedes, Lourdes, Trini, Marga y Mar, y al sector masculino, Juanan, y José, por aguantarme mis agobios.

Al sector clínico del laboratorio: Luis, Angel, Octavio (por enseñarme algo de cirugía), José Luis, Mayte, Ana Reyer (“la guapa del laboratorio”) ellos nos enseñan la senda de la clínica, y a veces su mejor medicina: la risa.

A ese sector olvidado a veces, pero no por ello menos importante, que representan Mary Carmen y Josefa, por un lado, pues ellas hacen posible que todo funcione con normalidad, y a las “chicas del animalario”: Pilar, Juani y Luisa, que siempre tienen las ratas a nuestra disposición.

A mi familia, que durante todos estos años, y aún en los peores momentos, me han estado apoyando incondicionalmente, y en especial a tres personas, de las que he heredado mucho de lo que soy y que ya no están aquí para poder verlo: mi abuelo, mi padrino y D. Francisco F.

Finalmente quiero agradecer a todos aquellos que alguna vez me ayudaron en mi trabajo, y también a los que no lo hicieron porque así me enseñaron a valorar más el significado de la palabra AMISTAD.

INDICE

INDICE

| | |
|--|----|
| I. INTRODUCCION | 1 |
| 1. MORFOLOGÍA ARTERIAL | 2 |
| 2. EL ENDOTELIO VASCULAR | 3 |
| 2.1. EL ÓXIDO NÍTRICO | 6 |
| 2.1.1 Características Generales | 6 |
| 2.1.2 Síntesis del óxido nítrico | 6 |
| 2.2. NO SINTASAS | 8 |
| 2.2.1. NOS constitutiva | 9 |
| 2.2.2. NOS inducible | 10 |
| 3. CONCEPTO DE ATEROSCLEROSIS | 11 |
| 3.1. PATOGENIA DE LA ATEROSCLEROSIS | 12 |
| 3.2. ¿CÓMO SE INICIA LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN LA ATEROSCLEROSIS? | 13 |
| 4. LAS PLAQUETAS | 14 |
| 4.1. GLICOPROTEÍNA PLAQUETARIA IIb/IIIa | 16 |
| 5. MECANISMO DE LA ANGIOPLASTIA | 18 |
| 6. FISIOPATOLOGÍA DE LA REESTENOSIS | 19 |
| 6.1. REESTENOSIS TEMPRANA: ACTIVACIÓN PLAQUETARIA | 19 |
| 6.2. REESTENOSIS TARDÍA: PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS | 21 |
| 7. FACTORES QUE DETERMINAN Y REGULAN LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS MUSCULARES LISAS | 22 |
| II. OBJETIVOS | 25 |

| | |
|---|--------|
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 26 |
| 1. Obtención de la aorta torácica | 26 |
| 2. Obtención y cultivo de células endoteliales | 27 |
| 3. Obtención y cultivo de células de músculo liso vascular | 28 |
| 4. Coincubación de células endoteliales y de músculo liso vascular | 29 |
| 5. Medida de producción de óxido nítrico | 30 |
| 6. Expresión de la proteína óxido nítrico sintasa inducible | 31 |
| 7. Modelo de denudación endotelial in vivo | 32 |
| 8. Estudios histopatológicos | 39 |
| 9. Preparación de una suspensión de plaquetas | 40 |
| 10. Producción de un suero antiplaquetas de rata | 40 |
| 11. Determinación de los niveles plasmáticos del TNF- α | 41 |
| 12. Bloqueo de los receptores de la glicoproteína IIb/IIIa plaquetaria y del receptor del PDGF | 41 |
| 13. Medida de la agregación plaquetaria ex-vivo | 42 |
| 14. Análisis estadístico | 43 |
| IV. RESULTADOS | 44 |
| 1. EFECTO DEL ENDOTELIO EN LA EXPRESIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE EN LA PARED VASCULAR | |
| 1.1. Producción de nitritos en segmentos arteriales | 44 |
| 1.2. Expresión de la óxido nítrico sintasa en segmentos arteriales | 45 |

| | |
|--|----|
| 2. EFECTO DEL ENDOTELIO EN LA EXPRESIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR EN UN SISTEMA DE COCULTIVO | |
| 2.1. Producción de nitritos en células de músculo liso vascular en monocultivo y en presencia de células endoteliales | 47 |
| 2.2. Expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en células de músculo liso vascular en monocultivo y en presencia de células endoteliales . | 48 |
| 3. EFECTO DE LA DENUDACIÓN ENDOTELIAL IN VIVO EN LA EXPRESIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE | |
| 3.1. Denudación endotelial de la carótida de rata | 49 |
| 3.1.1. Tinción con sales de plata | 50 |
| 3.1.2. Estudios histopatológicos | 52 |
| A) Hematoxilina-eosina | 52 |
| B) Tinción de Masson | 56 |
| 3.2. Expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en carótidas desendotelizadas <i>in vivo</i> | 60 |
| 4. EFECTO DE LAS PLAQUETAS DESPUES DE LA DENUDACIÓN ENDOTELIAL | 63 |
| 4.1. Efecto de las plaquetas en la producción de nitritos en segmentos arteriales desendotelizadas <i>in vitro</i> | 63 |
| 4.2. Efecto de las plaquetas sobre la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en segmentos arteriales desendotelizados <i>in vitro</i> | 64 |
| 4.3. Efecto del PDGF en la producción de nitritos en segmentos arteriales desendotelizados <i>in vitro</i> | 66 |
| 4.4. Efecto del PDGF en la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en segmentos arteriales desendotelizados <i>in vitro</i> | 67 |
| 4.5. Efecto de las plaquetas sobre la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible después de la denudación <i>in vivo</i> | 68 |
| 4.6. Efecto del bloqueo de la GP I II /IIIa en la expresión de la óxido nítrico | |

| | |
|---|------------|
| sintasa inducible después de la denudación in vivo | 71 |
| 4.7. Efecto del bloqueo del receptor del PDGF en la expresión de la óxido nitríco sintasa inducible después de la denudación in vivo | 72 |
| V. DISCUSIÓN | 73 |
| 1. Papel del endotelio en la regulación de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en células de músculo liso vascular | 73 |
| 2. La óxido nítrico sintasa inducible se expresa en el vaso varios días después de realizada la denudación endotelial | 75 |
| 3. Papel de las plaquetas en la regulación de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible. | 77 |
| 4. Papel del PDGF en la inhibición de las plaquetas activadas sobre la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible. | 79 |
| 5. Estudio de la glicoproteína IIb/IIIa plaquetaria. | 80 |
| 6. Significado fisiopatológico de los resultados obtenidos | 82 |
| VI. CONCLUSIONES | 85 |
| VII. BIBLIOGRAFÍA | 86 |
| VIII. EPILOGO | 100 |

INTRODUCCION

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de mortalidad en el mundo occidental. En España, y debido principalmente a hábitos culturales, entre los que no se puede olvidar la dieta, la tasa de mortalidad por enfermedad cardiovascular es de las más bajas del mundo occidental ⁽⁴⁴⁾. A pesar de esto, se estima que el 40 % del total de fallecimientos en nuestro país se deben a procesos de origen cardiovascular.

La aterosclerosis es la condición patológica que se encuentra detrás de trastornos tan importantes como la cardiopatía isquémica, los accidentes cerebrovasculares y la arteriopatía periférica. Sin embargo, no fue hasta mediados de este siglo cuando se estableció que esta enfermedad era la responsable de la mayoría de las muertes de origen cardiovascular. Aunque todavía no se conozca bien su patogenia, en los últimos años hemos avanzado en el conocimiento de nuevos mecanismos involucrados, debido principalmente al avance en las técnicas de biología celular y molecular aplicadas en el estudio de las células de la pared vascular (endotelio y músculo liso), y por el progreso en el conocimiento de las alteraciones del metabolismo lipídico asociado a esta patología.

Una de las consecuencias de un proceso aterosclerótico es la reducción del flujo de sangre, debida a la estenosis producida por la placa de ateroma. Una forma cada vez más habitual de tratar esta estenosis es mediante el empleo de la angioplastia, con la que se consigue restablecer un flujo adecuado de sangre. Sin embargo, a pesar de que la intervención quirúrgica culmina con éxito en el 90 % de los casos, y no cabría esperar ninguna otra complicación que no se debiera a la propia intervención en sí, en el 35-40 % de los sujetos angioplastiados, y en un tiempo menor a un año, vuelve a reestenosarse el vaso, denominándose a este proceso como reestenosis postangioplastia.

En esta tesis estudiamos algunos mecanismos moleculares y de interacción celular que entran en funcionamiento en la post-angioplastia, y cuyo conocimiento puede ser importante para reducir o impedir la reoclusión del vaso, intentando de esta forma evitar el proceso de la reestenosis. Para ello analizaremos en primer lugar la morfología de la pared arterial, y profundizaremos en los mecanismos de producción del óxido nítrico (NO).

1.- MORFOLOGIA ARTERIAL

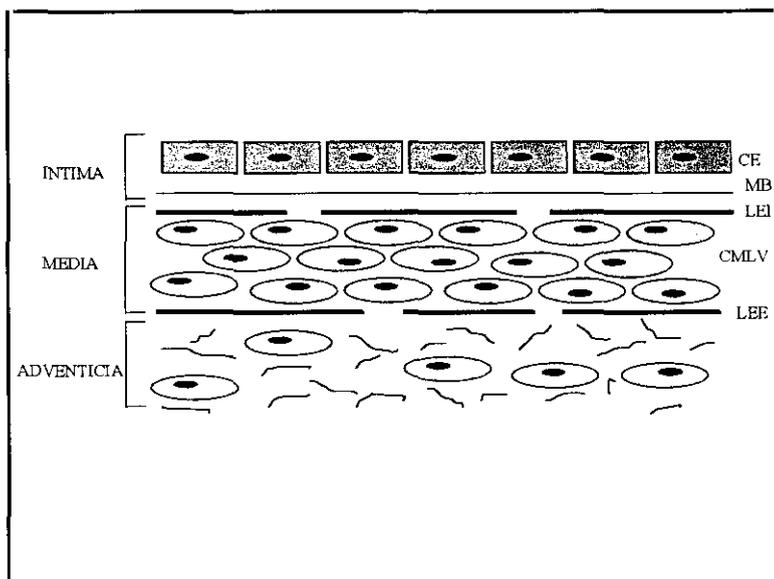
La arteria está dividida en tres capas concéntricas bien definidas morfológicamente, denominadas *íntima*, *media* y *adventicia*^(33,141) (figura 1). La *íntima*, capa más interna de la arteria y que está en contacto directo con la sangre, se encuentra delimitada por una única capa de células endoteliales (CE), localizadas en la luz arterial, y por una lámina elástica interna fenestrada que la separa de la *media*, que está constituida fundamentalmente por una matriz de tejido conectivo formado por fibras de colágeno, elastina, mucopolisacáridos y proteoglicanos. En esta capa se localizan también las células de músculo liso vascular (CMLV). Al avanzar la edad se produce un incremento tanto del número de las CMLV como de la matriz extracelular, ocasionando un engrosamiento de la *íntima*. En las CE se encuentran unas inclusiones citoplasmáticas denominadas cuerpos de Weibel-Palade, donde se localiza inmunohistoquímicamente el factor VIII o factor de von Willebrand, que es un factor específico del endotelio⁽⁹⁾.

La *media* está formada por paquetes de CMLV bien diferenciadas, separadas por membranas elásticas (láminas de elastina). Estas células de músculo liso se encuentran en un fenotipo no proliferativo, denominado contráctil, y son capaces de responder a diferentes estímulos, de modo que se contraen y relajan con el fin de mantener el tono arterial. Cada célula está rodeada por una membrana basal compuesta de colágeno tipo IV, laminina, y proteoglicanos (heparán sulfato). En las arterias elásticas, como la aorta, existe gran cantidad de tejido elástico. Existe también una matriz extracelular compuesta principalmente por láminas elásticas, colágeno tipo I y III y proteoglicanos (condroitín sulfato, dermatán sulfato). Las arterias de los mamíferos, a diferencia de otras especies como las aves, carecen de fibroblastos en la *media*. En contraste con la *íntima*, la morfología de la *media* no presenta, generalmente, alteraciones con la edad.

La *adventicia* o capa externa de la arteria está constituida principalmente por colágeno, fibroblastos, mucopolisacáridos y numerosas terminaciones nerviosas amielínicas. Está separada de la *media* por una no muy bien definida lámina elástica externa, que al igual que la lámina elástica interna presenta múltiples fenestraciones atravesadas por una red de fibras nerviosas.

La matriz extracelular es una estructura dinámica de macromoléculas unidas entre sí, y unidas a las células, mediante receptores de superficie llamados integrinas ^(51,59,61). Tanto las CE como las CMLV son responsables de la producción y deposición de la matriz extracelular vascular. Se han demostrado una variedad de efectos producidos por la matriz extracelular sobre la funcionalidad de las CE (adhesión, migración y proliferación celular) ^(16,9).

Figura 1.- Morfología de la pared arterial. Se pueden observar las tres capas arteriales: las células endoteliales (CE) forman la íntima; las células de músculo liso vascular (CMLV), separadas del endotelio por la lámina elástica interna (LEI), se encuentran principalmente en la media. La media está separada de la adventicia por la lámina elástica externa (LEE). Por debajo del endotelio se encuentra la membrana basal (MB).



2.- EL ENDOTELIO VASCULAR

El endotelio vascular humano se estima que está formado por un área mayor a 1000 m³ y unos 3 kg de peso. Fue la paradoja de la acetilcolina la que llevó al descubrimiento de las funciones endoteliales, sobrepasando la clásica que consideraba al endotelio como una mera membrana semipermeable para regular el intercambio de nutrientes y fluidos entre el plasma y la pared vascular, ya que la acetilcolina, que es un vasodilatador cuando se administra in vivo, es un vasoconstrictor cuando se administra en preparaciones in vitro de CMLV. Esta dicotomía fue resuelta por Furchgott y Zawadzki, que demostraron como la acetilcolina requería de la integridad del endotelio para producir su efecto vasodilatador mediante la estimulación de la liberación de un factor vasodilatador que llamaron EDRF (factor relajante derivado del endotelio) ⁽⁴³⁾.

Desde entonces se han realizado una gran variedad de estudios que han demostrado que la CE, además de cubrir la superficie luminal de los vasos sanguíneos, es capaz de sintetizar y liberar distintos factores implicados en la homeostasis sistémica. Y por todo ello, hoy en día se puede considerar al endotelio como el mayor órgano paracrino existente en el cuerpo humano.

La integridad del endotelio es esencial para conservar la estructura y funcionamiento normal de la pared vascular. Las CE forman un tejido metabólicamente activo, capaz de actuar como sensor y transductor de estímulos químicos, mecánicos y celulares. Entre sus principales funciones se encuentran: regulación de los lípidos plasmáticos, prevención de la adhesión de las células sanguíneas a la pared del vaso, transporte capilar de agua, solutos y macromoléculas, regulación de los procesos inmunológicos, de coagulación, e inflamación, regulación de proliferación, movilidad celular y reparación vascular, modulación del tono del músculo liso vascular, y síntesis y liberación de distintos componentes de la matriz extracelular ^(46,71,153).

La situación física del endotelio en el organismo le hace susceptible de interactuar con gran variedad de células y de agentes endo y paracrinos, para los que posee receptores específicos. Estas características confieren al endotelio un importante papel en la respuesta fisiológica del organismo ante diversos tipos de estímulos. Como consecuencia de esto, no es de extrañar que al endotelio se le haya implicado en la génesis y desarrollo de prácticamente todas las patologías de origen cardiovascular, como la hipertensión ⁽⁹⁷⁾, aterosclerosis ⁽¹⁴³⁾, vejez, isquemia y reperfusión de distintos órganos, trombosis, y en procesos neoplásicos y de diseminación de metástasis, e incluso en procesos inflamatorios.

Desde el punto de vista del tono vascular, el endotelio participa en los fenómenos de vasoconstricción y vasodilatación mediante la producción y liberación de distintas sustancias vasoactivas (**Tabla 1**). La doble capacidad del endotelio de liberar mediadores vasodilatadores y vasoconstrictores revela su complejo papel en la regulación del tono del músculo liso vascular, de la presión arterial y del flujo sanguíneo local ⁽¹¹⁹⁾.

Tabla 1.- Mediadores vasoactivos liberados por o que actúan a través del endotelio vascular.

| AGENTES VASODILATADORES | AGENTES VASOCONSTRICTORES |
|---|--|
| Producidos por el endotelio | Endotelina 1 (ET-1) |
| Adenosina (ADO) | Tromboxano A ₂ (TXA ₂) |
| Factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) | Leucotrieno C ₄ (LTC ₄) |
| Prostaciclina (PGI ₂) | Angiotensina II (Ang II) |
| Leucotrieno D ₄ (LDT ₄) | |
| Oxido nítrico (NO) | |
| Actúan a través del endotelio | |
| Trombina (THR) | |
| Histamina (HT) | |
| Acetilcolina (Ach) | |
| Bradiquinina (BK) | |

El desarrollo de la función normal y la integridad endotelial son claves para proporcionar una superficie antiagregante para las plaquetas y antiadhesiva para los leucocitos. Por otro lado, al igual que ocurre con el tono vascular, el endotelio ejerce un efecto dual en el crecimiento celular, con especial trascendencia a nivel de las células musculares, ya que es capaz de secretar tanto factores promotores como inhibidores de su crecimiento ⁽¹⁵⁷⁾ (**Tabla 2**).

Tabla 2.- Factores liberados por el endotelio con efecto estimulador del crecimiento de las células musculares.

| | |
|--|---|
| Factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) | Interleuquina-1 β (IL-1 β) |
| Factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGFb) | Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) |
| Factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-I) | Endotelina (ET-) |
| Angiotensina II (Ang II) | Factor transformante del crecimiento- β * |
| Factor activador de plaquetas (PAF) | Proteoglicanos: dermatán sulfato (DS) y condroitín sulfato (CS) |
| Trombospondina (TS) | |

* :El TGF- β es una citoquina liberada por el endotelio con efectos variables sobre el crecimiento muscular dependiendo de las condiciones experimentales usadas⁽¹⁵⁷⁾.

De entre todos los factores vasoactivos liberados por el endotelio con efecto sobre la pared vascular y sobre las células musculares, en esta tesis nos hemos centrado en el óxido nítrico (NO), por lo que pasaremos a estudiar sus características más importantes.

2.1.- EL OXIDO NITRICO

2.1.1.-Características Generales.

En 1980, Furchgott y Zawadzki descubrieron que la relajación de aorta de conejo aislada, inducida por acetilcolina, era dependiente de la integridad del endotelio estimulando la generación de un factor difusible y transferible ⁽⁴³⁾, capaz de relajar el músculo liso vascular, al que denominaron factor relajante dependiente de endotelio, EDRF. En 1984, el grupo de Ignarro sugirió que el factor relajante de endotelio podía ser el óxido nítrico o un compuesto relacionado con el nitroiol ⁽⁶²⁾. En 1988, Palmer y Moncada confirmaron que el NO era el factor relajante del endotelio ⁽¹²⁶⁾ y se establecieron sus características químicas y farmacológicas que se muestran en la **Tabla 3**.

2.1.2.- Síntesis del Oxido Nítrico.

El NO es un radical libre inorgánico en estado de gas, de fórmula $N=O$ que se genera, mediante el paso metabólico del aminoácido L-arginina a L-citrulina, mediante la oxidación del átomo de nitrógeno terminal del grupo guanidino, utilizando las enzimas NO sintasas ^(142,64). El primer paso en el metabolismo de la L-arginina es la formación de N-hidroxi-L-arginina como metabolito intermediario.

La arginina va a ser transportada a través de las membranas de la célula endotelial por el sistema y^+ , el cual es Na^+ independiente en la CE, y parcialmente dependiente de Na^+ en otras células como el neutrófilo ⁽¹⁴⁰⁾, y no sensible a pH. Análogos de la L-arginina, incluido su isómero, la D-arginina, no pueden actuar como sustrato para la síntesis de NO, e incluso la pueden inhibir, como es el caso de la N^E-monometil-L-arginina (L-NMMA)^(52,53,37) o el N^W-nitro-L-arginina metil

éster (L-NAME) ^(86,138,179).

Tabla 3.- Características químicas y farmacológicas del NO.

| |
|--|
| 1- Químicamente inestable, vida media entre 3 y 5 segundos ⁽⁹⁶⁾ |
| 2 - Naturaleza muy lipofílica. Permeable a las membranas biológicas ⁽⁶⁾ |
| 3 - Se inactiva espontáneamente ante O ₂ y anión superóxido (O ₂ ⁻) ⁽⁸⁾ . |
| 4 - Estable a pH ácido y en presencia de superóxido dismutasa (SOD) ⁽⁸⁾ . |
| 5 - Alta afinidad de unión con el grupo hemo de hemoglobina, mioglobina y guanilato ciclasa (GC) ⁽⁶⁴⁾ |
| 6 - Activa a la guanilato ciclasa (GC) por unión a su grupo hemo. Esta unión se inhibe con azul de metileno ⁽⁵⁰⁾ . |
| 7 - Por activación de la GC estimula la formación de guanosin monofosfato cíclico (GMPc) en tejido vascular, produciendo vasodilatación arterial y venosa ^(10,63) . El NO dilata todos los tipos de vasos sanguíneos, por lo que es el principal vasodilatador endógeno ^(65,103,110,132) . |
| 8 - Otras funciones fisiológicas del NO son la inhibición de: agregación plaquetaria ^(93,105) , adhesión de plaquetas a la pared vascular ⁽¹³⁴⁾ , adhesión de leucocitos al endotelio vascular ⁽⁸⁴⁾ , proliferación del músculo liso vascular ⁽⁴⁵⁾ y de la síntesis de proteínas de la matriz extracelular ⁽⁸²⁾ . |
| 9 - También se han descrito efectos del NO sobre: eritrocitos ^(15,54) , regulación de factores de crecimiento y sustancias vasoconstrictoras de origen endotelial ⁽⁸³⁾ y sobre la expresión de distintas proteínas de adhesión en el endotelio ^(162,182) . |

El NO se convierte en NO₂⁻ y NO₃⁻ en soluciones oxigenadas, por lo que la concentración final de NO₂⁻ y NO₃⁻ se considera una medida representativa de la producción de NO ^(47,101). La rápida difusión del NO entre las células es esencial para comprender su actividad biológica como mensajero intracelular y como modulador de acción local ⁽⁸⁷⁾. Los radicales libres de O₂, y en especial el anión superóxido,(O₂⁻), catabolizan el NO. La superóxido dismutasa es capaz de retrasar esta degradación, comprobándose así indirectamente el papel que cumple el anión superóxido como catabolizador del NO.

2.2.- NO SINTASAS.

El NO se produce a partir de la L-arginina por la actividad de las NO sintasas (NOS=EC 1.14.13.39) ^(81,112). En esta reacción, la L-arginina, el O₂ y el NADPH son cosustratos; FMN, FAD, hemo y tetrahidrobiopterina son cofactores y el NO y la citrulina son coproductos de la reacción catalizada por la NOS que es una dioxigenasa ^(81,102,117). Todas las isoformas descritas de la NOS contienen el grupo hemo, aunque se desconoce su función exacta en el proceso de catálisis ⁽¹⁷⁴⁾.

Hasta el momento se han identificado tres isoformas de NOS, que por el orden de su purificación y del aislamiento de su ADN se han llamado: NOS I, constitutiva de tejido neuronal (NOS_n); NOS II, inducible por citoquinas o endotoxinas en macrófagos, hepatocitos, células mesangiales y CMLV (NOS_i); y NOS III, constitutiva de células endoteliales (NOS_e). En la pared del vaso existen dos isoformas de NOS, la constitutiva, que se expresa en la CE de forma basal y la isoforma inducible, que no se expresa en condiciones fisiológicas y cuya expresión aumenta en situaciones patológicas cuando se estimulan las CMLV con citoquinas o endotoxinas, o cuando hay infiltración de leucocitos, y son estos los que la expresan ^(117,39). Las similitudes y las diferencias entre ambas isoformas de la NOS se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4.- Similitudes y diferencias entre las isoformas de NOS.

| CONSTITUTIVAS (NOS _e) | INDUCIBLE (NOS _i) |
|---|---|
| Membrana/Citosólica | Citosólica |
| Dependientes de NADPH | Dependiente de NADPH |
| Inhibibles por análogos de L-arginina | Inhibible por análogos de L-arginina y por aminoguanidina |
| Dependientes de Ca ²⁺ /Calmodulina | Independiente de Ca ²⁺ /Calmodulina |
| Liberan picomoles de NO | Libera nanomoles de NO |
| Liberación corta | Liberación prolongada |
| No se afectan por glucocorticoides | Inducción inhibible por glucocorticoides |

Las distintas localizaciones de ambas isoformas de NO se describen en la **Tabla 5**.

Tabla 5- Localización de las isoformas de NOS en el organismo

| NOS _e | NOS _i |
|---|--|
| Células endoteliales ⁽¹²⁴⁾ | Células endoteliales ⁽⁷⁸⁾ |
| Neuronas centrales ⁽⁸⁰⁾ | Hepatocitos ⁽¹¹¹⁾ |
| Neutrófilos ⁽¹⁷⁸⁾ | Células de carcinoma ⁽¹¹¹⁾ |
| Plaquetas ⁽¹³¹⁾ | Células de músculo liso vascular ⁽¹³⁾ |
| Células de la mácula densa ⁽¹³⁵⁾ | Células mesangiales ⁽⁵⁾ |
| Células de la médula adrenal ⁽¹³⁵⁾ | Macrófagos ⁽⁵⁶⁾ |
| Células β del páncreas ⁽¹¹¹⁾ | Neutrófilos inflamatorios ⁽¹⁸¹⁾ |

2.2.1. NOS constitutiva

Es la isoforma que se expresa basalmente en las células endoteliales, y cuya actividad es regulada por Ca^{2+} /calmodulina. El NO liberado por esta NOS aumenta por el rozamiento del flujo sanguíneo o por un serie de agonistas con receptores específicos en el endotelio ⁽²⁸⁾. Este NO va a dilatar todos los vasos por estimulación de la guanilato ciclasa, incrementando los niveles de GMPc en el músculo liso. La NOS_e va a estar mayoritariamente asociada a la membrana, debido a la miristolización de un residuo de glicina situado en el extremo N-terminal ^(12,81).

Esta isoforma, que en un primer momento se pensó que era constitutiva, después se vió que se podía estimular su expresión mediante hipoxia ⁽⁸⁹⁾, el ejercicio crónico ⁽¹⁵⁵⁾, el estado de crecimiento ^(2,92), el estrés de rozamiento ⁽¹³⁷⁾ y el factor transformante del crecimiento-β (TGF-β) ⁽⁶⁸⁾. Por otra parte, las citoquinas, y en particular el TNF-α ⁽¹⁸⁰⁾, sólo o en combinación con IL-1β o interferón γ (IFN-γ) ⁽⁴⁰⁾, disminuyen la expresión de la NOS_e mediante la desestabilización del ARNm ⁽¹⁾. Experimentos realizados recientemente en nuestro laboratorio han demostrado que en la desestabilización intervienen proteínas citosólicas que se van a unir a la región 3' del ARNm de la NOS_e disminuyendo su vida media ⁽¹⁾.

2.2.2. NOS inducible

Como se ha comentado antes, la expresión de esta enzima se induce con endotoxina bacteriana y/o citoquinas ^(52,104,111,151) mediante la síntesis *de novo* del enzima, puesto que la cicloheximida es capaz de prevenir su inducción ⁽⁷⁷⁾. Está regulada principalmente a nivel transcripcional, y una vez expresada va a generar NO durante largos períodos de tiempo ⁽¹¹⁷⁾. Un inhibidor selectivo de su actividad enzimática es la aminoguanidina ^(25,48).

La NOSi es una enzima cuya expresión está muy regulada. Se han descrito numerosos factores de crecimiento y factores vasoactivos que están implicados en la regulación de su expresión. Entre los factores que incrementan la expresión de la NOSi estimulada por citoquinas y/o lipopolisacárido (LPS), se encuentran el factor activador de plaquetas ⁽¹⁶⁰⁾, el factor de crecimiento de fibroblastos ⁽¹⁵⁴⁾, el factor de crecimiento epidérmico ⁽¹⁵⁴⁾, la epinefrina ⁽⁶⁷⁾ y la plasmina ⁽³¹⁾, y los mediadores que estimulan la producción de AMP cíclico.

En sentido contrario, entre los factores que disminuyen la expresión de la NOSi inducida por citoquinas y/o LPS se encuentran la endotelina-1 ^(5,66), trombina ⁽¹⁵²⁾, el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)^(30,154), el TGF- β ^(27,128,166), y la angiotensina II^(18,115). La dexametasona es un glucocorticoide capaz de inhibir la expresión de la NOSi ^(125,133).

El propio NO puede regular la expresión y actividad de la NOSi. En CMLV y en células mesangiales el NO actúa como un mediador que amplifica la expresión de la NOSi ⁽¹¹⁴⁾, pero con un efecto opuesto en la actividad enzimática. Sin embargo, el NO inhibe la actividad de NOSi en macrófagos ⁽⁴⁹⁾ y su expresión en CE ⁽¹¹⁾. Cuando esta actividad se induce en macrófagos, la gran cantidad de NO sintetizado es la principal arma citotóxica y citostática de estas células sobre parásitos y células tumorales ^(56,116).

Finalmente, la NOSi juega un papel fundamental en el shock séptico ^(79,129), caracterizado por una vasodilatación arteriolar periférica, hipotensión y daño microvascular, que producen una disfunción multiorgánica con una mortalidad superior al 50% de los casos. Las endotoxinas

bacterianas (lipopolisacárido) son responsables de estos síntomas. Busse et al han demostrado que en la sepsis, endotoxinas solas o en combinación con citoquinas inducen la expresión de NOSi en la pared vascular, principalmente en el músculo liso vascular, de esta manera, los niveles elevados de NO activarían la guanilato ciclasa de manera autocrina, produciendo vasodilatación periférica y otros síntomas del shock séptico.

3.-CONCEPTO DE ATEROSCLEROSIS.

La arteriosclerosis se denomina a la afección del árbol vascular caracterizada por el aumento difuso del grosor de las capas íntima y media de las arterias, con pérdida de elasticidad de las mismas. En algunas formas de arteriosclerosis, este proceso tiene lugar de una forma más notable y se caracteriza por una lesión típica que se denomina placa de ateroma. La aterosclerosis se podría definir como un proceso de origen multifactorial, evolución lenta y progresiva, que cursa con la formación de engrosamientos focales de la íntima arterial, compuestos principalmente por lípidos, carbohidratos complejos, células y tejido fibroso, originando la placa de ateroma. Estos engrosamientos resultarían de una respuesta inflamatoria y fibroproliferativa exagerada frente a distintos tipos de agresión al endotelio y a las células del músculo liso de la pared vascular.

Las células que componen las lesiones ateromatosas son macrófagos, CMLV y linfocitos T. Por otra parte, los neutrófilos, aunque son capaces de destruir tejidos por secretar enzimas proteolíticas ⁽¹⁷³⁾, raramente se encuentran en placas intactas ⁽⁷⁵⁾. Ocasionalmente se les puede encontrar en placas fisuradas, pero probablemente como consecuencia de una infiltración desde el torrente sanguíneo y posiblemente juegen un papel importante en la fisura de esta placa a través de la liberación de proteasas ⁽¹⁶⁴⁾.

3.1- PATOGENIA DE LA ARTEROSCLEROSIS

Desde el siglo pasado se han postulado distintas hipótesis sobre el origen de la aterosclerosis. La hipótesis incrustativa, de von Rokitansky ⁽¹⁶⁸⁾, proponía que el engrosamiento intimal era el resultado de depósitos de fibrina y otras sustancias sanguíneas que conducían a una organización de los fibroblastos y a una deposición lipídica secundaria ⁽²⁹⁾.

Por otro lado, la hipótesis lipídica, propuesta por Virchow, consideraba que la hiperplasia intimal observada era debida a un desbalance entre los mecanismos de deposición lipídica y aquellos que producían una eliminación de los mismos ⁽¹⁶⁵⁾.

Actualmente, la hipótesis más aceptada es la formulada por Russel Ross ⁽¹⁴³⁾, que se conoce como la hipótesis de la respuesta frente a la agresión, y en donde se propone que diversos factores de distinta naturaleza, (mecánicos, químicos, biológicos, tóxicos, inmunológicos, etc), pueden ser capaces de provocar una lesión en el endotelio vascular. Esta lesión, no tiene por qué ser orgánica, ni producir una denudación o rotura de la capa endotelial, sino que basta con que sea funcional (disfunción endotelial), para que se genere una respuesta especializada en la que se ven implicados tanto monocitos como linfocitos T. El daño continuado sobre el endotelio conduce a que se prolongue la respuesta reparadora, lo que origina un proceso inflamatorio crónico que contribuye a la formación de la placa de ateroma.

De acuerdo con la clasificación de Fuster ⁽⁷³⁾, el daño arterial se puede clasificar en tres tipos de lesiones: la lesión tipo I, donde hay daño funcional pero no morfológico; la lesión tipo II, donde existe una denudación endotelial con daño de la íntima, aunque sin afectar la lámina elástica interna, y la lesión tipo III, donde se afectaría la íntima y la capa media.

3.2.-¿COMO SE INICIA LA DISFUNCION ENDOTELIAL EN LA ARTEROSCLEROSIS?

No se conocen todavía los factores que desencadenan el daño endotelial, aunque se piensa que los factores de riesgo coronario son los principales candidatos: las dislipemias, la hipertensión, el tabaco y la diabetes. Además, y en determinadas circunstancias, las infecciones virales, el daño inmune o los niveles elevados de homocisteína también contribuyen al daño endotelial ⁽¹⁷⁷⁾ .

La lesión aterosclerótica se va a caracterizar por su topografía focal, ya que existen determinadas zonas propensas a que se desarrolle la lesión como las ramificaciones y las curvaturas del árbol vascular, en las que va a existir turbulencias de flujo sanguíneo ⁽³⁾, y una menor fuerza de cizalla sobre la pared del vaso. Como consecuencia de esta situación, las CE no van a estar alineadas como en el resto del vaso, sino dispuestas sin una orientación definida, y existiendo además un aumento de recambio celular y una disminución de las uniones intercelulares, lo que conduce a un aumento de la permeabilidad al paso de sustancias desde la sangre al interior de la pared vascular.

Habitualmente las lipoproteínas de baja densidad (LDL) entran a través de las uniones intercelulares de la pared arterial y se acumulan en el subespacio endotelial en cantidades reguladas por el endotelio y probablemente por la lámina elástica interna ⁽¹²⁷⁾. Una elevación de los niveles plasmáticos de LDL conduciría a su acumulación en determinados lugares favorecida además por factores hemodinámicos y mecánicos antes mencionados.

Debido a la tendencia de las LDL a unirse a proteoglicanos de la matriz extracelular, el tiempo de permanencia de estas moléculas en el espacio subendotelial sería mayor ⁽¹⁶¹⁾, y aumentaría la probabilidad de una oxidación oportunista, quizás por una producción de radicales libres del endotelio adyacente o por CMLV o macrófagos aislados ⁽¹¹³⁾ produciéndose las LDL oxidadas (LDLox), que pueden dañar o activar el endotelio ⁽¹³⁶⁾, incrementando el recambio de estas células y permitiendo la entrada de más macromoléculas plasmáticas. Estas lipoproteínas estimulan la expresión de moléculas de adhesión ⁽¹⁶³⁾ y la secreción de factores quimiotácticos,

como la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1), por las CE y las CMLV ⁽²⁶⁾, incrementando la adhesión y la migración de monocitos y linfocitos circulantes, además de fomentar la migración de CMLV a la íntima ⁽¹⁹⁾.

4.- LAS PLAQUETAS

Aunque impropriamente se las llama células, las plaquetas son en realidad fragmentos nucleares derivados de los megacariocitos de la médula ósea. Las plaquetas circulan durante aproximadamente 10 días con una concentración de 150000-440000 / μ l.

La principal función de las plaquetas es la interrupción de la hemorragia ⁽¹⁵⁸⁾. La hemostasia, que es como se conoce a este proceso, se consigue mediante la interacción de al menos tres sistemas biológicos: los componentes de la pared, las proteínas implicadas en la cascada de la coagulación sanguínea y las propias plaquetas. Sin embargo, siempre que se interrumpe la continuidad del vaso sanguíneo, como es el caso de la angioplastia, la respuesta al daño implica la participación de plaquetas y de la matriz subendotelial, aunque no de proteínas de la coagulación ^(146,147), por lo que nos vamos a centrar en estos dos sistemas.

El factor de von Willebrand (vWF), tanto el situado en la matriz extracelular como el plasmático, además del liberado por las plaquetas y del de las CE adyacentes a la lesión, se expresa en el lugar de la lesión, lo que produce una mayor adherencia de las plaquetas al interactuar con un complejo formado por la glicoproteína GP Ib-IX-V que se expresa en la superficie plaquetaria ^(145,57). La interacción vWF-GP Ib-IX-V ocurre en presencia del antibiótico ristocetina, postulándose la existencia de un análogo endógeno de este antibiótico. Para que ocurra la adhesión plaquetaria en un lecho arterial es imprescindible la formación de este complejo. Sin embargo, la adhesión de las plaquetas al vaso dañado también requiere la activación de una segunda glicoproteína, el complejo del receptor GP IIb/IIIa que se expresa en la superficie de las plaquetas activadas ⁽¹³⁰⁾. La GP IIb/IIIa está implicada no solamente en el proceso de adhesión de la plaqueta a la pared del vaso, sino también en el de agregación plaquetaria, que es

la interacción plaqueta-plaqueta. Aunque no se conoce del todo el mecanismo bioquímico exacto ⁽⁴³⁾, parece ser que diferentes activadores plaquetarios inducen la exposición del GP IIb/IIIa en la superficie plaquetaria, y mediante el fibrinógeno que actuaría como puente de unión entre dos GP IIb/IIIa de diferentes plaquetas, ocurriría el fenómeno de agregación plaquetaria. Finalmente se produce la oclusión completa del vaso formándose un coágulo hemostático impermeable.

El colágeno y la trombina son los principales inductores de la agregación plaquetaria, y el agonista liberado por las plaquetas más importante va a ser el adenosin-difosfato (ADP) ⁽⁶⁰⁾. Los componentes del liberado plaquetario se originan en unos gránulos intracelulares específicos que se denominan los gránulos densos. Además de los gránulos densos, existen otros gránulos plaquetarios que son los lisosomales o los gránulos alfa. Entre los componentes liberados por los gránulos densos vamos a tener ADP y Ca^{2+} . En los gránulos alfa se almacenan proteínas adhesivas como el fibrinógeno, la fibronectina, el vWF, la trombospondina y la vitronectina se almacenan en los gránulos alfa, al igual que diferentes proteínas promotoras del crecimiento como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) o el factor transformante del crecimiento β (TGF- β) y el factor plaquetario 4 (PF-4) ^(121,183).

En los gránulos alfa también se van a almacenar factores de la coagulación como los factores V y XI, la proteína S, el cininógeno de bajo peso molecular, el factor inhibidor del plasminógeno (PAI-1), etc. Las cantidades de agonista necesarios para la liberación del contenido de los gránulos alfa es más pequeña que la necesaria para liberar a los componentes de los cuerpos densos ⁽⁵⁸⁾.

4.1.- GLICOPROTEINA PLAQUETARIA IIb/IIIa.

Como hemos visto, la función plaquetaria depende de las interacciones de adhesión, y la mayoría de las glicoproteínas de superficie de la membrana plaquetaria son receptores para proteínas adhesivas. De estas, la familia más abundante es la de las integrinas, cuyo principal componente es la glicoproteína IIb/IIIa (GP IIb/IIIa) (Figura 2).

La superficie de las plaquetas en reposo contiene aproximadamente 80000 complejos GP IIb/IIIa, también hay complejos en las membranas de los gránulos plaquetarios α y en el sistema canalicular abierto que se extiende hasta la membrana plasmática plaquetaria. Esta distribución sugiere que complejos GP IIb/IIIa adicionales van a aparecer en la superficie de las plaquetas después de la exposición a un activador, lo que va a ser importante en la evolución del trombo.

El complejo está compuesto por una molécula de GP IIb (compuesta por una cadena pesada y una ligera unidas por puentes disulfuro), y una de GPIIIa (cadena polipeptídica simple). Ambas subunidades son producto de genes separados, y el complejo es un heterodímero dependiente de Ca^{2+} , que se asocia de forma no covalente a la membrana de la plaqueta ⁽¹³⁰⁾. Se necesita el calcio para mantener el complejo y para que pueda unirse a sus ligandos proteicos (23,32)

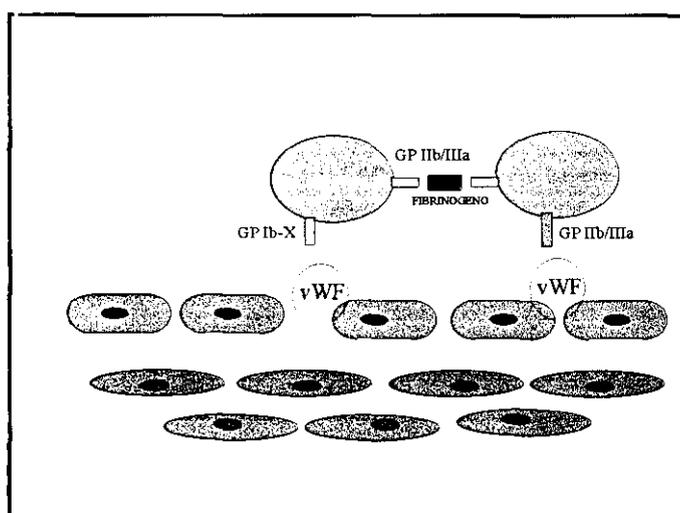


Figura 2 .- Interacciones de la plaqueta. En la figura se representa la interacción de la plaqueta con la pared vascular a través de la GP Ib y de la GP IIb/IIIa con el vWF expresado en la pared vascular, y de la interacción plaqueta-plaqueta que sería a través de la GP IIb/IIIa, por puentes con el fibrinógeno.

El complejo GP IIb/IIIa funciona como receptor sólo después de la activación de la plaqueta, y es un receptor para fibrinógeno, fibronectina, vWF, vitronectina y trombospondina. La trombospondina no se une directamente al GP IIb/IIIa, y probablemente actúe como reforzadora de la inducción de la estabilidad del trombo plaquetario ya formado. Esta acción podría estar relacionada con la capacidad de la trombospondina de unir el fibrinógeno.

Las secuencias de reconocimiento del receptor están limitadas a pequeñas secuencias de aminoácidos : Arg-Gly-Asp, (RGD), en las proteínas adherentes.

El fibrinógeno va a ser con gran diferencia el ligando más importante debido a que tiene una reacción cruzada crítica con GP IIb/IIIa, que favorece la cohesión, y por su abundancia en el plasma. El fibrinógeno es un ligando dimérico formado por tres pares de cadenas polipeptídicas: alfa, beta y gamma. Además, contiene dos secuencias RGD en su cadena alfa, una cerca del carboxi terminal y una segunda cerca del amino terminal⁽⁴¹⁾; y una secuencia de doce aminoácidos localizada en el carboxi terminal de la cadena gamma de la molécula⁽³⁸⁾. Este dodecapéptido de la cadena gamma es específico del fibrinógeno y aunque no contiene la secuencia RGD, sí compete con los péptidos que la contienen para unirse al GP IIb/IIIa⁽¹²³⁾. El resto de los ligandos de la GP IIb/IIIa contienen al menos una secuencia RGD.

Por lo que comentamos antes, la ausencia de la adhesión plaquetas-fibrinógeno inducida por el receptor de la GP IIb/IIIa en la superficie de las plaquetas activadas presenta una posible aplicación terapéutica para el estado protrombótico, y reducir de esta forma las complicaciones isquémicas en intervenciones como la angioplastia o la aterectomía. Así, Collier et al desarrollaron un anticuerpo monoclonal 7E3 que podría bloquear el receptor GP IIb/IIIa e inhibir la reactividad plaquetaria *ex vivo* ⁽²³⁾. Posteriormente se desarrolló una variante quimérica del fragmento Fab de 7E3 para humanos, que a una dosis de 0,25 mg/kg de peso bloquea el 80% de los receptores GP IIb/IIIa y elimina virtualmente la agregación plaquetaria. Los ensayos realizados a partir de esta quimera permitieron verificar que las plaquetas que se acumulan en la pared del vaso son la principal causa de la reestenosis.

5.-¿QUE ES LA ANGIOPLASTIA?

Como dijimos antes una de las principales aproximaciones quirúrgicas para el tratamiento de la estenosis arterial en la aterosclerosis es la angioplastia. Este procedimiento consiste en la dilatación de una o varias lesiones que estrechan u obstruyen una o varias arterias, generalmente coronarias, para permitir que se restablezca un adecuado flujo de sangre oxigenada. De esta forma, la dilatación coronaria se llama en terminos técnicos ACTP, cuyas iniciales significan: *Angioplastia*, que es el nombre del procedimiento en sí; *Coronaria*, pues el tratamiento suele realizarse en las arterias coronarias; *Transluminal*, pues la intervención se realiza desde el interior de la luz por donde fluye la sangre de la arteria enferma, y *Percutánea*, ya que el procedimiento se realiza a través de una punción de la piel de la ingle o del brazo.

La angioplastia utiliza un catéter con un pequeño balón en su punta. Cuando se infla el balón dentro de la arteria, sobre la lesión que estrecha la misma, la presión ejercida comprime y rasga el depósito de materia grasa o placa de ateroma por el punto menos resistente de ésta, provocando una ruptura de la capa íntima de la arteria con la subsecuente disección hasta la capa media arterial, y reorganización de los productos ateromatosos y trombóticos, resultando un aumento de la luz arterial, y por tanto una reducción o completa desaparición de la estenosis arterial.

Sin embargo en las placas muy excéntricas y con alto contenido de calcio, la angioplastia puede distender solamente la semicircunferencia arterial sana, sin llegar a romper la placa, y el beneficio inicial puede perderse rápidamente cuando la arteria vuelva a adquirir el tono inicial por el retroceso elástico ⁽⁶⁹⁾.

Así pues, la angioplastia produce dos tipos de traumatismos diferentes: 1) tisular, con disrupción endotelial y exposición de la capa media a la sangre circulante; 2) mecánica, por distensión y deformación arterial.

Además del catéter con balón, existen otros dispositivos para revertir la oclusión arterial, tales como el Stent o soporte metálico intracoronario, y el aterotomo o dispositivo que elimina la placa de ateroma mediante el corte y la extracción o la abrasión de la misma. La decisión de utilizar un balón de dilatación o cualquiera de los dispositivos descritos depende del criterio del médico. En la actualidad este tipo de procedimientos se logra realizar con éxito inicial en un 90% de los casos, sin embargo un 40% de las angioplastias realizadas con éxito vuelven a estrecharse al cabo de un año, dando lugar a la reestenosis postangioplastia.

6.- FISIOPATOLOGÍA DE LA REESTENOSIS.

La respuesta a la angioplastia arterial consiste en una sucesión de eventos muy ordenados en el tiempo: en un primer momento vamos a tener un proceso trombótico-inflamatorio, mientras que posteriormente tendremos un proceso sintético, a continuación pasaremos a repasar brevemente ambos procesos.

6.1.- REESTENOSIS TEMPRANA: ACTIVACION PLAQUETARIA.

La dilatación de las arterias carótidas normales con un balón inflado a 6-8 atmósferas produce, en el 75% de los casos, una lesión arterial profunda con la consiguiente exposición de las estructuras de la capa media, CMLV y proteínas de la matriz extracelular, a la sangre circulante. A los 45 minutos, existe una importante deposición de plaquetas y fibrinógeno, provocando una trombosis mural que puede incluso evolucionar a una oclusión arterial aguda. La trombosis mural está determinada por el sustrato arterial y el flujo. Además del contacto de la sangre con los colágenos tipos I y III, que son muy trombogénicos, se libera tromboplastina tisular. Ambos factores inician la coagulación, se produce trombina y también se expresa el factor tisular formándose un trombo local. En aquellos casos en que el resultado de la angioplastia no es óptimo, o bien se asocia un cierto grado de espasmo coronario, el diámetro arterial está reducido y aumentan las fuerzas de cizallamiento. Los hematíes empujan a las plaquetas hacia la

periferia y determinan que el número de éstas que se adhieren sea mayor cuanto menor es el diámetro de dilatación conseguido en la angioplastia ^(4,159,55).

El resultado final será que a las 24 horas del procedimiento se observa un gran número de plaquetas adheridas en la zona de daño arterial profundo, y al mismo tiempo, hay evidencia de necrosis de algunas CMLV de la capa media. La cantidad de plaquetas va disminuyendo con los días a medida que avanza el proceso de reendotelización.

Sin embargo, en los casos con daño arterial profundo se observan trombos murales con distintos grados de organización que se incorporan a la pared arterial y provocan distintos grados de reestenosis. En este sentido es importante señalar la implicación de las plaquetas en el proceso de proliferación y migración de las CMLV desde la capa media hasta la íntima. Como ya hemos señalado anteriormente, los gránulos alfa de las plaquetas son ricos en factores de crecimiento como el PDGF y el TGF- β por lo que la activación de las plaquetas no solamente va a jugar un papel crítico en la oclusión aguda por trombo, sino también en los procesos sintéticos posteriores. Como también se ha indicado, en estos primeros momentos tras el daño por balón se va a inducir una respuesta inflamatoria en la que los linfocitos T y los leucocitos van a tener un papel fundamental. Estos tipos celulares van a liberar diferentes citoquinas que van a su vez a inducir la expresión de proteínas de adhesión en la pared vascular facilitando la integración de elementos formes de la sangre dentro de la estructura de la pared. Por otro lado, la activación de los leucocitos va a hacer que estas células liberen radicales libres y proteasas que amplifican el daño sobre la pared del vaso.

Las plaquetas activadas van también a modular la capacidad de los leucocitos de liberar citoquinas. En este sentido, se ha demostrado recientemente como las plaquetas activadas potencian la liberación de interleucina 1 β e interleucina 8 por los leucocitos a través de la interacción de estas células con la P-selectina expresada en la superficie plaquetaria.

En resumen, la secuencia de eventos que llevan a la reestenosis requieren un daño arterial sustancial, el depósito de plaquetas y trombosis mural, y la organización de este trombo en la pared arterial. Esto provoca la proliferación y migración de CMLV de la capa media hacia la íntima.

6.2.- REESTENOSIS TARDIA: PROLIFERACION DE LAS CELULAS MUSCULARES LISAS

En el modelo de rata, que es el mejor modelo experimental para estudiar la formación neointimal, y sigue algunas características similares al modelo del stent, la respuesta de las CMLV ante la agresión por balón es la proliferación y la síntesis de proteínas de la matriz y posterior migración de estas células a la íntima culminando en la formación de la neointima ⁽²²⁾.

En el modelo utilizado en esta tesis de carótida de rata la respuesta de las CMLV frente a la agresión sigue un proceso que se puede dividir en varias fases. La primera fase es la “explosión” de la proliferación celular, que alcanza su punto máximo pocos días después de la agresión y subsiste durante los 10 días siguientes, con la repoblación de la media hasta alcanzar el nivel anterior a la lesión. Esta respuesta proliferativa se debe a la entrada en el ciclo celular del 9-16 % de las CMLV que forman la media ⁽¹³⁰⁾.

La segunda fase se debe a la migración de las CMLV a través de la lámina elástica interna para formar la neointima. Las CMLV se observan en la cara luminal de la lámina elástica interna ya desde los 4 días después de realizada la lesión, y estas células forman un pseudoendotelio. Se desconoce la duración exacta de la migración, aunque parece que la migración es completa a las dos semanas.

La trombosis mural puede ser un factor importante en la segunda oleada. La eliminación de las plaquetas circulantes, utilizando anticuerpos antiplaquetas, previene la aparición de CMLV en la cara luminal de la lámina elástica interna a los 4 días de la angioplastia, y reduce el tamaño

de la lesión de la íntima a los 7 días ⁽³⁶⁾. Un resultado similar se obtuvo al disminuir la liberación de PDGF, mediante el empleo de anticuerpos de GP IIb/IIIa ⁽³⁶⁾. La migración de CMLV hacia la íntima disminuye a los 4 días ⁽⁷⁰⁾, y también parece que se reduce la lesión de la íntima ⁽³⁵⁾. Sin embargo, este tratamiento no tiene efecto sobre la replicación celular del músculo liso.

La tercera fase se refiere a la proliferación sostenida de las CMLV de la íntima, que contribuyen al crecimiento rápido de la lesión durante las 4 primeras semanas después de realizada la denudación.

Cuando se vuelve a estimular la neointima, puede considerarse que se produce una “cuarta fase” potencial. Por otro lado, la cuarta fase representa una respuesta proliferativa en la íntima existente, y en consecuencia, es posible que sea más parecida a la respuesta proliferativa de la íntima arterial humana como respuesta a la agresión.

Por último, los cambios totales que afectan a la masa dependen también de la síntesis de proteínas de la matriz celular. En las arterias de rata lesionadas, aproximadamente el 80 % de la íntima está constituida por colágeno tipo I, elastina, osteopontina y proteoglicanos ⁽⁹⁹⁾. Realmente hoy está en discusión si lo que existe es una activación de la síntesis de estas proteínas o una disminución de su degradación por parte de las metaloproteinasas, ocurriendo en cualquier caso que el contenido neto de las proteínas de matriz extracelular en la pared del vaso aumente.

7.- FACTORES QUE DETERMINAN Y REGULAN LA PROLIFERACION DE LAS CELULAS MUSCULARES LISAS

Se ha demostrado que tanto el endotelio como las CMLV de la arteria adulta normal secretan unos factores inhibidores del crecimiento que son parecidos a heparinoides y que mantienen las células en un estado de reposo ^(14,139).

Este estado de reposo se alteraría con el trauma producido por la angioplastia, que provoca la proliferación de las CMLV de la capa media arterial y su migración a la íntima. Ambos procesos son estimulados y regulados por un complejo sistema de factores de crecimiento, secretados por las diversas células que intervienen en el proceso reparador. El más importante es el PDGF. Además existen otros factores de crecimiento semejantes al factor plaquetario (PDGF-like) que son secretados por las CE, sobre todo las lesionadas, los monocitos, los macrófagos e incluso por las mismas CMLV. Otros factores de crecimiento son la interleucina-1 y la interleucina-6, el factor de crecimiento epidérmico, el factor de crecimiento de fibroblastos y el similar a la insulina. Todos estos factores inducen la proliferación de CMLV, aunque el PDGF es en el momento actual el único conocido con propiedades quimiotácticas y que estimula la migración de las CMLV desde la capa media a la íntima ^(144,156).

La importancia de cada uno de los factores de crecimiento y su interrelación están aún por determinar. Recientemente se ha descrito la falta de proliferación de las CMLV después de realizarse la angioplastia en el modelo de rata, mediante la administración de anticuerpos monoclonales contra el factor de crecimiento fibroblástico ⁽⁹¹⁾. Ferns y cols., utilizando un anticuerpo policlonal anti-PDGF, han inhibido el desarrollo de lesiones intimaes inducidas por la desendotelización producida por un balón en la arteria carótida de ratas atímicas (ratas incapacitadas para desarrollar una respuesta inmune) ⁽¹⁵²⁾. Asimismo se ha descrito que el PDGF necesita de la presencia de otros factores de crecimiento, como el IGF-1, para poder inducir satisfactoriamente la síntesis de DNA y la división celular ⁽¹⁷⁾. Si se confirman estos hallazgos iniciales en otras especies, podría decirse que algunos factores de crecimiento actúan como reguladores autocrinos de la respuesta de la pared arterial.

Los factores mitogénicos consiguen no sólo la duplicación y migración de las CMLV, sino que además son capaces de cambiar el fenotipo de las mismas, de contráctiles al fenotipo sintético, con grandes cantidades de retículo endoplásmico, ribosomas y mitocondrias en el citoplasma. En este estado se secretan cantidades elevadas de proteínas glicosiladas, produciendo, una vez que están en la íntima, el estroma conectivo, que forma la mayor parte de la hiperplasia intimal.

Algunas de las células que migran no se dividen pero pueden hipertrofiarse en respuesta a hormonas vasoconstrictoras como la angiotensina II ⁽⁷⁾. Otras proteínas plasmáticas también pueden regular la proliferación de las CMLV. Por ejemplo, el número de moléculas de trombina que quedan adheridas a las plaquetas después del daño vascular, y que son inaccesibles a los complejos de heparina-antitrombina III circulantes, se correlacionan con la cantidad de factores de crecimiento secretados por las plaquetas. A su vez, la trombina puede también inducir hipertrofia de las CMLV ⁽²⁰⁾, estimular la liberación de factores de crecimiento por las propias CMLV y provocar la proliferación de estas células ⁽¹⁷⁵⁾. En este sentido, Sarembock y cols en un modelo en conejo que desarrolla aterosclerosis mediante la alimentación con dieta hipercolesterolemia, han descrito un efecto beneficioso de la hirudina (que es un inhibidor del receptor de la trombina) en la disminución de la reestenosis en comparación con la heparina ⁽¹⁴⁸⁾.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis fue estudiar la importancia del endotelio en la regulación de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en las células de músculo liso de la pared vascular, y en concreto en una situación en la que se induce denudación endotelial como es la angioplastia por balón.

OBJETIVOS

- 1.-** Analizar el papel del endotelio en la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en la pared vascular y en células de músculo liso vascular en cultivo.

- 2.-** Estudiar la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en un modelo de denudación endotelial in vivo realizado en carótida de rata.

- 3.-** Analizar el papel de las plaquetas en la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en la pared vascular tras la denudación endotelial.

- 4.-** Analizar la importancia de la glicoproteína IIb/IIIa y del factor de crecimiento derivado de las plaquetas en la modulación de las plaquetas sobre la expresión de la óxido nítrico sintasa induble en la pared vascular desendotelizada.

MATERIALES Y METODOS

Los experimentos de esta tesis se realizaron en dos niveles de complejidad:

a) Experimentos realizados *in vitro*:

- Segmentos arteriales aislados.
- Células endoteliales (CE) y células de músculo liso vascular (CMLV) en monocultivo y en cocultivo

b) Experimentos realizados *in vivo*:

- Denudación endotelial de la carótida derecha.

1.- OBTENCION DE LA AORTA TORACICA.

Para obtener la aorta torácica se emplearon ratas Wistar macho de 300 ± 50 gramos (6 meses de edad). La manipulación de los animales se realizó siguiendo las normas aprobadas por el Comité de Investigación Animal de la Fundación Jiménez Díaz. Después de anestesiar a las ratas con pentobarbital sódico (200 mg/kg), los animales fueron exanguinados, lavándose la sangre remanente mediante perfusión con 200 ml de salino isotónico a una presión de 100 mmHg. Se eliminó la porción aórtica comprendida desde la arteria renal izquierda hasta la bifurcación iliaca, conservando el resto de la aorta hasta el cayado. La aorta aislada se limpió cuidadosamente de tejido conectivo y grasa adyacente.

Cuando fue necesario eliminar el endotelio de los segmentos aórticos, la desendotelización se realizó *in vitro* de manera mecánica mediante un suave raspado. La desendotelización de los segmentos se comprobó mediante tinción con hematoxilina-eosina.

Las aortas con o sin endotelio se cortaron en segmentos, de aproximadamente 1 cm, y se preincubaron durante una hora en medio RPMI-1640 sin rojo fenol, suplementado con 10% de suero de ternera fetal (FCS), 5 mmol/L de glutamina, 2×10^{-5} U/L de penicilina y 2×10^{-5} µg/L de

estreptomina. Se realizó una primera incubación de 1 hora para equilibrar los vasos del posible estrés de aislamiento, reemplazándose este medio por otro medio fresco con la misma suplementación.

Los segmentos aórticos se incubaron durante 18 horas en una incubadora humificada a 37° y con 95 % O₂ y 5% CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación se recogieron los medios de cultivo para la posterior determinación de niveles de nitritos, congelándose los segmentos aórticos inmediatamente en nitrógeno líquido para la cuantificación de la expresión de la NOSi.

2.-. OBTENCION Y CULTIVO DE CELULAS ENDOTELIALES.

Las CE se aislaron de aorta bovina según el método de Jaffe y cols⁽⁷²⁾. La aorta se limpió de tejido conectivo y se ligaron las arterias intercostales. La superficie de la luz del vaso se lavó con tampón PBS (2,6 mmol/L KCl; 1,5 mmol/L KH₂PO₄; 137 mmol/L NaCl; 8 mmol/L NaH₂PO₄; 5,5 mmol/L glucosa; pH 7,4), con el fin de eliminar las células de la sangre adheridas. Posteriormente se cerró un extremo del segmento arterial, mediante clampaje, y el vaso se rellenó con una solución que contenía colagenasa Tipo II (Sigma) en concentración 500 mg/L. Tras cerrar el extremo opuesto, la arteria se incubó a 37° C durante 30 min. Transcurrido ese tiempo, la reacción de la colagenasa se paró con medio RPMI-1640 que contenía 10% de FCS y suplementado con 5 mmol/L de glutamina, 2x10⁻⁵ U/L de penicilina y 2x10⁻⁵ µg/L de estreptomina, centrifugándose a 1800 rpm durante 10 minutos para la obtención de las CE. El precipitado que contenía las CE se sembró en placas de cultivo, manteniéndose en una incubadora humificada a 37°C y con 95% O₂ y 5% CO₂, cambiándose el medio de cultivo cada tres días. La identificación de las células se realizó microscópicamente mediante su apariencia pavimentosa y bioquímicamente mediante la detección de Factor VIII.

Para los distintos experimentos, las CE se utilizaron entre el 1° y 3° pase (realizados mediante tripsinización de las células obtenidas en el cultivo primario, con tripsina/EDTA) y en estado de confluencia completa en monocapa. Los experimentos se realizaron en células crecidas en cajas de 6 y 24 pocillos.

3.-. OBTENCION Y CULTIVO DE CELULAS DE MUSCULO LISO VASCULAR.

Las CMLV se obtuvieron de aortas bovinas de las que previamente se había eliminado el endotelio. La capa de tejido medio se cortó en pequeños segmentos y estos se transfirieron a cajas de cultivo que contenían colagenasa Tipo 2 (Worthington, USA) en concentración 3000 mg/L. Los segmentos se incubaron a 37 °C durante 4 horas. Transcurrido el tiempo de incubación, la solución de colagenasa se lavó con medio MEM suplementado con 10% de FCS que contenía 2×10^{-5} U/L de penicilina y 2×10^{-5} µg/L de estreptomina.

Las células en cultivo se mantuvieron en las mismas condiciones que las CE (incubadora humificada a 37°C y con 95% O₂ y 5% CO₂), cambiándose el medio de cultivo cada 4 días.

Mediante microscopía óptica se observó que las células mostraron la típica morfología de "colina y valle" y reaccionaron de manera positiva al anticuerpo monoclonal anti- α -actina (Boehringer Mannheim).

Una vez que las CMLV migraron de los explantes y crecieron hasta la confluencia se tripsinizaron con tripsinia/EDTA. Al igual que las CE, las CMLV se usaron entre 1° y 3° pase. Para realizar los experimentos de monocultivo las CMLV se transfirieron mediante tripsinización a cajas de 6 ó 24 pocillos. Para realizar el cocultivo las CMLV se sembraron en filtros para cajas de 6 ó 24 pocillos (membranas microporosas de 0.4 µm de poro, Millipore). Entre 3 ó 4 horas antes de sembrar las CMLV en los filtros, estos se cubrieron con colágeno Tipo I (Sigma) en concentración de 3 gr/L.

4.- COINCUBACION DE CELULAS ENDOTELIALES Y DE MUSCULO LISO VASCULAR.

El sistema de cocultivo se realizó según el método descrito por López-Farré y cols ⁽⁹⁵⁾ colocando los filtros que contenían las CMLV dentro de los pocillos donde se sembraron las CE. Para realizar el cocultivo se reemplazó el medio MEM de las CMLV por medio RPMI-1640 para que todo el sistema del cocultivo compartiera el mismo medio de cultivo. La coincubación de los dos tipos celulares se mantuvo durante 18 horas.

En este sistema de cocultivo ambos tipos de células comparten el medio, por lo que es posible un intercambio de factores sin que exista contacto físico entre las CE y las CMLV. (Figura 3). Esta técnica de cocultivo también permite el procesamiento independiente de cada tipo celular. Para estos experimentos se usaron placas de 6 pocillos.

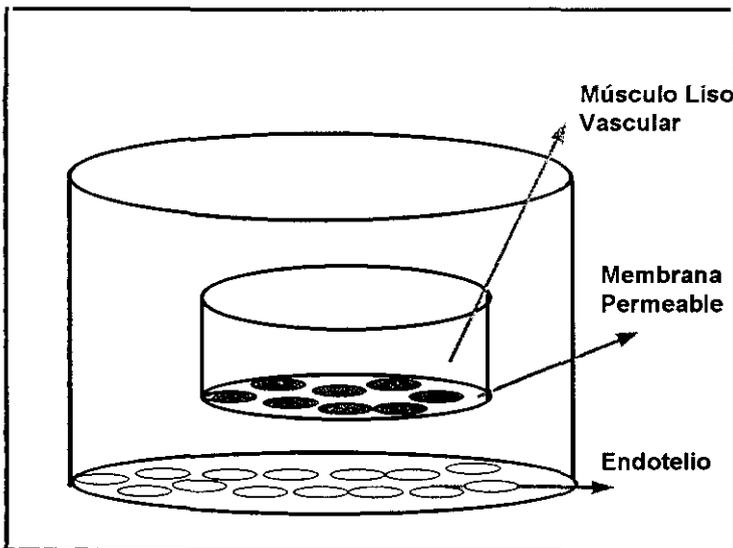


Figura 3.- Esquema de cocultivo entre las células endoteliales y células de músculo liso vascular. Ambos tipos celulares están separados por una membrana permeable que permite el paso de factores sin estar en contacto las células.

5.- MEDIDA DE PRODUCCION DE OXIDO NITRICO.

Se determinó la capacidad de producir NO en segmentos arteriales endotelizados y desendotelizados, en CMLV y en cocultivos entre CE-CMLV. La medida se realizó mediante la cuantificación del ión nitrito (NO_2^-), el metabolito estable generado de la oxidación del NO en el medio de incubación, mediante el reactivo de Griess⁽⁴⁷⁾.

En el caso de cultivos celulares, tanto las CMLV como los cocultivos entre CE y CMLV se sembraron en cajas de 6 pocillos; y tanto las CMLV en cocultivo de CE+CMLV y los segmentos arteriales se incubaron en presencia o ausencia de LPS durante 18 horas.

Transcurridas las 18 horas de la incubación (en incubadora humificada a 37° y con 95 % O_2 y 5% CO_2) se recogió el medio de cultivo y tras centrifugación (2.500 rpm durante 10 minutos) se midieron los niveles de nitritos en el sobrenadante. La cuantificación se realizó mezclando volúmenes iguales del sobrenadante y del reactivo de Griess (sulfonamida 1%; N-1-dihidrocloruro de naftilenediamina 0.1%; y ácido fosfórico 5%) incubándose 1 hora a 60°C . La lectura de las muestras se efectuó en un espectrofotómetro (modelo U-2000, Spectrophotometer Ltd) a una absorbancia de 540 nm. La concentración de nitritos se determinó por comparación con una solución estándar de nitrito sódico preparada en el mismo medio de cultivo.

En el caso de segmentos arteriales los resultados se expresan como pmol/mg de peso húmedo, y en el caso de cultivos celulares como nmol/L x 10^6 células.

6.- EXPRESIÓN DE LA PROTEINA OXIDO NITRICO SINTASA INDUCIBLE.

Se determinó la expresión de la proteína NOSi por la técnica de Western blot en segmentos arteriales con y sin endotelio, en CMLV en monocultivo y en cocultivo con CE, o en carótidas desendotelizadas.

Tanto los cultivos celulares como los segmentos arteriales se incubaron en las condiciones descritas anteriormente en presencia o ausencia de LPS durante 18 horas. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a lisar tanto los segmentos arteriales como las CMLV para extraer las proteínas. Los segmentos arteriales se pulverizaron y las CMLV se recogieron mediante raspado suave. De la misma forma, cuando fue necesario se pulverizaron las carótidas.

La solubilización de las proteínas se realizó mediante incubación de las muestras con tampón de lisis (0,25 M Cl₂Mg; 10% glicerol; 5% Nonidet; 0,025 M HEPES; 10⁻⁴ M PMSF; 10 µg/ml leupeptina; 10 µg/ml pepstatina A) durante 1 hora a 4°C. Tras la centrifugación a 13.000 rpm a 4°C durante 5 minutos se determinó la concentración de proteínas de las muestras mediante el método de Bradford ⁽⁹⁾. Las proteínas se mezclaron con solución de Laemmli ⁽⁸⁵⁾ conteniendo 2-β-mercaptoetanol.

Las proteínas se separaron por electroforesis en un gel de 10% de poliacrilamida (15 µg/línea), transfiriéndose a unas membranas de nitrocelulosa (Immobilon-P, Millipore). Estas membranas se bloquearon mediante incubación a 4°C durante toda la noche con 5% de albúmina en TBS-T (20 mM Tris-ClH; 137 mM ClNa; 0,1 % Tween 20). El análisis de Western blot se hizo con un anticuerpo monoclonal anti-NOSi (Transduction Laboratories, Lexington). Para ello las membranas se incubaron con el primer anticuerpo (1:2500) durante 1 hora a temperatura ambiente y después de sucesivos lavados, se expusieron a un segundo anticuerpo (anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa) a una dilución de 1:1500 durante 1 hora a temperatura ambiente. La proteína específica correspondiente a la NOSi se detectó mediante el revelado de las membranas por quimioluminiscencia (ECL, Amersham) y se evaluó la expresión de la proteína por

densitometría (Molecular Dynamics). Para la determinación del peso molecular se usaron proteínas como marcadores del peso molecular (Sigma Chemicals).

Para determinar la especificidad del anticuerpo monoclonal anti-NOSi se hicieron dos comprobaciones. Primero se analizó la reactividad cruzada del anticuerpo contra la isoforma NOS α usando homogenados de CE de rata y de aorta bovina. Los cultivos de CE de rata se realizaron según el método de McGuire y cols ⁽¹⁰⁶⁾.

La segunda comprobación de la especificidad del anticuerpo contra la NOSi fue la reacción de reconocimiento con el control positivo obtenido de un homogenado de macrófagos de rata activados con LPS de E. coli.

7.- MODELO DE DENUDACION ENDOTELIAL IN VIVO.

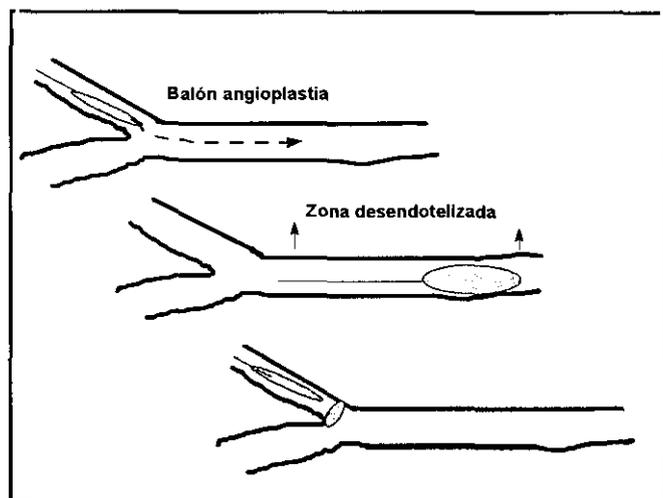
Se realizó un modelo de denudación endotelial estandarizada, y para ello se emplearon ratas Wistar macho de 300 ± 50 gramos (6 meses de edad). La manipulación de los animales se realizó siguiendo las normas aprobadas por el Comité de Investigación Animal de la Fundación Jiménez Díaz.

Después de anestesiarse a las ratas con pentobarbital sódico (200 mg/kg), se realizó una incisión media longitudinal que se extendía desde la mandíbula al esternón. Mediante la disección roma se despegaron las glándulas submaxilares y los ganglios linfáticos, seccionándolos en su porción media para poder reclinarlos lateralmente con facilidad. Una vez separado el músculo esternocleidomastoideo y seccionado el omohioideo aparece el paquete vasculo-nervioso. Se diseccionó la bifurcación interna y externa de la carótida izquierda, y se realizó una pequeña arteriotomía en la carótida externa, insertándose un catéter de balón 2F Fogarty (Baxter Edwards US).

El catéter se introdujo en la aorta, 2 cm detrás de la bifurcación de la carótida, como se puede ver en el esquema (Figura 4). Entonces se infló con 0,2 ml de aire, a 6 atmósferas, durante 60 segundos, y durante el tiempo que dura el inflado se manipuló el balón en sentido rotatorio axial y longitudinal, con el fin de obtener un área vascular de 20 mm con denudación endotelial completa. Este procedimiento se repitió 3 veces y posteriormente se retiró el catéter hasta el punto de entrada.

Retirado el balón, se suturó el lugar de la punción carotídea, y los animales se mantuvieron vivos, con una dieta normal *ab libitum*, hasta el sacrificio. La elección del vaso se debe a la facilidad de acceso al mismo, su diámetro, que permite el uso de balones convencionales (2F Fogarty), y su bilateralidad, que permite disponer de un vaso control como medida basal en comparación con la arteria angioplastiada.

Figura 4. Esquema del procedimiento para realizar la denudación endotelial en la carótida de la rata. La zona en rojo muestra la zona desendotelizada por balón y que fue la que se utilizó para los experimentos.



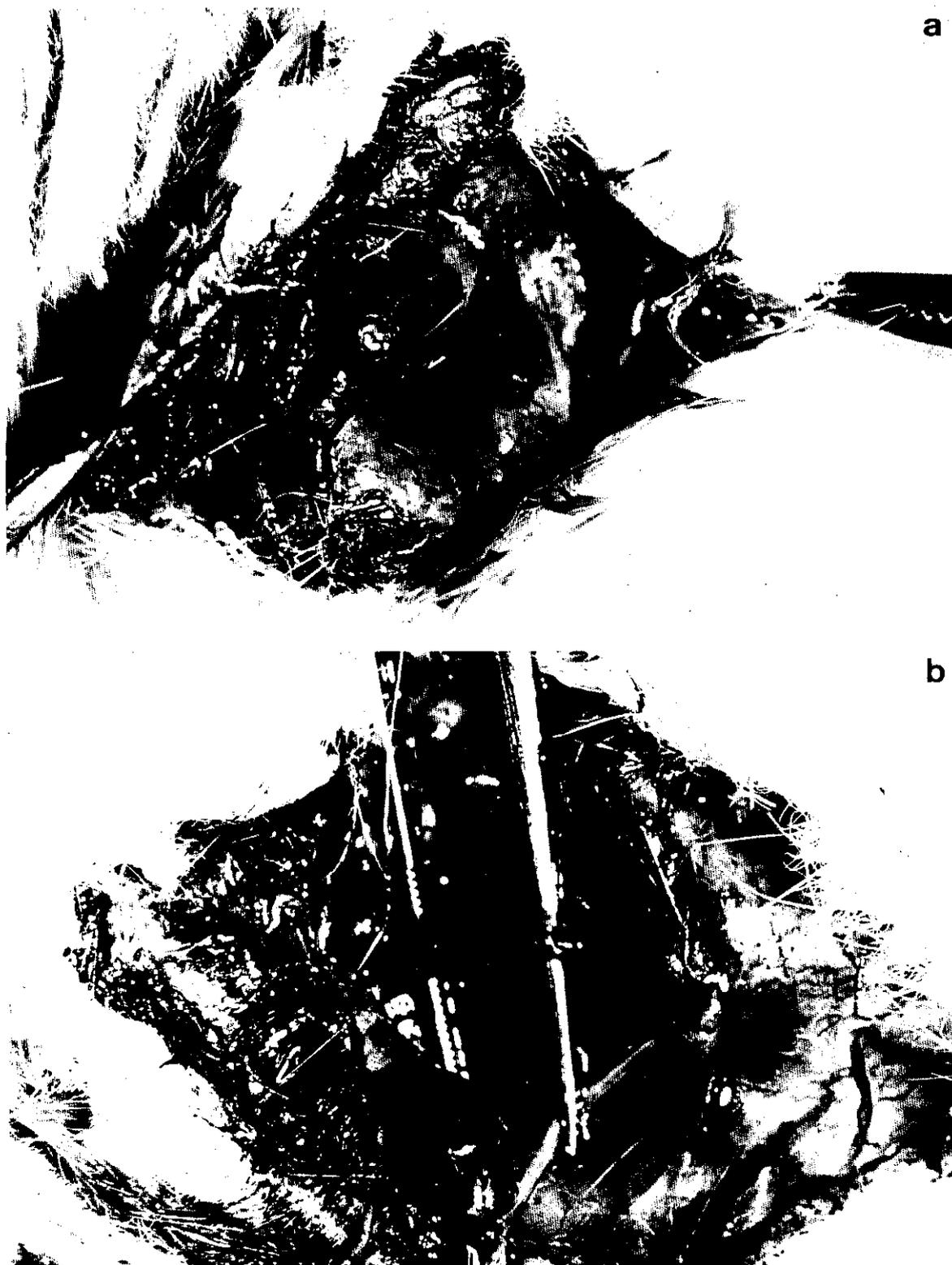


Figura 5.a y 5.b.- En las figuras 5.a y 5.b se observa la cervicotomía y posterior disección del plano muscular (5.a) hasta llegar al paquete vásculo-nervioso (5.b).

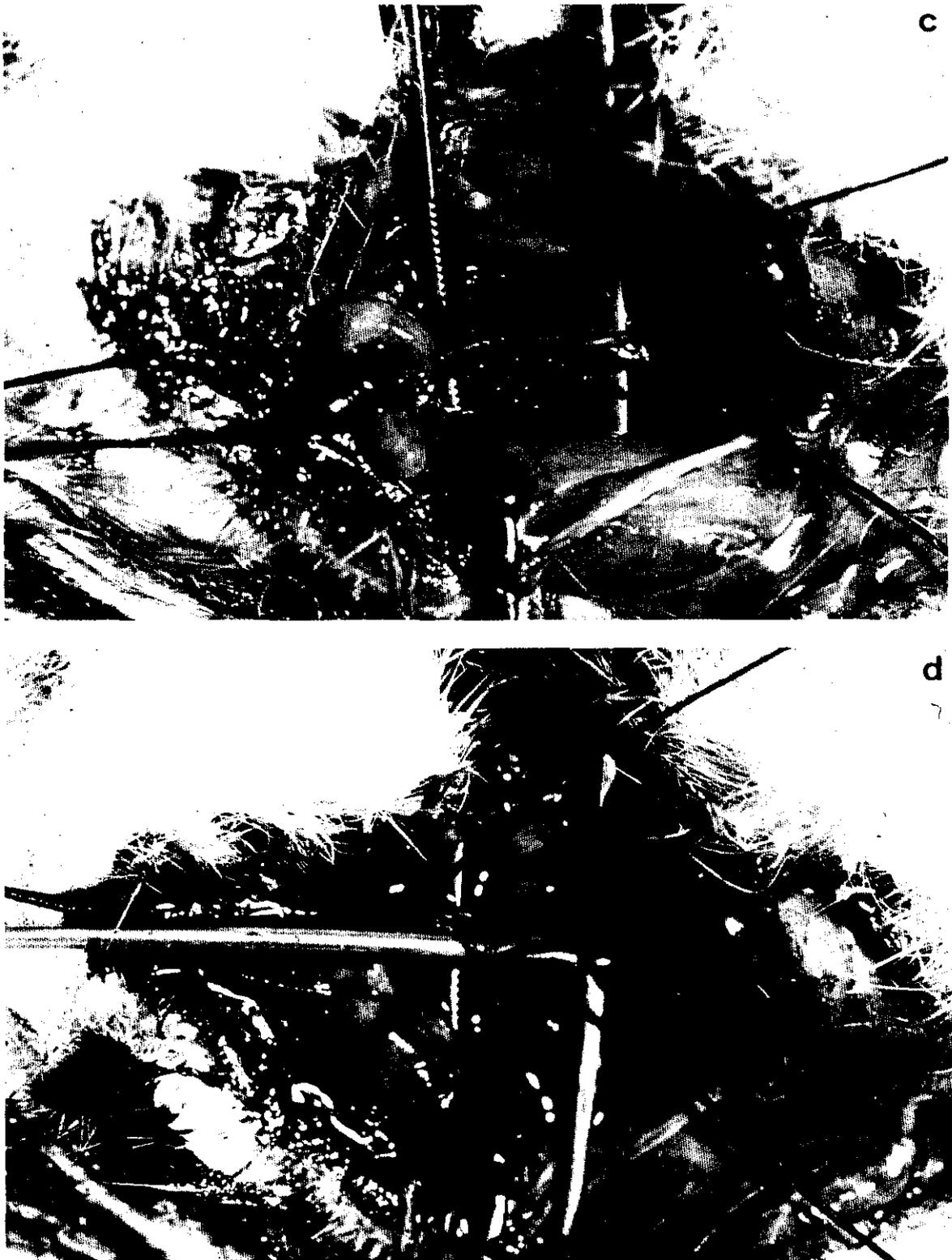


Figura 5.c y 5.d.- Arteria carótida disecada a nivel de su bifurcación (5.c), e introducción del balón de angioplastia a través de la arteria carótida externa (5.d).

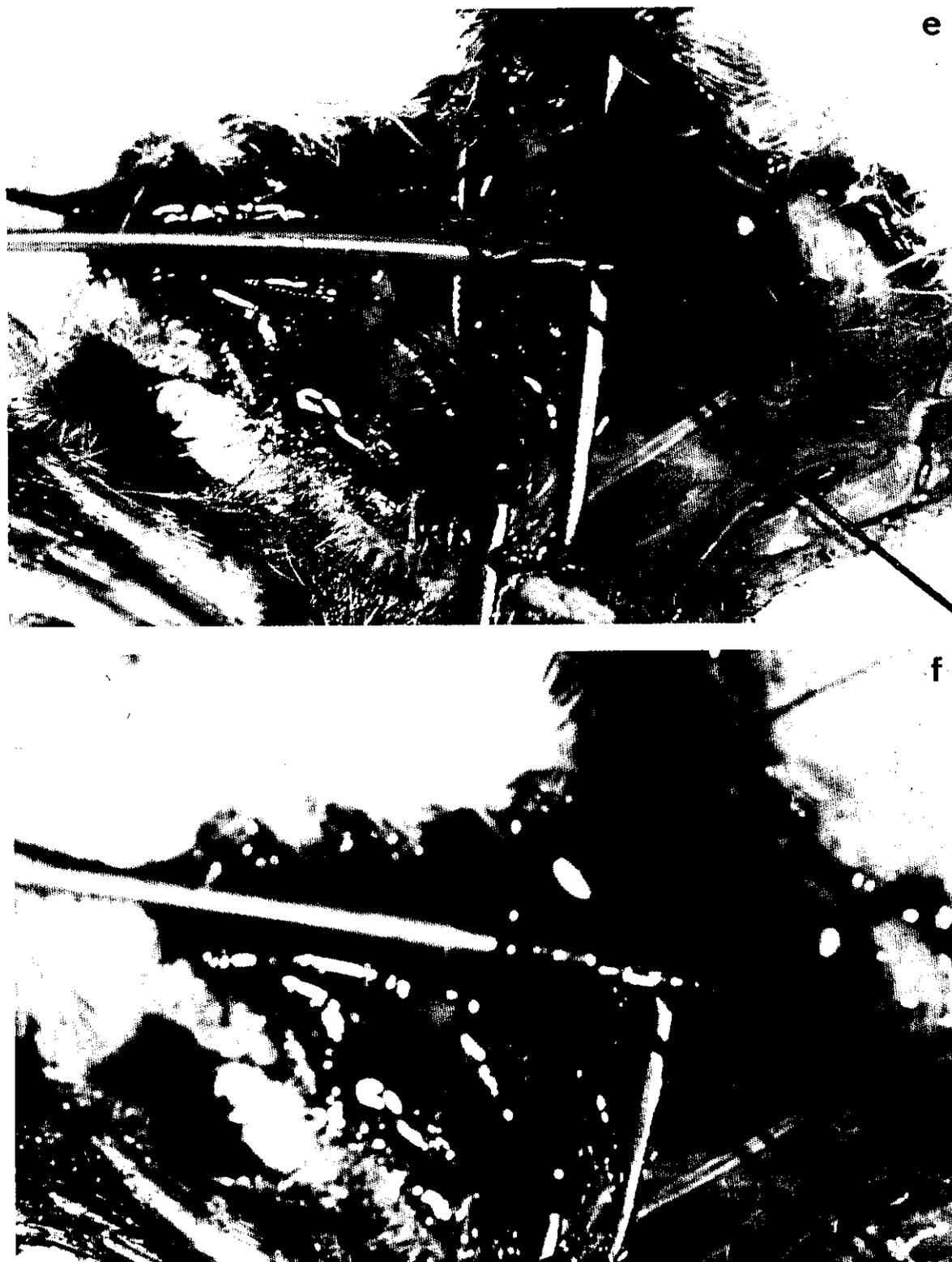


Figura 5.e y 5.f .- Progresión del catéter hasta la zona donde se realizará la denudación endotelial a nivel de la aorta (5.e), y posterior inflado del balón (5.f).



Figura 5.g y 5.h.- Extracción del balón de angioplastia (5.g) y posterior ligadura de la arteria carótida externa a ambos lados de la arteriotomía (5.h).



Figura 5.i y 5.j.- Cierre por planos y aspecto final del animal.

Para prevenir la endotoxemia, 2 días antes de realizar la denudación las ratas fueron tratadas con 1,17 g/L de amoxicilina y 0,29 g/L de ácido clavulánico. Este tratamiento se continuó hasta que los animales fueron sacrificados.

Las arterias dañadas con el balón de la forma descrita antes, se recogieron a los distintos tiempos : 6, 24 y 48 horas y a los 7, 14 y 30 días. En todos los experimentos, la arteria carótida derecha contralateral se usó como control. A los tiempos indicados, las ratas fueron anestesiadas y exsanguinadas. Los posibles restos de sangre fueron lavados por perfusión a través de la aorta abdominal con 100 mL de salino isotónico a una presión de 100 mmHg. Inmediatamente después de estas maniobras, ambas carótidas fueron extraídas y, o bien congeladas rápidamente en nitrógeno líquido para posteriores determinaciones, o bien incluidas en parafina para su posterior estudio histológico.

8.- ESTUDIOS HISTOPATOLOGICOS.

Se llevaron a cabo análisis morfométricos de las carótidas angioplastiadas. Después de fijar las arterias con formaldehído al 4 % en PBS, se cortaron piezas de 5 mm y se incluyeron en parafina. Con un microtomo (Micron, Francia) se realizaron cortes de 4 μ m de grosor, se tiñeron con hematoxilina-eosina, tricrómico de Masson y orceína. De todas estas preparaciones se hicieron fotografías.

9.- PREPARACION DE UNA SUSPENSION DE PLAQUETAS.

La sangre de 6 ratas fue recogida en una solución al 10% (v/v) de ácido-citrato-dextrosa, y centrifugada a 1000 rpm durante 30 minutos, a temperatura ambiente, recogiendo de esta forma el plasma rico en plaquetas (PRP) ^(90,91). Las plaquetas fueron aisladas del PRP por centrifugación a 2500 rpm durante 15 minutos. Una vez aisladas las plaquetas, estas fueron resuspendidas en medio RPMI, para ser coincubadas posteriormente con las carótidas desendotelizadas, en unas concentraciones que variaban desde 1×10^5 a 1×10^8 plaquetas/mL, durante 18 horas. El número de plaquetas se determinó mediante un contador Coulter. Cuando se necesitó activar las plaquetas, se activaron por adición de colágeno (20 mg/mL).

10.- PRODUCCION DE UN SUERO ANTIPLAQUETAS DE RATA.

El suero antiplaquetas de rata se obtuvo, según se describe en la bibliografía, de la siguiente manera ⁽¹⁰⁷⁾: las plaquetas aisladas, obtenidas de ratas Wistar control fueron homogenadas en el adyuvante de Freund, y se las inyectó subcutáneamente a un conejo. El plasma del conejo se recogió por plasmaféresis 10 días después de la segunda inmunización. Un suero no inmune, de conejos que no habían sido inmunizados, se obtuvo también como control (grupo IgG).

A las ratas Wistar se les inyectó el suero antiplaquetas (acAP) o el suero control (IgG), 30 mg/100 mg de peso, 24 horas antes de la intervención. Esta dosis de suero APab produce una severa trombocitopenia, con cantidades de plaquetas menores de 10000 células/mm³ a las 24 horas de inyectado el suero, lo que representa una reducción del 85% ($P < 0,01$) con respecto a las cantidades de plaquetas de las ratas tratadas con el suero IgG. Las arterias dañadas se recogieron a las 6,24 y 48 horas después de la denudación endotelial.

11.- DETERMINACION DE LOS NIVELES PLASMATICOS DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF- α).

Se midieron los niveles plasmáticos del factor de necrosis tumoral (TNF- α) de dos grupos de ratas, los correspondientes a las ratas tratadas con el anticuerpo antiplaquetas de rata, y a las ratas tratadas con la IgG no específica (acAP y IgG), 24 horas después de la denudación endotelial. La sangre de las ratas se recogió en una solución al 10% (v/v) de ácido-citrato-dextrosa, y se centrifugó a 2500 rpm durante 15 minutos a 4°C. Los niveles plasmáticos de TNF- α se determinaron mediante la técnica de ELISA, con un kit comercial (Chromogenix, Sweden). La viabilidad intra e inter ensayo del kit fue de 1,1% y 4,7% respectivamente.

12.- BLOQUEO DE LOS RECEPTORES DE LA GLICOPROTEINA IIb/IIIa PLAQUETARIA Y DEL RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DERIVADO DE LAS PLAQUETAS.

Se administró a las ratas c7E3 Fab (abciximab, Reopro, Eli Lilly y Centocor, Leiden Holanda), un fragmento Fab del anticuerpo monoclonal c7E3 de la quimera humano-ratón, que se une al receptor de la glicoproteína IIb/IIIa de la plaqueta, impidiendo su unión. Administramos el Fab c7E3 como un bolo intravenoso (500 mg/kilo de peso), inmediatamente antes de la desendotelización, seguida de una infusión continua de 10 mg/kg de peso, durante 60 minutos después de la intervención. Las ratas tratadas con una IgG no específica administrada de la misma forma y dosis que el Fab c7E3, sirvieron como controles. Las carótidas dañadas se recogieron 24 horas después de la denudación.

Previamente se había demostrado en la literatura que el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF) inhibe la expresión de la NOSi, y quisimos comprobar la implicación de este factor en el efecto que las plaquetas ejercían sobre la expresión de la NOSi en la pared vascular. Para este objetivo, las ratas recibieron un tratamiento oral con un antagonista competitivo del receptor del PDGF como es el trapidil (triazolopirimidina, UCB Pharma, Barcelona, España) ⁽¹⁰⁰⁾.

El trapidil se añadió al agua de bebida (20 mg/kg de peso), dos días antes de la intervención y hasta el momento de sacrificar al animal. El grupo control fue un grupo de ratas que recibieron agua solamente. En ambos casos, las carótidas dañadas se recogieron a las 24 horas después de la denudación endotelial.

13.- MEDIDA DE LA AGREGACION PLAQUETARIA EX-VIVO.

Se evaluó la agregación plaquetaria en respuesta al ADP, para comprobar el grado de bloqueo inducido con el tratamiento con c7E3 Fab. En resumen, inmediatamente después de terminada una infusión de 60 minutos del anticuerpo frente al GP IIb/IIIa, se recogió la sangre y se obtuvo el PRP, como previamente se ha descrito. Se ajustó el número de plaquetas con un plasma pobre en plaquetas obtenido de las mismas ratas, a una cantidad de $2,5 \times 10^8$ células/mL. La activación plaquetaria se midió en un agregómetro (Chronolog, de 2 canales, Havertown, USA), como está descrito en la bibliografía^(93,94). Previamente, una muestra pobre en plaquetas se usó como control para obtener el 100% de transmisión de luz. El PRP (500 µl) se incubó a 37°C en el agregómetro con una agitación continua de 1000 rpm, y se estimuló la agregación con ADP (10^{-6} mol/L). Para estandarizar las medidas, solamente se usó el valor obtenido por turbidimetría a los 3 minutos, ya que este tiempo corresponde al máximo valor de la primera onda de agregación. Esta primera onda es representativa de la activación plaquetaria más que la agregación, y es parcialmente reversible.

14.- ANALISIS ESTADISTICO.

Los resultados que requieren estadística se expresan como media \pm error estándar de la media ($X \pm EEM$). Cada resultado corresponde a un mínimo de 7 experimentos en cada caso, excepto que se especifique otro valor. Cuando se compararon exclusivamente dos medias se utilizó el test de "t" de Student, de forma emparejada o no emparejada, según cada caso. Cuando se trataba de comparar varias distribuciones de valores, se utilizó un análisis de varianza de una entrada o un análisis de varianza de doble entrada, seguido de una prueba de comparación múltiple de media (Scheffé). En todos los casos, se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas si la p era menor de 0.05. Las pruebas estadísticas se efectuaron mediante el programa Sigma (Horus, Madrid).

RESULTADOS

Los resultados de esta tesis están organizados en 3 partes:

1 - En la primera parte de esta tesis se estudia la importancia que tiene la CE en la regulación de la expresión de la NOSi en segmentos aórticos aislados y en un sistema de cocultivo de CE con CMLV.

2 - En la segunda parte analizamos en un modelo de denudación endotelial in vivo, cómo se expresa la NOSi.

3 - Utilizando un modelo in vitro e in vivo de denudación endotelial, analizamos el papel de las plaquetas activadas sobre la expresión de la NOSi en la pared vascular.

Los experimentos de esta tesis están realizados en segmentos aórticos, en un sistema de cocultivo entre CE y CMLV, y en carótidas de ratas Wistar macho que previamente habían sufrido un proceso de desendotelización in vivo mediante un balón de angioplastia.

1. EFECTO DEL ENDOTELIO EN LA EXPRESIÓN DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTASA INDUCIBLE EN LA PARED VASCULAR

1.1. Producción de nitritos en segmentos arteriales.

En condiciones basales los segmentos arteriales a los que se les había eliminado el endotelio liberaron una cantidad menor de nitritos que los segmentos con endotelio intacto. El tratamiento de los segmentos con o sin endotelio con lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) (10 ng/mL) durante 18 horas incrementó la acumulación de nitritos en el medio de incubación. Sin embargo, el incremento de nitritos obtenido tras la estimulación con LPS fue significativamente mayor en los segmentos desendotelizados respecto de los endotelizados (Figura 6).

Para determinar si la producción de nitritos se derivaba de la vía L-arginina-NO, se añadió al medio de cultivo L-NAME (10^{-4} mol/L), un análogo competitivo de la L-arg y por tanto inhibidor de la síntesis de NO. La presencia de L-NAME disminuyó de manera significativa la acumulación de nitritos en los segmentos tratados con LPS (% de inhibición en la producción de nitritos: 87 ± 4 , $n=6$, $p<0.05$).

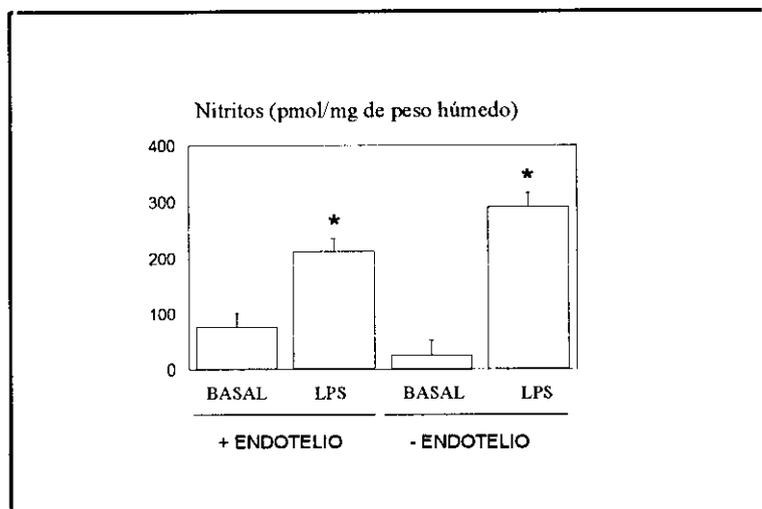


Figura 6. Producción de nitritos inducida por LPS (10 ng/mL) en segmentos aórticos con y sin endotelio. Los resultados se expresan como media \pm EEM ($n=7$). * $p<0.05$ respecto al basal.

1.2. Expresión de óxido nítrico sintasa en segmentos arteriales.

Los cambios en niveles de expresión de NOSi se detectaron por Western blot. En condiciones basales los segmentos arteriales con y sin endotelio mostraron una leve expresión de NOSi (Figura 7.a). Es decir, que aún en condiciones de ausencia de LPS se observó una pequeña expresión de NOSi a pesar de que el medio de incubación de los segmentos aórticos contenía antibióticos para impedir la presencia de bacterias.

La estimulación de los segmentos endotelizados y desendotelizados con LPS (10 ng/mL) durante 18 horas indujo la expresión de la proteína NOSi. El nivel de expresión de NOSi inducida por LPS en los segmentos desendotelizados fue de mayor magnitud que en el caso de los segmentos con endotelio (Figura 7.a y 7.b).

Se comprobó la especificidad del anticuerpo monoclonal usado para reconocer a la proteína NOSi. El anticuerpo monoclonal empleado no reconoció a la isoforma de la proteína óxido nítrico sintasa endotelial (NOSe), ya que no se observó la aparición de ninguna banda utilizando un homogenado de CE de aorta de rata (Figura 7.a). Sin embargo, el anticuerpo monoclonal usado reconoció de manera específica a la isoforma NOSi (130 KDa) procedente de un homogenado de macrófagos de ratón activados con LPS (Figura 7.a).

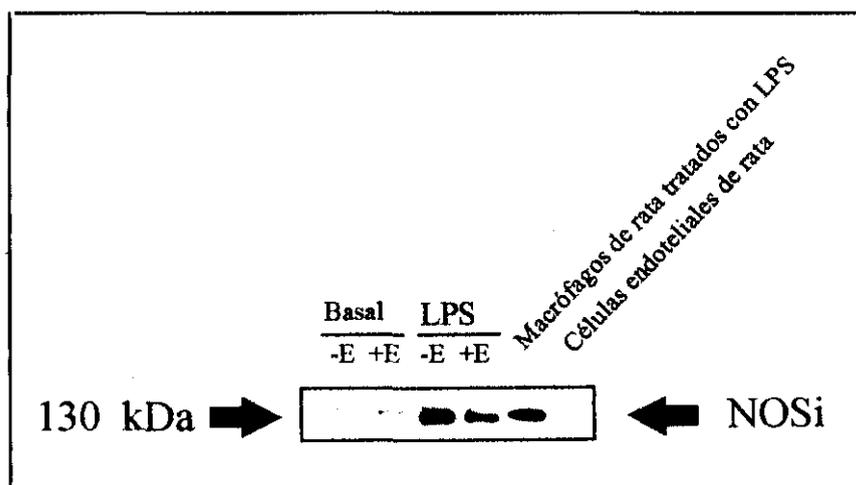


Figura 7.a. Western blot representativo mostrando la expresión de NOSi en segmentos aórticos con y sin endotelio estimulados o no con LPS (10 ng/mL). También está representado un control positivo (homogenado de macrófagos de rata activados con LPS) y un control negativo (homogenado de CE de aorta de rata) de la especificidad del anticuerpo anti-NOSi empleado.

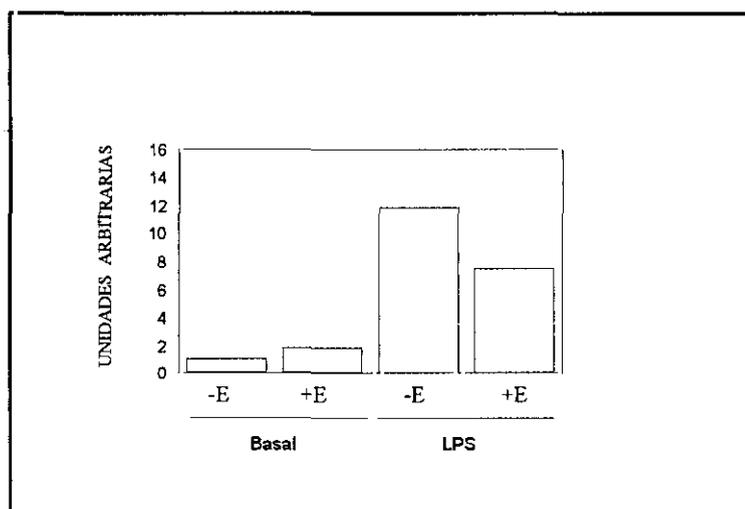


Figura 7.b. Análisis densitométrico del Western blot.

2. EFECTO DEL ENDOTELIO EN LA EXPRESIÓN DE LA ÓXIDO NITRICO SINTASA INDUCIBLE EN CÉLULAS DE MÚSCULO LISO VASCULAR EN UN SISTEMA DE COCULTIVO

Para analizar si realmente el endotelio regulaba la expresión de NOS_i, se realizaron experimentos utilizando un sistema de cocultivo entre CE y CMLV.

2.1. Producción de nitritos en células de músculo liso vascular en monocultivo y en presencia de células endoteliales

En condiciones basales las CMLV liberaron niveles muy pequeños de nitritos al medio de incubación. La estimulación de CMLV con LPS (10 ng/mL) durante 18 horas produjo una gran acumulación de nitritos en el medio de cultivo (Figura 8). Para determinar la especificidad de la determinación de nitritos como medida de la producción de NO por las CMLV, se añadió al medio de incubación L-NAME (10⁻⁴ mol/L), inhibidor de la síntesis de NO, o dexametasona (10⁻⁶ mol/L), un inhibidor de la expresión de NOS_i. La acumulación de nitritos en el medio de cultivo de CMLV disminuyó de manera significativa en presencia de L-NAME y de dexametasona (86 ± 2 % y 63 ± 4%, respectivamente; n=4, p< 0.05).

En condiciones basales, la presencia de CE no modificó la pequeña liberación de nitritos al medio de incubación obtenida con las CMLV solas (Figura 8). Sin embargo, la liberación de nitritos al medio de incubación estimulada con LPS fue significativamente mayor en CMLV que en el cocultivo entre CMLV y CE (Figura 8).

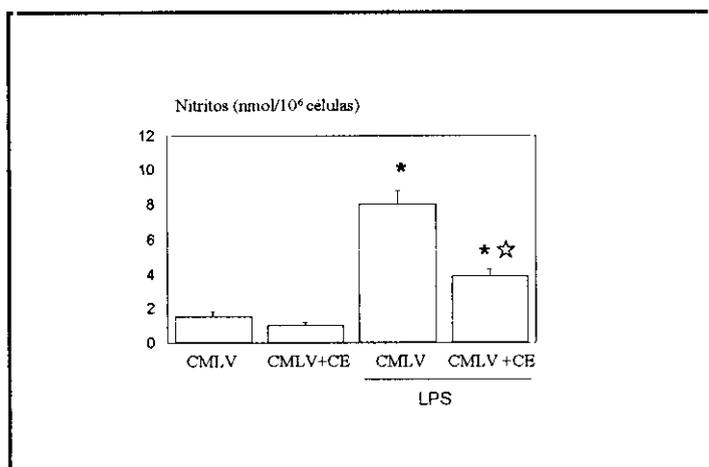


Figura 8. Producción de nitritos en CMLV en monocultivo y en presencia de CE, en condiciones basales y estimuladas con LPS (10 ng/mL). * $p < 0.05$ respecto al basal, ☆ $p < 0.05$ respecto a CMLV incubadas con LPS.

2.2. Expresión de óxido nítrico sintasa inducible en células de músculo liso vascular en monocultivo y en presencia de células endoteliales

Las CMLV mostraron una mínima expresión de NOSi en condiciones basales y esta expresión no se modificó cuando las CMLV se incubaron en presencia de CE (Figura 9.a y 9.b).

La estimulación de las CMLV durante 18 horas con LPS (10 ng/mL) aumentó la expresión de NOSi (Figura 9.a y 9.b). La presencia de CE disminuyó de manera significativa la expresión de NOSi inducida por LPS en CMLV (Figura 9.a y 9.b).

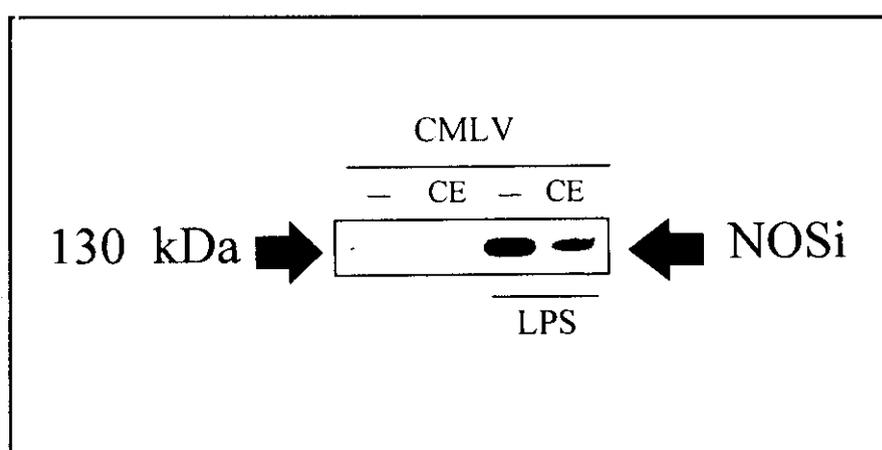
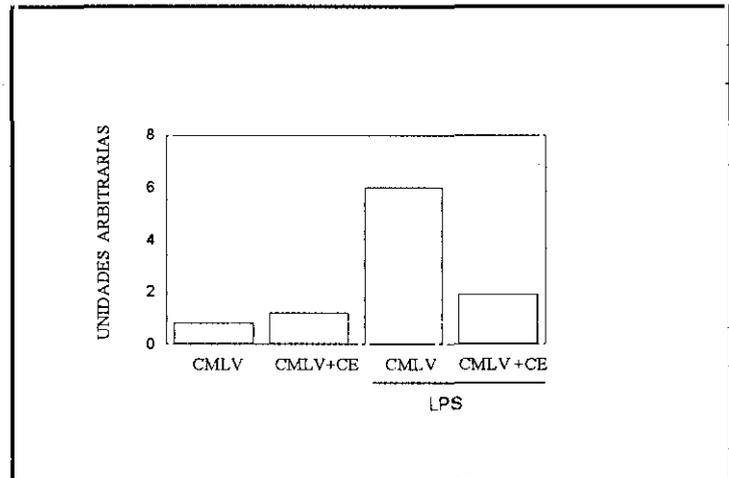


Figura 9.a. Western blot representativo mostrando la expresión de NOSi en CMLV en monocultivo y en presencia de CE, en condiciones basales y estimuladas con LPS (10 ng/mL).

Figura 9.b. Análisis densitométrico del Western blot.



3. EFECTO DE LA DENUDACION ENDOTELIAL IN VIVO EN LA EXPRESION DE LA OXIDO NITRICO SINTASA INDUCIBLE.

3.1. Denudación endotelial de la carótida de rata.

Un caso particular en el cual va a existir CMLV, pero no CE, es en la angioplastia, donde vamos a tener una denudación endotelial producida por el balón. Para comprobar el alcance de la lesión, después de realizada la angioplastia, recurrimos en primer lugar a realizar una tinción con sales de plata.

3.1.1. Tinción con sales de plata.

Sabemos que la plata metálica tiende a depositarse en forma de finos precipitados sobre estructuras fibrilares finas o sobre fibras reticulares de tejido conectivo. De forma que las fibras reticulares adquieren una coloración negra y las fibras colágenas una coloración amarilla.

En la Figura 10.a se observa un segmento arterial en su extensión luminal, y en este caso, la coloración negra correspondería a las fibras reticulares que se encuentran por debajo de las CE. Como se puede ver, las fibras reticulares teñidas forman un perfecto entramado que correspondería a la disposición en forma de “pavimento” de las CE. Sin embargo, en la Figura 10.b se puede observar el segmento arterial después de haber sido sometido a una desendotelización con balón, y se ve como las fibras reticulares ya no forman un entramado perfecto, lo que pone de manifiesto la pérdida de la organización endotelial.

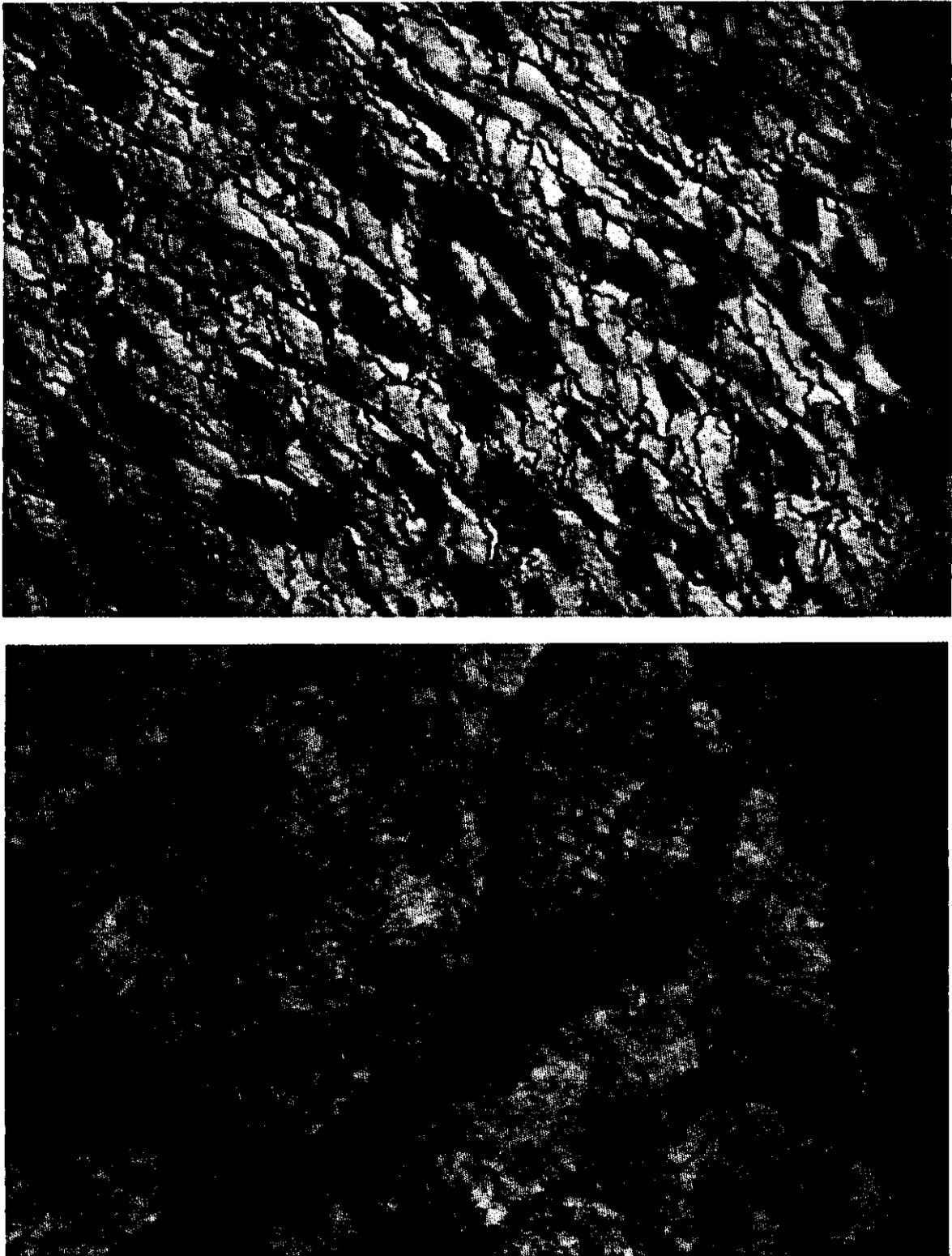


Figura 10 .- Las fotografías muestran la tinción con nitrato de plata de un segmento arterial de rata, incluido en parafina. En la figura10.a puede verse la sección arterial sin haber sufrido ninguna alteración, mientras que en la figura 10.b puede verse la sección arterial después de haber sufrido una desendotelización.

3.1.2. Estudios histopatológicos.

Para estudiar la evolución de la lesión producida por la denudación endotelial, se procedió a realizar un estudio histopatológico con inclusión en parafina y tinción con hematoxilina-eosina y técnica de tricrómico de Masson.

A) Hematoxilina-eosina.

Se realizó un estudio de conjunto en las carótidas angioplastiadas obtenidas a las 24 horas, 7 y 30 días. Como se puede observar en la Figura 11.a y 11.b, a las 24 horas se ve como ha desaparecido el endotelio y se ha formado el trombo mural después de la lesión. Este trombo, en un primer momento, es un trombo muy poco organizado, con gran cantidad de hematíes, escasos depósitos de material fibrinoide y ocasionales polimorfonucleares.

A los 7 días (Figuras 11.c y 11.d) se empieza a ver cierta revascularización del vaso, ya que se ha comenzado a disgregar el trombo y las CMLV ya han empezado a migrar al espacio que ocuparía la capa subendotelial. Este trombo tiene una naturaleza distinta del de 24 horas, pues es un trombo rico en fibrina, está mucho más organizado o células de aspecto fibroblástico o miofibroblástico.

A los 30 días (Figuras 11.e y 11.f), se observa que el neoendotelio ya está formado, y que desde la lámina elástica interna hacia la luz, hay un cierto engrosamiento, que se ha producido como consecuencia de la migración y proliferación de las CMLV de la media. El trombo ha desaparecido casi por completo.

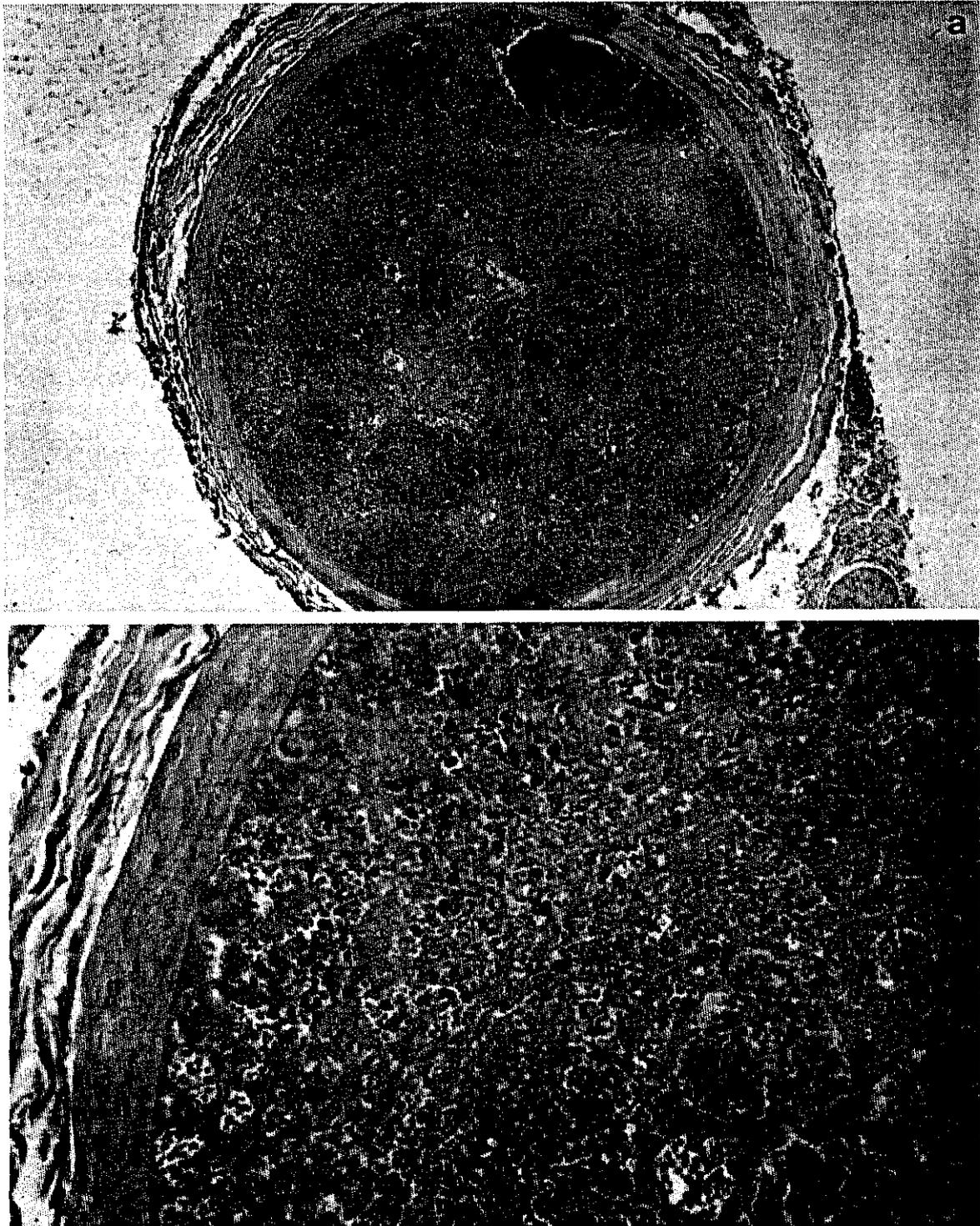


Figura 11.a y 11.b. Análisis de las lesiones vasculares producidas por balón a las 24 horas de realizada la denudación endotelial. En la figura 11.a se ve la microfotografía a pequeño aumento de una sección representativa de carótida angioplastiada obtenida 24 horas después de la denudación endotelial (Magnificación x40), mientras que en la figura 11.b se observa un detalle de esta misma sección (Magnificación x400), teñidas ambas con hematoxilina-eosina.

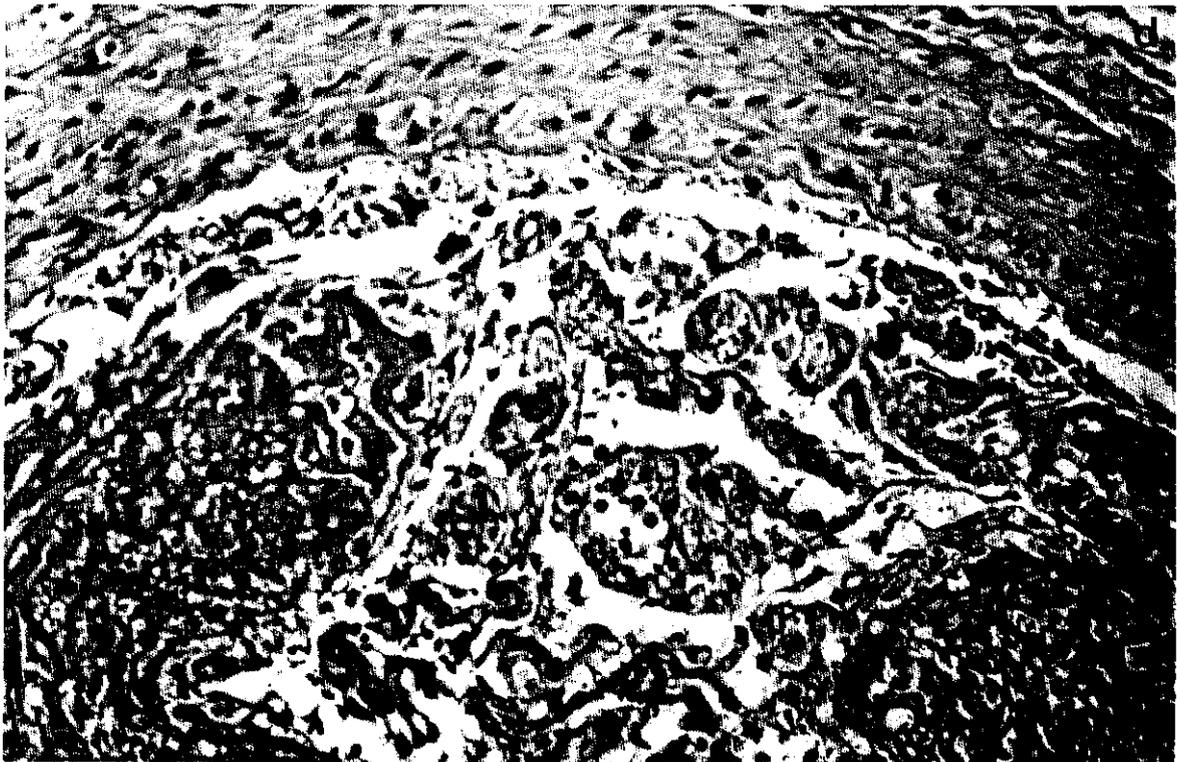
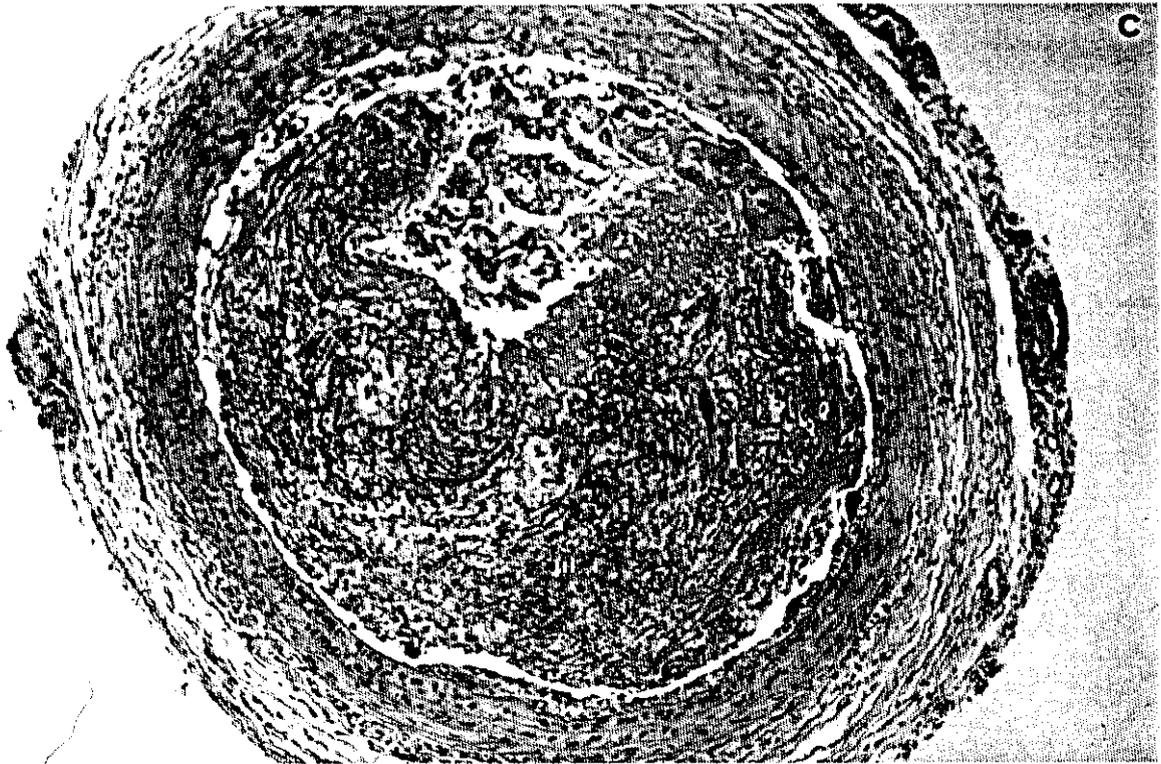


Figura 11.c y 11.d. Análisis de las lesiones vasculares producidas por balón a los 7 días de realizada la denudación endotelial. En la figura 11.c se ve la microfotografía a pequeño aumento de una sección representativa de carótida angioplastiada obtenida 7 días después de la denudación (Magnificación x40), mientras que en la figura 11.d se observa un detalle de esta misma sección (Magnificación x400), teñidas ambas con hematoxilina-eosina.

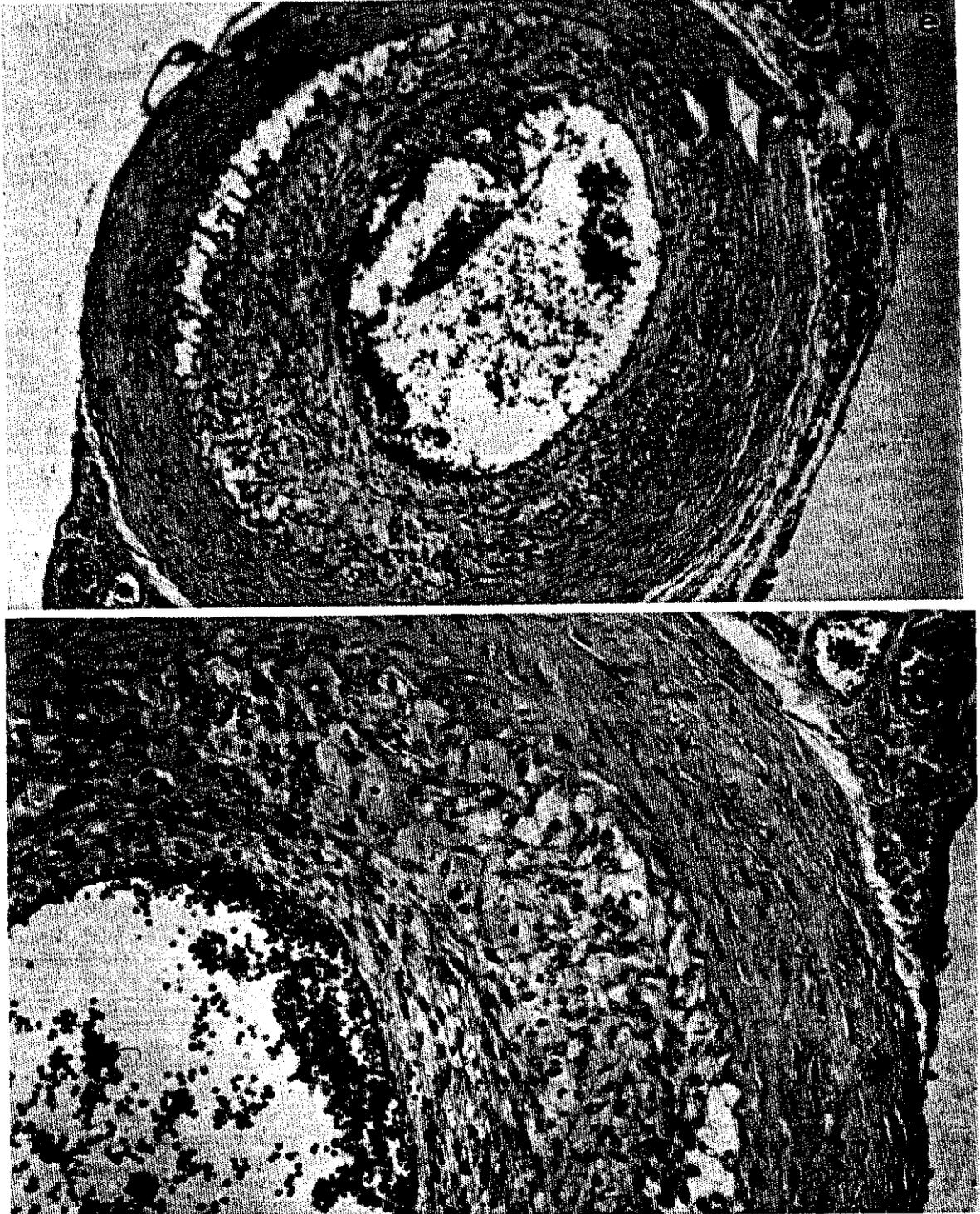


Figura 11.e y 11.f. Análisis de las lesiones vasculares producidas por balón a los 30 días de realizada la denudación endotelial. En la figura 11.e se ve la microfotografía a pequeño aumento de una sección representativa de carótida angioplastiada obtenida 30 días después de la denudación endotelial (Magnificación x40), mientras que en la figura 11.f se observa un detalle de esta misma sección (Magnificación x400), teñidas ambas con hematoxilina-eosina.

B) Tinción de Masson.

Con las tinciones tricrómicas se van a teñir fibras colágenas, que forman el componente estromal existente entre los espacios extracelulares. De esta forma, los núcleos adquieren un color azul-negrusco, las fibras musculares y eritrocitos, un color rojo y el colágeno un color verde.

En la Figura 12, se observa la tinción de Masson de las carótidas angioplastiadas obtenidas a las 24 horas, 7 y 30 días. En las Figuras 12.a y 12.b, que corresponden a la carótida obtenida a las 24 horas de realizada la angioplastia se ve como ha desaparecido el endotelio, se ha formado el trombo que ocupa casi totalmente la luz del vaso, y no hay todavía engrosamiento de la neoíntima. Además, se puede ver como hay un cierto daño en la capa muscular, con infiltración de hematíes.

A los 7 días (Figuras 12.c y 12.d), con cierta revascularización del vaso, hay todavía una ocupación parcial de la luz por un trombo compuesto por hematíes, fibrina, neutrófilos e histiocitos. Y aunque se sigue observando el daño en la capa muscular se aprecia el comienzo de neoendotelización vascular.

A los 30 días (Figuras 12.e y 12.f), se observa que el neoendotelio ya está formado, con un notable engrosamiento por migración y proliferación de la capa media.

En la técnica de orceína, que tiñe fibras elásticas, también se aprecia un aumento paulatino de la capa muscular con ocupación de la neoíntima.

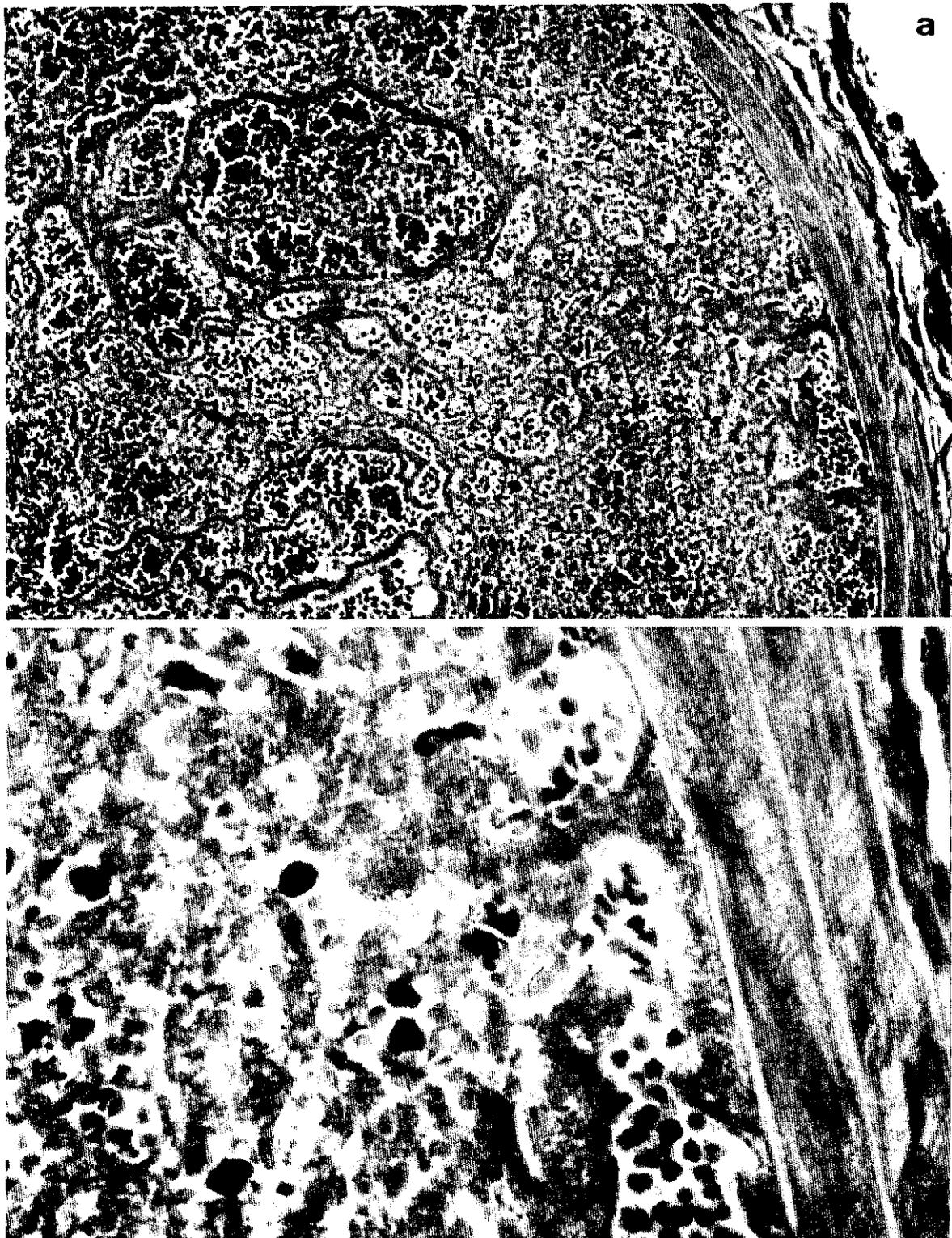


Figura 12.a y 12.b. Análisis de las lesiones vasculares producidas por balón a las 24 horas de realizada la denudación endotelial. En las figuras 12.a y 12.b se ven microfotografías de una sección representativa de carótida angioplastiada, obtenidas a las 24 horas después de la denudación endotelial (Magnificación x400, e inmersión), teñidas con la tinción de Masson.

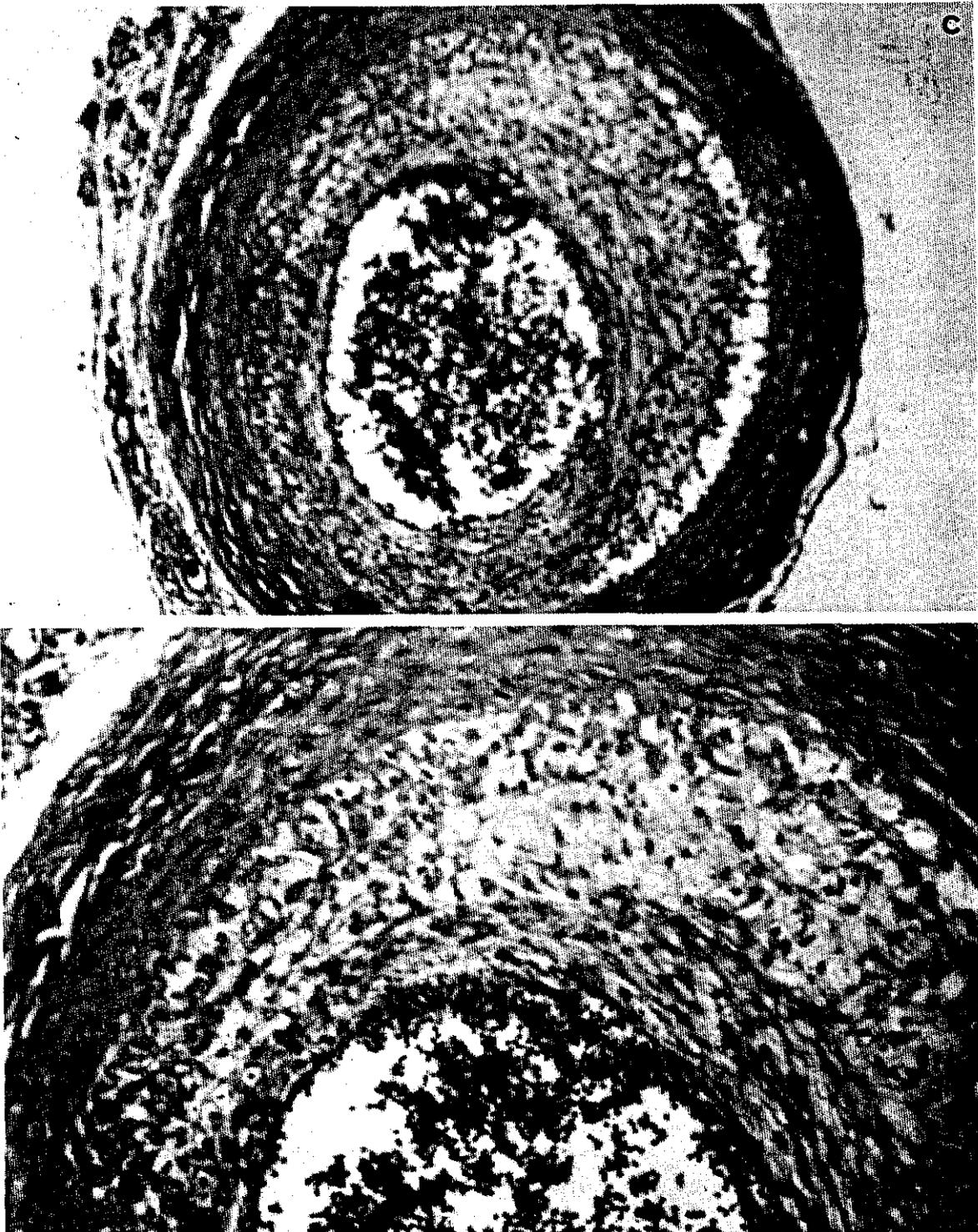


Figura 12.c y 12.d. Análisis de las lesiones vasculares producidas por balón a los 7 días de realizada la denudación endotelial. En la figura 12.c se ve una microfotografía a pequeño aumento de una sección representativa de carótida angioplastiada, obtenidas a los 7 días (Magnificación x40), mientras que en la figura 12.d se observa un detalle de esta misma sección (Magnificación x400), teñidas ambas con el tricrómico de Masson.

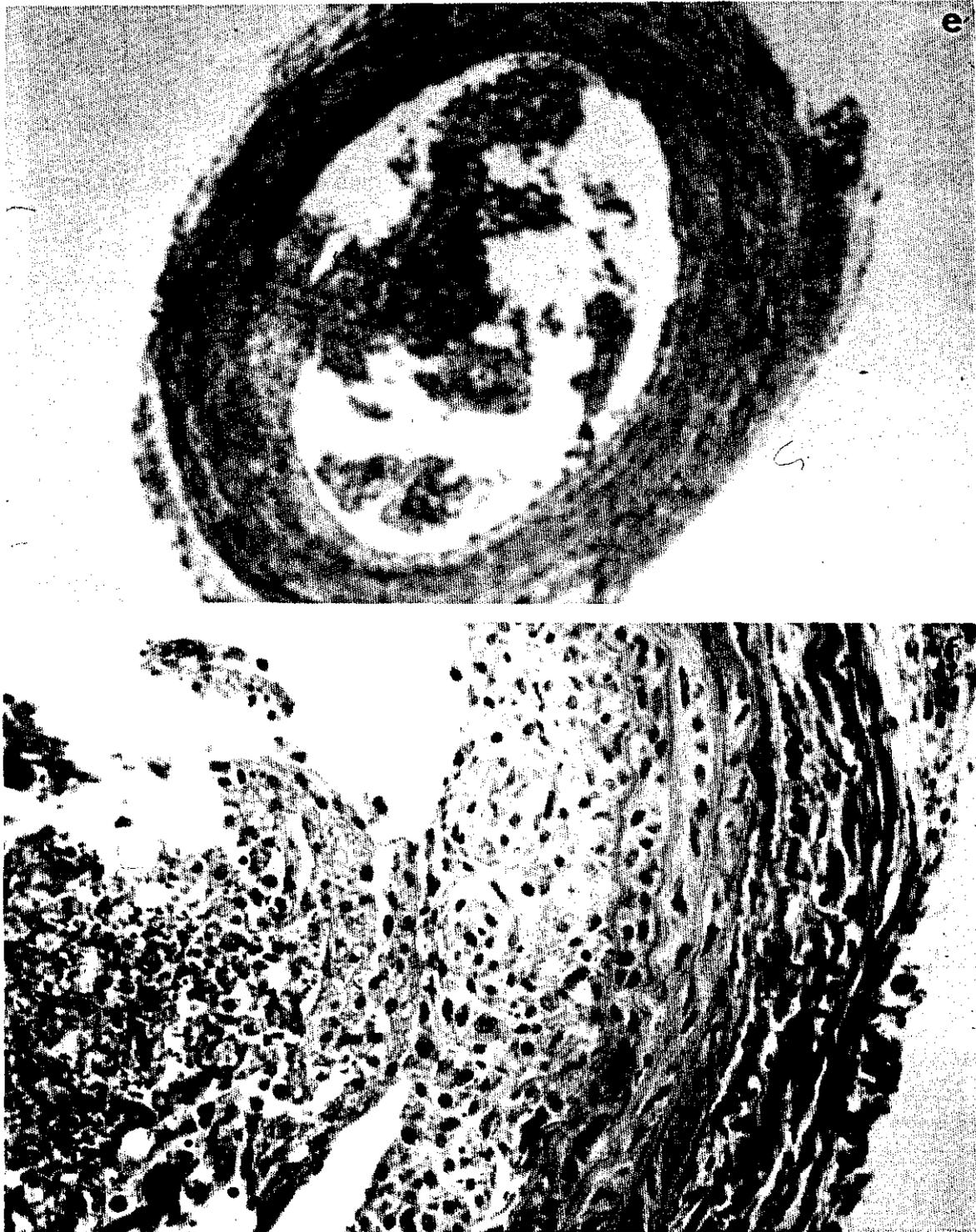


Figura 12.e y 12.f. Análisis de las lesiones vasculares producidas por balón a los 30 días de realizada la denudación endotelial. En la figura 12.e se ve una microfotografía a pequeño aumento de una sección representativa de carótida angioplastiada, obtenidas a los 30 días después de la denudación (Magnificación x40), mientras que en la figura 12.f se observa un detalle de esta misma sección (Magnificación x400), teñidas ambas con el tricrómico de Masson.

3.2. Expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en carótidas desendotelizadas in vivo.

Nos propusimos observar la expresión de la NOSi a distintos tiempos después de realizada la angioplastia, y por este motivo se eligieron los siguientes tiempos: 6, 24 y 48 horas y 7, 14 y 30 días. Después de realizada la denudación endotelial, la expresión de la NOSi aparece elevada entre el 7º y en el 30º día, sin embargo, en las fases tempranas (6 a 48 horas) solamente se observa una ligera expresión de la NOSi (Figura 13.a y 13.b).

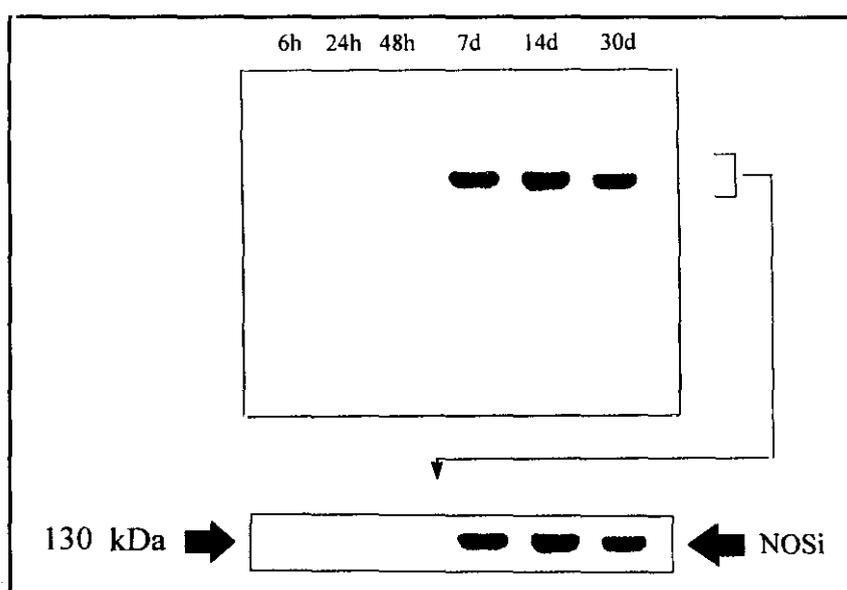


Figura 13.a. Western blot representativo mostrando la expresión de la NOSi en las carótidas desendotelizadas a las 6, 24 y 48 horas, y a los 7 14 y 30 días, después de realizada la angioplastia.

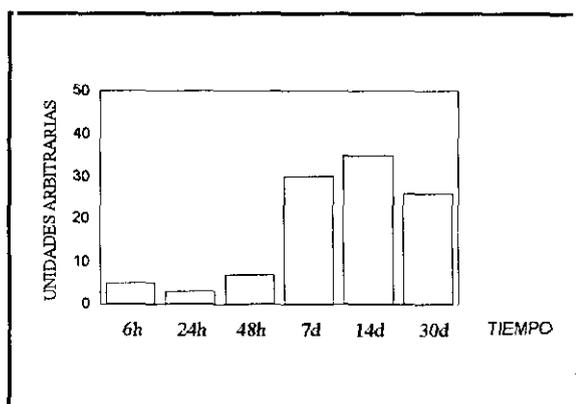


Figura 13.b. Análisis densitométrico del Western blot.

Se analizó si la expresión de la NOSi variaba en la carótida desendotelizada con balón con respecto a la carótida contralateral no dañada, y se vio que la expresión de la NOSi en la arteria dañada era más elevada que en la arteria no dañada que tenía una menor expresión de la NOSi (Figura 14.a y 14.b).

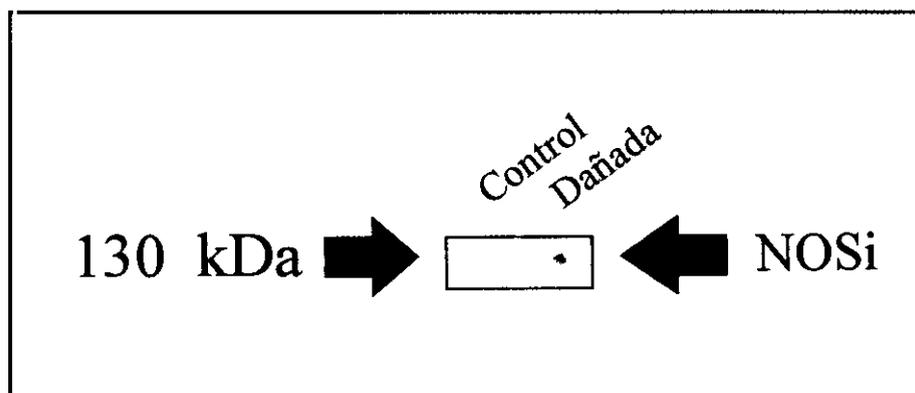
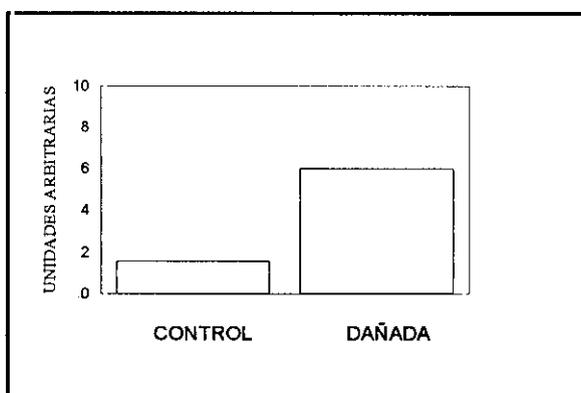


Figura 14.a. Western blot representativo mostrando la expresión de la NOSi en la carótida desendotelizada y en la carótida contralateral no dañada.

Figura 14.b. Análisis densitométrico del Western blot.



Para comparar la expresión de la NOSi con la expresión de otra proteína de la pared vascular después de realizada la denudación, analizamos la expresión de la enzima convertora de angiotensina I (ECA) mediante Western blot, usando un anticuerpo monoclonal frente a esta enzima (Chemicon International Inc. Temecula. California, US). Como se observa en la figura, mientras que inmediatamente después de realizada la denudación endotelial no se detectó expresión de la ECA, a las 48 horas y a los 7 días sí era evidente tal expresión (Figura 15).

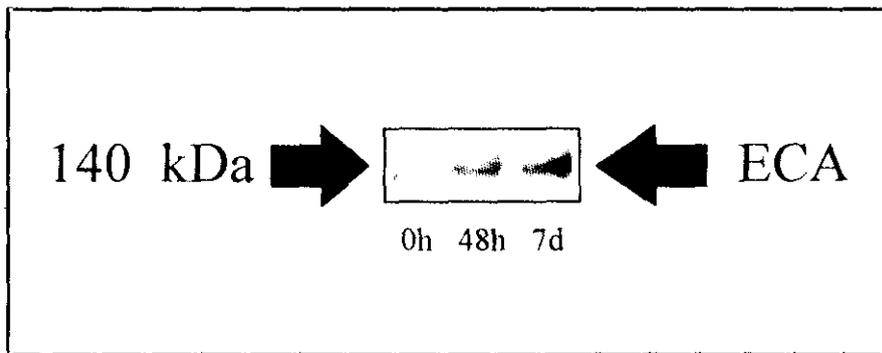


Figura 15.a. Western blot representativo mostrando la expresión de la ECA en la carótida desendotelizada a las 0, 48 horas y a los 7 días.

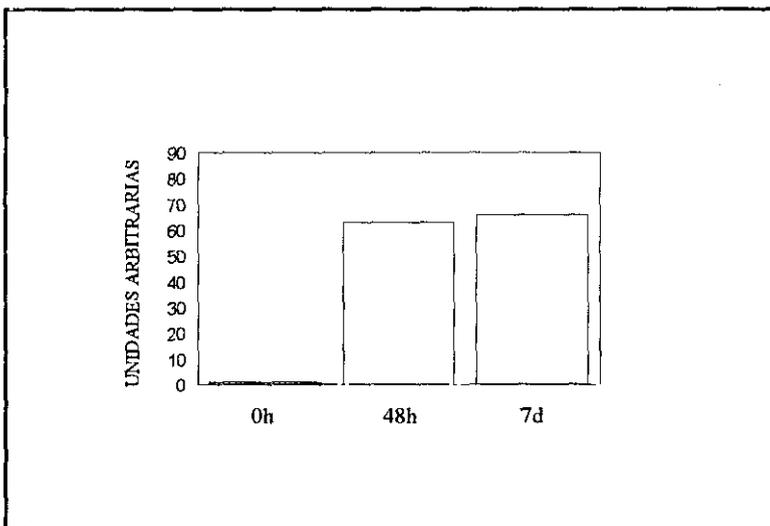


Figura 15.b. Análisis densitométrico del Western blot.

4. EFECTO DE LAS PLAQUETAS DESPUES DE LA DENUDACION ENDOTELIAL.

4.1. Efecto de las plaquetas en la producción de nitritos en carótidas desendotelizadas in vitro.

Como anteriormente señalamos, el tratamiento de los segmentos arteriales desendotelizadas in vitro con LPS (10 ng/ml) estimulaba la acumulación de nitritos en el medio de incubación. Sin embargo, al realizar la adición simultánea de plaquetas activadas con colágeno (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$), se observó una disminución de la producción de nitritos inducidos por el LPS de una forma concentración-dependiente mostrando la máxima inhibición con una concentración de 10^8 plaquetas/ml (Figura 16).

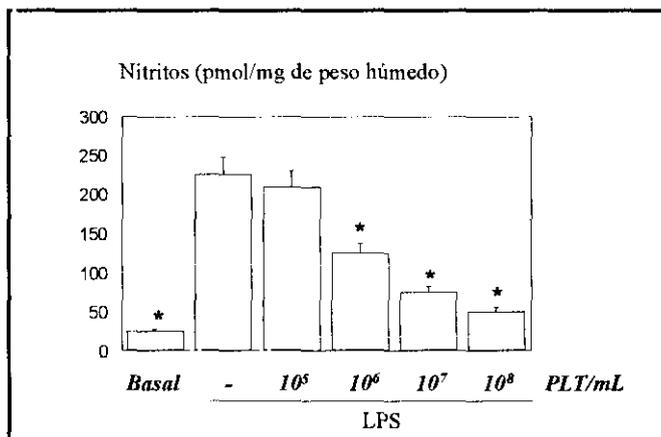


Figura 16. Producción de nitritos en carótidas desendotelizadas in vitro, en cultivo con cantidades crecientes de plaquetas activadas con colágeno (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). La liberación de nitritos estaba estimulada por LPS (10 ng/mL). Los resultados se expresan como media \pm EEM. * $p < 0.05$ con respecto a las arterias incubadas con LPS en ausencia de plaquetas.

4.2. Efecto de las plaquetas activadas sobre la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en segmentos arteriales.

Con respecto a la expresión de la NOSi, en condiciones basales los segmentos arteriales tenían una mínima expresión, que aumentó significativamente en presencia de LPS. Cuando se incubaron con cantidades crecientes de plaquetas (de 10^5 a 10^8 plaquetas/ml), activadas con colágeno se observó una disminución en la expresión de la NOSi inducida por el LPS, concentración dependiente (Figura 17.a y 17.b).

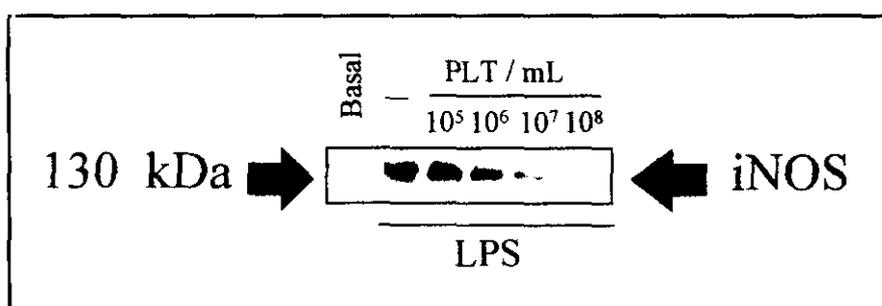
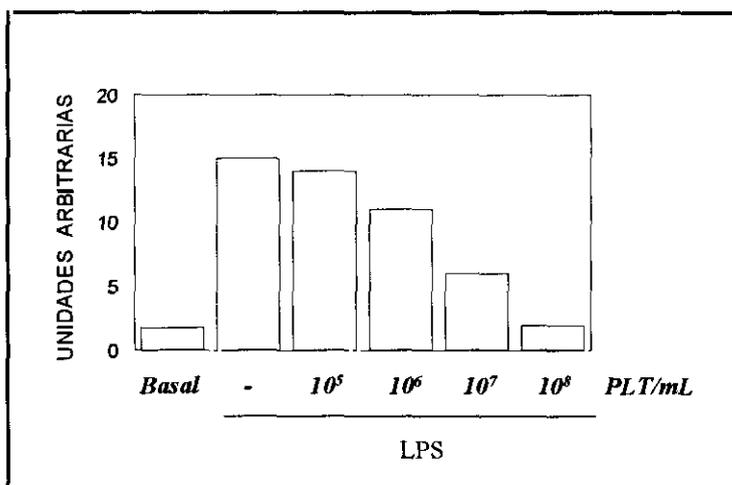


Figura 17.a. Western blot representativo mostrando la expresión de la NOSi en carótidas desendotelizadas de rata estimuladas con LPS (10 ng/mL), en ausencia o en presencia de cantidades crecientes de plaquetas activadas con colágeno (20 μ g/mL).

Figura 17.b. Análisis densitométrico del Western blot.



También se observó que en ausencia de plaquetas, la adición de colágeno (20 $\mu\text{g/mL}$) no modificaba la expresión de la NOSi inducida por LPS en los segmentos desendotelizados; de la misma forma que las plaquetas no estimuladas tampoco variaban la expresión de la NOSi (Figura 18.a y 18.b).

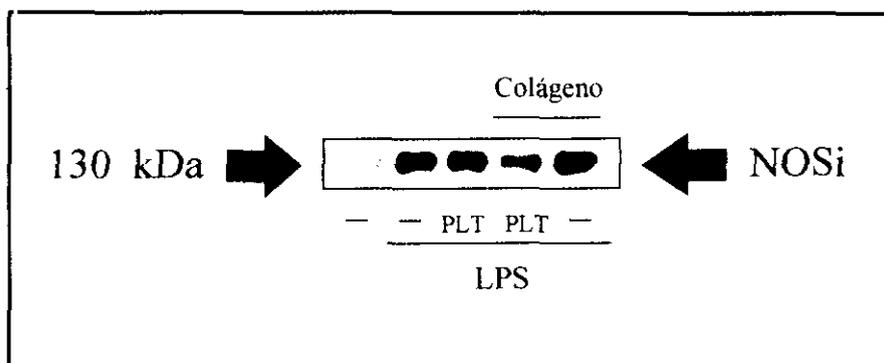
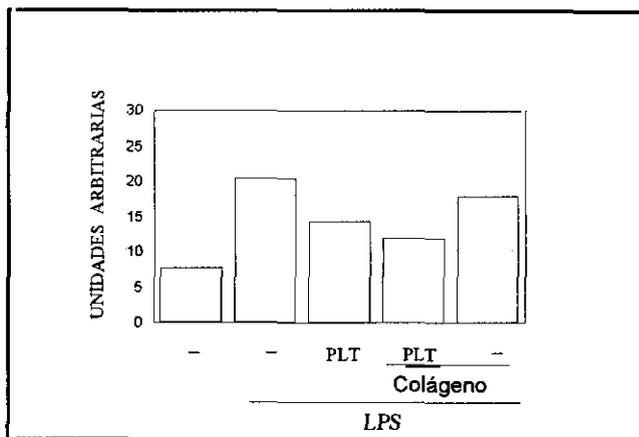


Figura 18.a. Western blot representativo mostrando la expresión de la NOSi en carótidas desendotelizadas de rata estimuladas con LPS (10 ng/mL), en ausencia o en presencia de plaquetas (10^6 plaquetas/mL), estimuladas o no con colágeno (20 $\mu\text{g/mL}$).

Figura 18.b. Análisis densitométrico del Western blot.



4.3. Efecto del factor de crecimiento derivado de las plaquetas en la producción de nitritos en segmentos arteriales desendotelizadas in vitro.

Para comprender el mecanismo por el cual las plaquetas activadas con colágeno reducían la eficacia del LPS en la estimulación de la liberación de nitritos y en la expresión de la NOSi, se usó un anticuerpo policlonal frente al factor del crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF). La hipótesis para trabajar con este anticuerpo está basada en el hecho de que es capaz de inhibir la expresión de la NOSi en un cultivo de CMLV ^(150,95).

La adición del anticuerpo anti-PDGF ($6,7 \times 10^{-8}$ mol/L) a los cocultivos de plaquetas estimuladas con colágeno y arterias desendotelizadas revirtió parcialmente la inhibición de las plaquetas en la liberación de nitritos inducida por el LPS. Este efecto no se observó cuando se usó una IgG no específica ($6,7 \times 10^{-8}$ mol/L) (Tabla 6).

Tabla 6. Efecto del anticuerpo anti-PDGF en la liberación de nitritos producidos por segmentos arteriales desendotelizados y coincubados con plaquetas.

| | Producción de Nitritos (pmol/mg peso húmedo) |
|-----------------------|---|
| LPS | 222 ± 10 |
| LPS + PLT | 44 ± 9 * |
| LPS + PLT + anti-PDGF | 162 ± 6 |
| LPS + PLT + IgG | 42 ± 9 * |

Las carótidas desendotelizadas in vitro se coincubaron en presencia o en ausencia de plaquetas (10^8 plaquetas/ mL) activadas con colágeno (20 µg/mL), y se añadió un anticuerpo policlonal frente a PDGF ($1,6 \times 10^{-8}$ mol/L). La liberación de nitritos estaba estimulada por LPS (10 ng/mL). Los resultados se expresan como media ± EEM (n=6). *p<0.05 con respecto a las arterias incubadas con LPS en ausencia de plaquetas.

4.4. Efecto del factor de crecimiento derivado de las plaquetas en la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en segmentos arteriales desendotelizados in vitro.

Resultados similares a los encontrados en cuanto a la producción de nitritos se obtienen cuando se analiza la expresión de la NOSi en presencia de anti-PDGF, observándose que la inhibición en la expresión de la NOSi por parte de las plaquetas activadas con colágeno fue parcialmente revertida por este anticuerpo (Figura 19.a y 19.b). Este efecto no se observó con una IgG no específica.

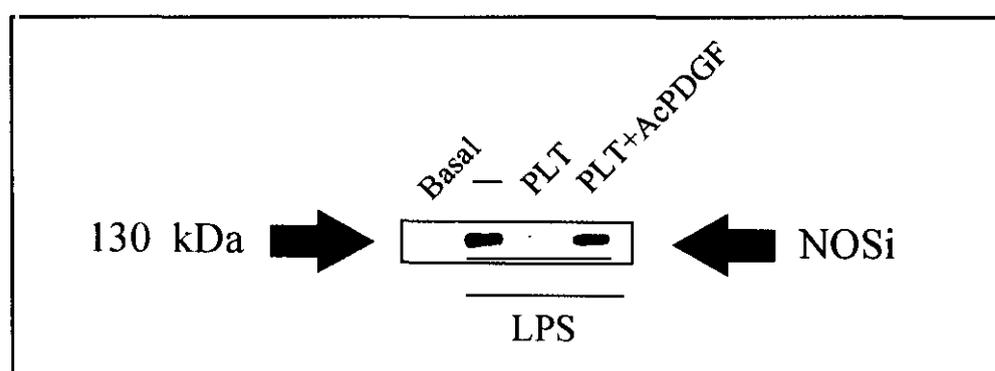


Figura 19.a. Western blot representativo mostrando la expresión de la NOSi en carótidas desendotelizadas incubadas con o sin LPS (10 ng/mL) durante 18 horas, y en presencia de plaquetas activadas con colágeno (20 $\mu\text{g/mL}$). También se puede observar el efecto del anticuerpo frente a PDGF ($6,7 \times 10^{-8}$ mol/L).

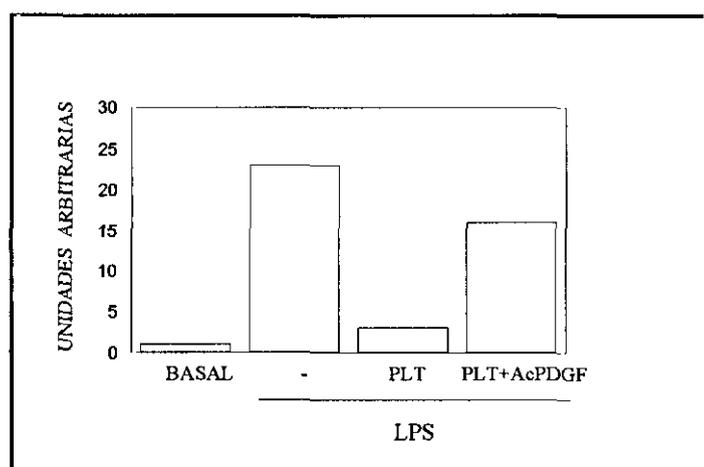


Figura 19.b. Análisis densitométrico del Western blot.

La eficacia del anticuerpo policlonal para bloquear la actividad del PDGF se confirmó por su habilidad para revertir la inhibición en la producción de nitritos estimulada por la adición de PDGF exógeno (4×10^{-10} mol/L), en carótidas desendotelizadas estimuladas con LPS (Tabla 7).

Tabla 7. Efecto del PDGF exógeno en la liberación de nitritos producidos por segmentos arteriales desendotelizados estimulados con LPS.

| | Producción de Nitritos (pmol/mg peso húmedo) |
|------------------------|---|
| LPS | 220 ± 9 |
| LPS + PDGF | 32 ± 6 * |
| LPS + PDGF + anti-PDGF | 193 ± 10 |
| LPS + PDGF + IgG | 30 ± 6 * |

Los segmentos arteriales desendotelizados fueron incubados con LPS (10ng/mL) durante 18 horas, en presencia o en ausencia de PDGF (4×10^{-10} mol/L). El efecto del PDGF se revirtió al añadir anti-PDGF ($1,6 \times 10^{-8}$ mol/L). El efecto de una IgG no específica también se observó en el experimento ($1,6 \times 10^{-8}$ mol/L). Los resultados se expresan como media ± EEM. * $p < 0,05$ con respecto a los segmentos arteriales desendotelizados estimulados con LPS.

4.5. Efecto de las plaquetas en la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible después de la denudación in vivo.

Puesto que in vitro los resultados sugieren que las plaquetas activadas inhiben la expresión de la NOSi en la pared del vaso, examinamos si la plaquetas podrían ser responsables de la ligera expresión de la NOSi en las primeras horas después de la denudación endotelial, pues es cuando se produce la activación plaquetaria.

Por este motivo, nos planteamos obtener ratas trombocitopénicas, realizarles la angioplastia y comparalas con ratas normales. Se preparó una IgG de un conejo inmunizado con

plaquetas de rata, usando ácido caprílico para precipitar todos los componentes del plasma menos la correspondiente IgG, como describió Merhi y cols ⁽¹⁰⁷⁾. También se preparó de la misma forma una IgG control de un conejo no inmunizado. Posteriormente, a las ratas Wistar se les inyectó una IgG antiplaquetas, que denominamos acAP (anticuerpo antiplaquetas), o una IgG control, ambas en una dosis de 30 mg/100 g de peso, 24 horas antes de la denudación endotelial. Esta dosis de acAP producía una severa trombocitopenia con cantidades de plaquetas menores de 10000 por mm³ en 24 horas.

Después de este tiempo se obtuvo la arteria a las 6, 24 y 48 horas después de realizada la denudación endotelial de la carótida izquierda de las ratas tratadas con el acAP, o de las ratas tratadas con la IgG control. Se observó que las carótidas de las ratas tratadas con el acAP mostraban un aumento de la expresión de la NOSi tanto a las 6 como a las 24 y a las 48 horas, mientras que a estos mismos tiempos las carótidas de las ratas tratadas con la IgG no específica mostraban solamente una ligera expresión de la NOSi. Dentro del grupo de ratas tratadas con el anticuerpo acAP, la expresión de la NOSi fue más evidente a las 24 y a las 48 horas después de realizada la denudación endotelial que a las 6 horas (Figura 20.a y 20.b).

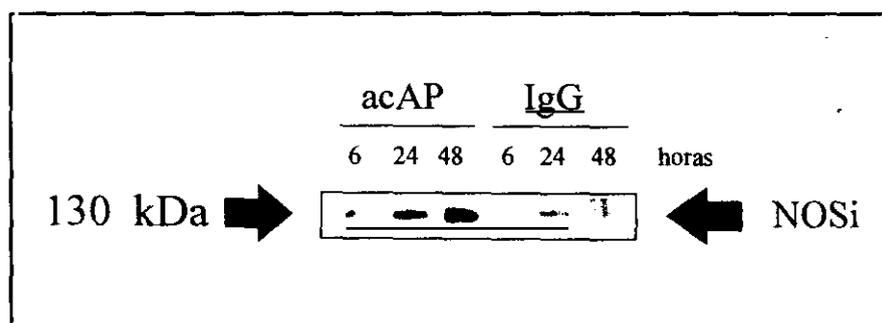
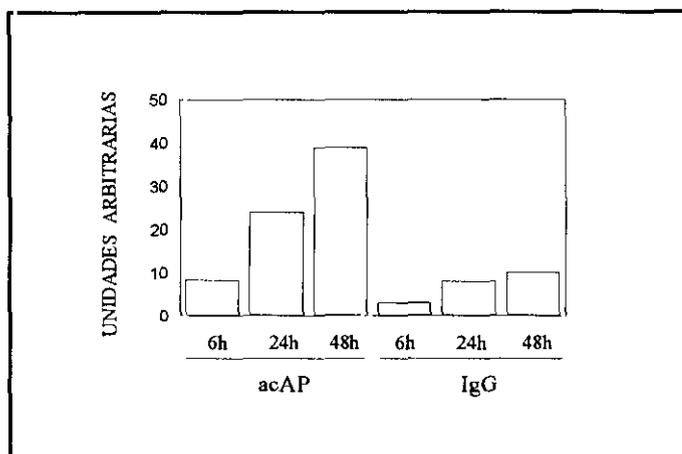


Figura 20.a. Western blot representativo mostrando la expresión de la NOSi a las 6, 24 y 48 horas después de producido el daño. A las ratas se les inyectó una IgG anti-plaquetas (acAP) o una IgG control antes de la intervención.

Figura 20.b. Análisis densitométrico del Western blot.



La especificidad del anticuerpo acAP se examinó, además de por la evidente trombocitopenia, por su incapacidad para reducir el número de leucocitos circulantes, siendo este similar en ratas desendotelizadas tratadas con el acAP y en ratas desendotelizadas tratadas con una IgG (Tabla 8). Además, los niveles plasmáticos de TNF- α fueron iguales tanto en el grupo tratado con la IgG como en el grupo tratado con el anticuerpo, y ambos eran superiores a los encontrados en el grupo de ratas no angioplastiadas (Tabla 8).

Tabla 8. Efecto del acAP en el número de leucocitos circulantes y en los niveles plasmáticos de TNF- α .

| | Número de Leucocitos ($10^3/\text{mm}^3$) | TNF- α (pg/mL) |
|-------------------------|--|--------------------------|
| Ratas tratadas con acAP | 1.4 ± 0.5 | 11 ± 3 |
| Ratas tratadas con IgG | 1.4 ± 3 | 13 ± 4 |

El número de leucocitos y los niveles de TNF- α fueron determinados 24 horas después de la denudación endotelial. No se encontraron diferencias en los niveles de los leucocitos circulantes y del TNF- α entre las ratas angioplastiadas tratadas con el acAP o las ratas angioplastiadas tratadas con la IgG. Los resultados están representados como media \pm EEM de 6 animales diferentes.

4.6 Efecto del bloqueo de la glicoproteína IIb/IIIa en la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible después de la denudación endotelial.

Para determinar cómo las plaquetas producían una disminución en la expresión de la NOSi, recurrimos a bloquear el receptor de la glicoproteína IIb/IIIa. El bloqueo del receptor GP IIb/IIIa con el c7E3 Fab aumentó la expresión de la NOSi, después de producido el daño. En contraste, el tratamiento con una IgG no específica no modificó la expresión de la NOSi, 24 horas después de realizada la denudación endotelial, al compararla con la expresión observada en ratas no tratadas con el c7E3 Fab (Figura 21.a y 21.b).

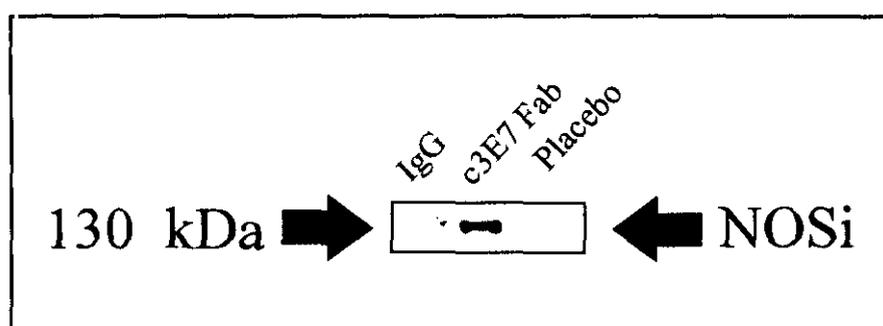


Figura 21.a. Western blot representativo mostrando la expresión de la NOSi, 24 horas después de realizada la denudación endotelial en ratas tratadas con c7E3 Fab.

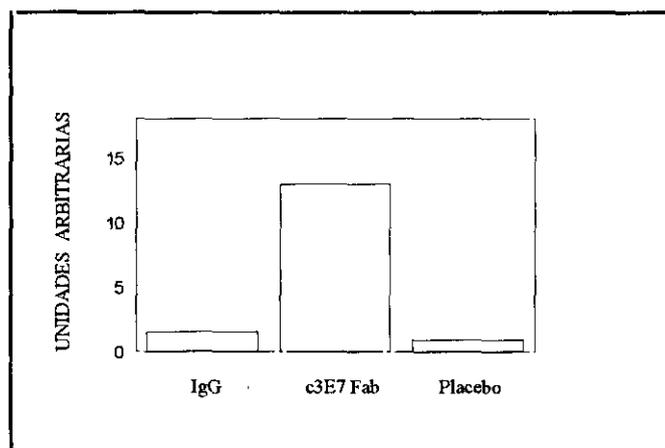


Figura 21.b. Análisis densitométrico del Western blot.

El efecto antiagregante producido por el bloqueo del receptor GP IIb/IIIa con el c7E3 Fab se comprobó por agregometría, ya que después del tratamiento se observó una disminución de la agregación plaquetaria en respuesta al ADP (% de transmisión de luz, 50 ± 2 para ratas tratadas con la IgG; y 7 ± 3 para ratas tratadas con el c7E3 Fab, $n=6$, $p<0,01$).

4.7. Efecto del bloqueo del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas en la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible después de la denudación endotelial.

Para ver si el efecto del PDGF sobre la expresión de la NOSi, que observamos *in vitro* en segmentos arteriales, se repetía en nuestro modelo *in vivo*, recurrimos a bloquear el receptor del PDGF mediante el Trapidil. El bloqueo del receptor del PDGF producía un aumento en la expresión de la NOSi, 24 horas después de realizada la denudación endotelial, al compararla con la expresión observada en ratas no tratadas (Figura 22.a y 22.b).

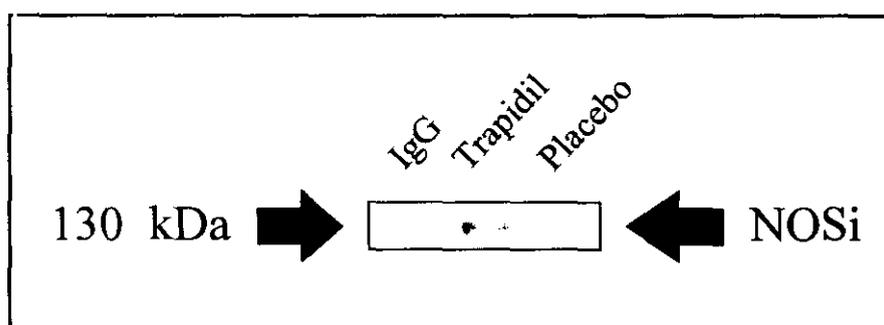
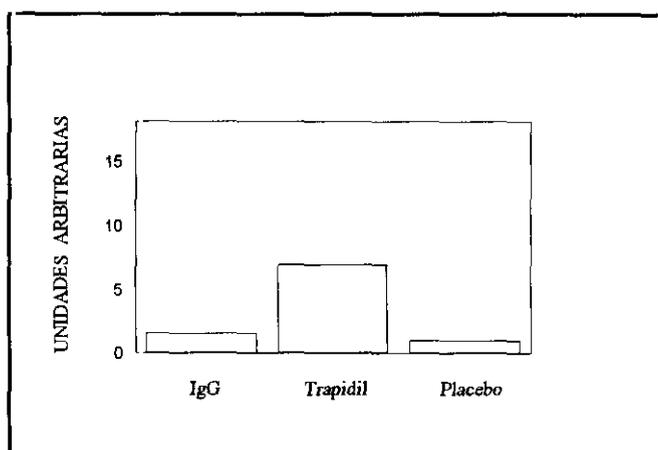


Figura 22.a. Western blot representativo mostrando la expresión de la NOSi, 24 horas después de realizada la denudación endotelial en ratas tratadas con Trapidil.

Figura 22.b. Análisis densitométrico del Western blot.



DISCUSSION

Esta tesis muestra la importancia de las CE y las plaquetas en la expresión de la isoforma NOSi por parte de las CMLV. Se describen, además, una serie de hallazgos originales sobre un proceso patológico concreto, como es la angioplastia, en donde hay CMLV pero no CE, y en donde se encontró la inducción tardía de la expresión de la NOSi en la pared, siendo regulada la expresión de la esta enzima por las plaquetas activadas.

En los estudios experimentales realizados in vitro, tanto con segmentos arteriales aislados como utilizando cocultivo de CE y CMLV, observamos que el endotelio tiene un efecto inhibitorio sobre la expresión de la NOSi y la liberación de NO por las CMLV. Sin embargo, en un modelo in vivo de desendotelización mediante balón de angioplastia, la NOSi no aparece hasta el séptimo día después de realizada la intervención. Los procesos que se originan después de realizada la denudación endotelial están muy ordenados en el tiempo, existiendo en los primeros momentos un proceso trombótico que es dependiente de la activación plaquetaria. Por todo lo anterior, en esta tesis nos planteamos estudiar qué papel podían jugar las plaquetas activadas sobre la inhibición de la expresión de la NOSi en los primeros momentos después de realizada la denudación endotelial.

1. Papel del endotelio en la regulación de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en células de músculo liso vascular.

Para analizar el efecto del endotelio sobre la expresión de la NOSi en las CMLV de la pared vascular, se realizaron estudios utilizando dos modelos experimentales diferentes. En primer lugar se utilizaron segmentos de aorta de ratas Wistar. En condiciones basales, es decir en ausencia de endotoxina, se observó una pequeña expresión de la NOSi en los segmentos aorticos, tanto en presencia como en ausencia de endotelio. Esta leve expresión de la NOSi en ausencia de LPS podría ser debida a diversos agentes presentes en cantidades mínimas en el suero de ternera fetal (FCS), como por ejemplo algunas citoquinas, ya que los experimentos se realizaban con un medio de incubación que contiene antibióticos, por lo que en principio habría que descartar la

presencia de factores que puedan facilitar la expresión de la NOSi. En este sentido, en los segmentos arteriales que no habían sido incubados en medio con FCS no se observó esta leve expresión de la NOSi (datos no mostrados). Por lo tanto, no podemos excluir la posibilidad de que en estos estudios realizados in vitro, la expresión de la NOSi pueda haberse inducido por el efecto *sinérgico* entre el LPS y algunas citoquinas presentes en el FCS en cantidades pequeñas. Cuando los segmentos arteriales se incubaron en presencia de LPS, se observó un aumento significativo en la expresión de la NOSi con respecto a los niveles basales, y esta expresión era mayor en ausencia que en presencia de endotelio. Este fue el primer indicio que nos hizo pensar que el endotelio vascular podría modular la expresión de la NOSi en la pared vascular. Por lo tanto, se realizaron nuevos experimentos utilizando un sistema de cocultivo de CE y CMLV.

Este sistema de cocultivo nos permitió analizar más específicamente la interacción entre la CE y la CMLV, debido a dos importantes características del sistema: a) permite el procesamiento independiente de cada tipo celular, y b) en este sistema, ambos tipos de células comparten el medio, por lo que es posible un intercambio de factores sin que exista contacto físico entre CE y CMLV.

En condiciones basales, la expresión de la NOSi era pequeña tanto en el monocultivo de CMLV como cuando estaban presentes las CE. Sin embargo, cuando al medio de incubación se añadió LPS, se observó que la expresión de la NOSi era significativamente mayor en las CMLV cuando no estaban presentes las CE que cuando se cocultivaban con ellas.

Una vez que los resultados obtenidos indicaron que la presencia de endotelio, tanto en los segmentos aórticos como en el sistema de cocultivo, inhibía la expresión de la NOSi en las CMLV de la pared vascular nos planteamos estudiar lo que ocurriría en un sistema in vivo de denudación endotelial, y para analizar este fenómeno utilizamos el modelo de denudación endotelial por balón de angioplastia, con el que se consigue una denudación endotelial total del vaso, y en donde hay un aumento de citoquinas, condición indispensable para que se estimule la expresión de la NOSi.

2. La óxido nítrico sintasa inducible se expresa en el vaso varios días después de realizada la denudación endotelial.

El modelo más utilizado para observar la respuesta a la lesión por balones el de carótida de rata. Por lo tanto, utilizamos este modelo de lesión en la carótida de la rata porque se trata de un vaso muy simple, constituido prácticamente por endotelio y media. En condiciones normales no existe íntima ni penetración del vasa vasorum en la media. Además, en la rata, la formación de neoíntima es un proceso muy simple, en el que participan sólo la pared lesionada y las plaquetas^(22,22). En este modelo, en el lugar de la lesión no se va a encontrar fibrina ni tampoco leucocitos.

Tras la denudación endotelial con balón de angioplastia, se observó que la expresión de la NOSi aparece en la pared arterial varios días después de realizada la denudación, mientras que en los primeros momentos (6-48 horas), la expresión es muy pequeña.

En estudios previos realizados por Hansson y cols, en carótidas de rata, se observó que la expresión de la NOSi era inducida rápidamente después de realizado el daño en la pared arterial⁽⁵²⁾. Después de la denudación endotelial, las células sanguíneas circulantes se activan y son reclutadas en el sitio dañado, donde comienzan a liberar diferentes mediadores inflamatorios, incluyendo citoquinas⁽¹⁵⁷⁾. Por otra parte, las CMLV afectadas pueden ser también una fuente de citoquinas, con lo que en el ambiente vascular va a existir una gran concentración de citoquinas que van a ser capaces de estimular la expresión de la NOSi^(149,169).

Por otro lado, el promotor del gen de la NOSi tiene un elemento de respuesta a variaciones del flujo sanguíneo, que podría ser estimulado después de dañar al vaso⁽¹²²⁾. Teniendo en cuenta todos estos datos, en los primeros tiempos después de realizada la angioplastia hubieramos esperado encontrar una cierta expresión de la NOSi. Sin embargo, y sorprendentemente, nosotros observamos que la expresión de la NOSi durante las primeras 48 horas después de la denudación endotelial era pequeña.

La aparición de la expresión y de la actividad de la NOSi, tanto *in vivo* como *in vitro*, en los estudios previamente publicados por otros autores ^(52,74) podría ser debida a la presencia de endotoxemia después de la intervención quirúrgica o a endotoxinas contenidas en el medio de incubación, pues estos autores no mencionan el uso de ningún tratamiento antibacteriano. En nuestro estudio, las ratas recibieron un tratamiento profiláctico con antibióticos y, de esta forma quedaba descartada la posible presencia de NOSi debida a una cierta endotoxemia.

Hay dos evidencias indirectas que apoyan nuestra observación de que existe una menor expresión de la NOSi en los primeros tiempos después de realizada la angioplastia. Por un lado, autores como Dzau y cols. Demostraron recientemente que la transfección *in vivo* del cDNA de la isoforma NOSe, justo después de la denudación endotelial producida por balón, redujo el crecimiento neointimal hasta en un 70% ⁽¹⁶⁷⁾. Lógicamente, la liberación de NO por parte de la NOSe no sería necesaria si existiera una cierta expresión de la NOSi, ya que esta genera mayores cantidades de NO que las producidas por la actividad de la NOSe, por lo que indirectamente los hallazgos de Dzau y cols apoyan nuestros resultados.

Por otro lado, otros autores como Watkins y cols bloqueando la producción de NO endógeno, mediante el uso de un antagonista de la L-arginina, inmediatamente después de la denudación endotelial, observaron que no se modificaba el engrosamiento neointimal ⁽¹⁷¹⁾, lo que puede deberse a que al no existir actividad NOS inmediatamente después de la desendotelización, como indican los resultados de esta tesis, no existiría probabilidad de que el bloqueo de su generación se reflejara en modificaciones de los mecanismos involucrados en el crecimiento de la neointima.

Inmediatamente después de producida la lesión, se podría esperar una respuesta de “reparación del daño”, con un aumento generalizado de la expresión de todas las proteínas de la pared arterial. La pequeña expresión de la NOSi en los primeros momentos después de realizada la denudación estaría en contra de esta última consideración teórica.

En nuestro estudio comprobamos que otras proteínas de la pared arterial, como la enzima de conversión de angiotensina I (ECA), cuyo ARNm se ha demostrado que aumenta desde los primeros momentos hasta varios días después de dañado el vaso, tenía una expresión aumentada en las 48 horas siguientes a la denudación endotelial ⁽³⁴⁾. En nuestro modelo comprobamos que existía una expresión elevada de la ECA tanto a las 48 horas como a los 7 días después de la lesión. Esto apoyaba el hecho de que los niveles en la expresión de la NOSi, tanto a tiempos cortos como a tiempos largos después de la angioplastia fueran independientes del contenido proteico global. Si hipotéticamente existiera una síntesis proteica mayor en los primeros momentos después de la denudación endotelial, y esto diluyera las proteínas expresadas en la pared dañada, encontraríamos una disminución de cualquier proteína que se intentara detectar en los primeros momentos después de la angioplastia. Sin embargo, podemos descartar esta hipótesis ya que la cantidad de ECA detectada no se vio modificada entre las 48 horas y los 7 días.

La identificación de las células que expresan la NOSi en la pared del vaso angioplastiado, está fuera de los objetivos de esta tesis. Sin embargo, tanto los macrófagos infiltrados en la pared vascular como las CMLV podrían expresar la NOSi ^(95,120). Experimentos preliminares que no se muestran en esta tesis, parecen no obstante indicar que es en la CMLV donde se expresa la NOSi.

Como en nuestros experimentos habíamos observado un aumento en la expresión de la NOSi varios días después de la denudación endotelial, nos preguntamos por qué existe una expresión pequeña de la NOSi en los primeros momentos después de realizada la desendotelización del vaso.

3. Papel de las plaquetas en la regulación de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible.

La alteración de la integridad endotelial en los vasos sanguíneos produce una rápida activación de las plaquetas. Se ha demostrado que la denudación endotelial producida por balón estimula la adhesión y la agregación plaquetarias en tan sólo unos minutos ^(138,170), y que sin embargo, las plaquetas desaparecen de la superficie arterial unos días después del daño ⁽¹⁷⁶⁾.

Por otro lado, en estudios *in vitro* se ha demostrado que la expresión de la NOSi está regulada por varios factores de crecimiento, como el PDGF, que es liberado por las plaquetas activadas ^(154,150). Por todo esto, en la segunda parte de esta tesis nos propusimos analizar si las plaquetas activadas podrían estar implicadas en la pequeña expresión de la NOSi observada en los primeros momentos después de realizada la angioplastia.

Para comprobar esta hipótesis, realizamos varios tipos de experimentos. En primer lugar, comprobamos *in vitro* si las plaquetas activadas con colágeno regulaban la expresión de la NOSi en los segmentos desendotelizados. Observamos que la incubación de segmentos arteriales desendotelizados y estimulados con LPS, con cantidades crecientes de plaquetas activadas con colágeno inhibían la expresión de la NOSi y la producción de nitritos de forma mayor cuanto mayor era el número de plaquetas añadidas. Sin embargo, esto no ocurría con las plaquetas no activadas. De estos experimentos se puede deducir que las plaquetas activadas con colágeno inhibían la expresión de la NOSi en la pared vascular desendotelizada.

En segundo lugar, analizamos si las plaquetas regulaban *in vivo* la expresión de la NOSi, y para esto se realizó la angioplastia en ratas a las que se las había hecho deficientes en plaquetas mediante la administración de un anticuerpo anti-plaquetas (acAP). Al hacer la denudación endotelial en estas ratas trombocitopénicas se observó un aumento en la expresión de la NOSi en los primeros tiempos después de producido el daño.

Una consecuencia de la eliminación de las plaquetas utilizando el acAP podía ser la afectación de otros elementos celulares de la sangre, además de las plaquetas, y en concreto, los leucocitos. De tal forma que la estimulación de los leucocitos induciría la posible liberación de cantidades elevadas de citoquinas que favorecieran la expresión de la NOSi en los primeros momentos después de realizada la angioplastia. Esta hipótesis fue descartada pues los niveles de TNF- α circulantes, una citoquina liberada por los leucocitos ⁽¹⁰⁸⁾, no era diferente en las ratas tratadas con el acAP o en las ratas tratadas con una IgG no específica. Además, el número de leucocitos no se modificó por el tratamiento con el acAP. En este sentido, la ausencia de

plaquetas, más que aumentar la activación leucocitaria podría disminuirla, ya que Neumann y cols han demostrado que las plaquetas activadas favorecen la producción de citoquinas, por parte de los leucocitos ⁽¹¹⁸⁾.

El hecho de que la expresión de la NOSi sea evidente en la pared arterial dañada entre los 7 y los 30 días después de la denudación endotelial podría explicarse por el hecho de que las plaquetas desaparecen de la superficie arterial unos cuantos días después del daño ⁽¹⁷⁶⁾. Además, las diferentes células activadas presentes en la pared dañada podrían a sus tiempos liberar citoquinas que podrían reducir, a su vez, los potenciales efectos inhibitorios de otros factores en la expresión de la NOSi.

4. Papel del PDGF en la inhibición de las plaquetas activadas sobre la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible.

Como vimos que las plaquetas activadas, tanto *in vitro* como *in vivo*, inhibían la expresión de la NOSi y la producción de nitritos, nuestro siguiente objetivo fue estudiar algún factor que fuese responsable de esta inhibición. Y en concreto nos propusimos estudiar el PDGF, que es un factor liberado por las plaquetas activadas, aunque también puede ser liberado por el endotelio, la CMLV y los macrófagos. El PDGF es un potente quimioattractante de CMLV y un potente mitógeno. Y además, Ferns y col demostraron que el PDGF estaba implicado en la acumulación neointimal de las CMLV asociada a la angioplastia ⁽³⁵⁾.

La presencia de un anticuerpo frente al PDGF en el medio de cultivo de las plaquetas activadas con los segmentos arteriales desendotelizados, reducía parcialmente la capacidad de las plaquetas de inhibir la expresión de la NOSi, sugiriendo la implicación de este factor de crecimiento en el efecto de las plaquetas. Cuando se añadió una concentración elevada de PDGF exógeno (4×10^{-10} mol/L) al medio de cultivo de las aortas desendotelizadas, se vió que se producía una inhibición en la producción de NO. En este sentido, Durante y cols ya habían demostrado que el PDGF liberado por las plaquetas activadas inhibía la expresión de la NOSi en CMLV en cultivo ⁽³⁰⁾.

Las concentraciones de anticuerpo frente al PDGF fueron suficientes para revertir el efecto inhibitorio del PDGF exógeno en la producción de nitritos liberados por la arteria desendotelizada estimulada con LPS, no obstante el anticuerpo anti-PDGF sólo consiguió revertir parcialmente la inhibición de la expresión de la NOSi cuando estaban presentes las plaquetas activadas. Este resultado sugeriría que el PDGF no es el único factor a través del cual las plaquetas activadas modulan la expresión de NOSi en la pared vascular. En este sentido, otros factores liberados por las plaquetas como puedan ser el TGF- β o el factor de crecimiento de fibroblastos también han mostrado capacidad para inhibir la expresión de la NOSi en la CMLV (147, 149).

Esta hipótesis se vió reforzada en los estudios realizados in vivo con un antagonista del receptor del PDGF, trapidil⁽⁹⁷⁾, con el que se observó un aumento parcial de la expresión de la NOSi en los primeros tiempos después de realizada la angioplastia.

Por lo tanto, deben existir otros agentes derivados de las plaquetas, además del PDGF, que estarían implicados en la modulación de la expresión de la NOSi.

5. Estudio del GP IIb/IIIa plaquetario.

La activación de las plaquetas produce una mayor exposición y una mayor activación de los receptores GP IIb/IIIa de la superficie plaquetaria. Los receptores GP IIb/IIIa son los mediadores claves para la adhesión y la agregación al vaso dañado⁽²³⁾. En la última parte de esta tesis nos planteamos examinar si el bloqueo in vivo de los receptores GP IIb/IIIa de la plaqueta favorecería la expresión de la NOSi en los primeros tiempos después de la denudación endotelial. Observamos que el bloqueo de los receptores GP IIb/IIIa por el c3E7 Fab, estimulaba la expresión de la NOSi en las arterias desendotelizadas por balón. La capacidad del c3E7 Fab para bloquear la activación plaquetaria se demostró por los experimentos de agregación ex vivo. Con estos experimentos se apoya la implicación directa de las plaquetas activadas en la inhibición de la expresión de la NOSi, inmediatamente después de la angioplastia.

Autores como el grupo de investigación EPIC (Evaluation of c3E7 in Preventing Ischemic Complications) evaluaron el efecto del c3E7 en pacientes sometidos a una angioplastia y con alto riesgo de complicaciones isquémicas. Estos pacientes recibían un bolo y una infusión del anticuerpo de forma que se bloqueaban los receptores GPIIb/IIIa. En estos estudios se observó que las complicaciones isquémicas derivadas de la angioplastia quedaban reducidas, aunque el riesgo de sangrado era mayor ⁽³²⁾.

Por otra parte, Kaida y cols. utilizando un antagonista del GP I Ib/IIIa (FK633) evaluaron la formación neointimal a las 2 semanas de realizada una denudación endotelial en carótida de hamster, y observaron que la infusión del antagonista reducía significativamente el engrosamiento neointimal ⁽⁷⁶⁾.

Con estos precedentes y teniendo en cuenta nuestros resultados podemos especular que la estimulación de la expresión de la NOSi tras denudación endotelial, mediante el bloqueo de los receptores GP I Ib/IIIa podría intervenir en la capacidad antitrombótica y en la reducción del evento cardiovascular isquémico demostrado en el estudio EPIC.

De igual forma, en la reducción en el engrosamiento neointimal encontrado por Kaida y cols, tras administrar un antagonista del GP I Ib/IIIa, podría ser importante la mayor capacidad de la pared vascular para generar NO, al inhibir la actividad plaquetaria. En este sentido hay que recordar una vez más que el NO es un potente inhibidor de la proliferación de las CMLV y de la generación de proteínas de la matriz extracelular. No obstante, serán necesarios experimentos específicos en los que se administre el anticuerpo anti GP I Ib/IIIa y se bloquee la capacidad de la pared vascular de generar NO, mediante el empleo de antagonistas de la L-arginina con el fin de determinar el papel del NO en los efectos de los inhibidores del GP I Ib/IIIa sobre estos mecanismos.

En esta tesis quedan pendientes distintas preguntas por resolver. Una de ellas es si para inhibir el efecto de las plaquetas activadas sobre la modulación de la expresión de la NOSi en la pared vascular dañada es necesario inhibir la adhesión o la agregación plaquetaria. En este sentido,

se han realizado algunos experimentos en nuestro laboratorio inhibiéndose otro mecanismo de adhesión, el de la interacción de la GP Ib expresada en la plaqueta activada, con el factor von Willebrand. La GP Ib participa en el proceso de adhesión de las plaquetas a la pared vascular y no en el proceso de interacción plaqueta-plaqueta, la inhibición de la interacción GP Ib-von Willebrand mediante la infusión del ácido aurín-tricarboxílico en animales a los que se les desendotelizó la carótida izquierda por balón de angioplastia, estimuló la expresión de la NOSi en los primeros momentos tras la denudación del endotelio, indicando la importancia de la adhesión plaquetaria sobre la inhibición que ejercen estas células sobre la expresión de la NOSi en la pared vascular.

6. Significado fisiopatológico de los resultados obtenidos.

En esta tesis nos hemos centrado en un caso concreto de daño de la capa endotelial como es la angioplastia por balón, pero también en otros procesos, como en la placa de ateroma de la aterosclerosis o incluso en el infarto de miocardio, existe un daño en la monocapa de CE que provoca el reclutamiento y la activación de células sanguíneas como plaquetas, neutrófilos y monocitos ⁽¹⁵²⁾. La estimulación de los leucocitos induce la liberación de distintos mediadores, responsables de la respuesta inflamatoria, tales como radicales libres, proteasas, factores de crecimiento y citoquinas. Estos mediadores inflamatorios pueden estimular a su vez la producción de nuevas citoquinas en la pared vascular, alcanzándose niveles elevados locales de las mismas.

Estas citoquinas, a su vez, son capaces de estimular la expresión de la NOSi en CMLV ^(73, 13,146), y por tanto, la liberación de grandes cantidades de NO desde estas células. Además, los factores de crecimiento y las citoquinas liberadas inducen la proliferación y la migración de las CMLV hacia la luz del vaso. De no existir una rápida reendotelización de la lesión, estas CMLV forman fácilmente una nueva neointima de comportamiento anómalo en cuanto a su capacidad antiagregante y en cuanto a la producción de proteínas de matriz, siendo el resultado final de todos estos procesos, en muchos casos, la reoclusión del vaso ⁽¹⁵²⁾. La rápida reendotelización del vaso puede ser el punto clave para impedir el proceso de restenosis, ya que en su estado

fisiológico la CE tiene propiedades inhibitorias sobre la coagulación, la proliferación de CMLV y la agregación plaquetarias ⁽⁷⁰⁾. Muchas de estas propiedades van a ser a su vez reguladas por el NO.

El NO es una molécula que en concentraciones elevadas es citotóxica para las CE ^(92, 121). Por otro lado, el NO es un potente inhibidor de la proliferación de las CMLV y de la síntesis de proteínas de matriz extracelular ⁽⁸⁹⁾, por lo que la liberación local de NO por la actividad NOSi puede potencialmente extender el daño a las CE adyacentes o inhibir su crecimiento, y de este modo interferir con la reendotelización de la arteria desendotelizada. No obstante también hay que tener en cuenta que si después de ocurrir la desendotelización del vaso existiera suficiente producción de NO, se impediría la formación del trombo plaquetario, y además el NO podría inhibir a tiempos más largos la síntesis de proteínas de la matriz extracelular. Por lo tanto, habría que valorar que es más beneficioso para cortar el proceso de la reestenosis, que disminuya la síntesis de proteínas de la matriz extracelular y la proliferación de las CMLV o que se dificulte el proceso de reendotelización. Por lo tanto, serán necesarios estudios futuros para contestar a esta pregunta.

En este sentido, Lee y cols observaron en ratas a las que se les realizaba una denudación endotelial por balón que cuando se administraba una inhalación de NO, se inhibía la formación de neointina ⁽⁹⁰⁾. Con el uso de un dador de NO intravenoso, Langford y cols también observaron que se produce una inhibición en la activación de las plaquetas tras la denudación endotelial, medida como inhibición de la expresión de la P-selectina plaquetaria y de la GP IIb/IIIa ⁽⁸⁸⁾.

En resumen, las carótidas desendotelizadas por balón expresan la NOSi varios días después de realizado el daño, ya que en los primeros momentos las plaquetas activadas juegan un papel clave en la modulación negativa de la expresión de la NOSi (figura 1). En estos primeros momentos, el que la inhibición de la NOSi mediada por las plaquetas sea beneficiosa o perjudicial deberá ser estudiado con más profundidad. Puesto que hemos demostrado que los fármacos que bloquean el receptor GP IIb/IIIa aumentan significativamente la NOSi en los primeros tiempos después de la denudación endotelial, esto podría ser importante para clarificar si parte del efecto

de estos fármacos son debidos a su capacidad para incrementar la expresión de la NOSi.

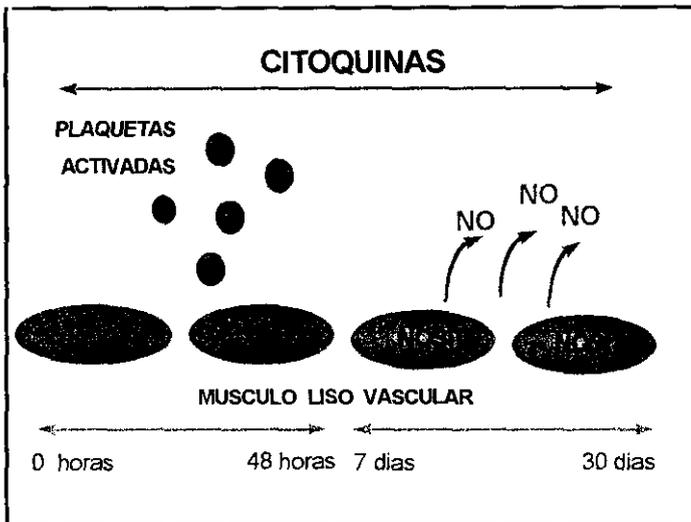


Figura 23.- En esta figura se esquematizan los resultados de esta tesis. Tras la denudación endotelial, las plaquetas activadas inhibirían la expresión de la NOSi. Varios días después de la denudación del endotelio existe una expresión importante de la NOSi.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.- El lipopolisacárido de E. coli induce la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en la pared vascular y en células de músculo liso vascular en cultivo.
- 2.- Las células endoteliales ejercen un efecto inhibitorio sobre la liberación de nitritos y la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en la pared vascular y en células de músculo liso vascular en cultivo estimuladas con lipopolisacárido de E. coli.
- 3.- La óxido nítrico sintasa inducible no se expresa en la carótida de la rata en los primeros momentos después de realizada la denudación endotelial, sin embargo, sí se expresa varios días después.
- 4.- Las plaquetas activadas con colágeno inhiben la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en segmentos arteriales desendotelizados in vitro y estimulados con lipopolisacárido de E coli. Este efecto fue dependiente del número de plaquetas presentes.
- 5.- Las plaquetas inhiben la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en los primeros momentos después de realizada la denudación endotelial in vivo.
- 6.- La glicoproteína IIb/IIIa expresada en las plaquetas participa de forma directa en la inhibición de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en los primeros momentos después de realizada la denudación endotelial in vivo.
- 7.-El factor de crecimiento derivado de las plaquetas es un factor que participa en la inhibición de la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible en los primeros momentos después de realizada la denudación endotelial in vivo, aunque deben existir otros factores liberados por las plaquetas que intervengan en este proceso.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alonso J, Sánchez de Miguel L, Montón M, Casado S, López-Farré A. An endothelial-cytosolic protein binds to the 3'-untranslated region of the endothelial nitric oxide synthase mRNA. Regulation by tumor necrosis factor- α . *Mol Cell Biol* 1997; 17: 5719-5726.
- 2.- Arnal J-F, Yamin J, Dockery S, Garrison D. Regulation of endothelial nitric synthase mRNA, protein, and activity during cell growth. *Am J Physiol* 1994; 36 (Cell Physiol) C1381-C1388.
- 3.- Asakura T, Karino T. Flow patterns and spatial distribution of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Circ Res* 1990; 66 :1045-1066.
- 4.- Badimón L, Badimón JJ: Mechanism of arterial thrombosis in non-parallel streamlines: platelet thrombi grow at the apex of stenotic severely injured vessel wall, experimental study in the pig model. *J Clin Invest* 1989;84:1134-1144.
- 5.- Beck K-F, Mohaupt M, Sterzel RB. Endothelin-1 inhibits cytokine-stimulated transcription of inducible nitric oxide syntase in glomerular mesangial cells. *Kidney Int* 1995; 48:1893-1899.
- 6.- Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 271:C1424-C1437.
- 7.- Berk BC, Alexander RW, Brock TA, Grague E, Gimbrone MA. Angiotensin II-stimulated Na⁺/H⁺ exchange in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1987; 262: 5057-5064.
- 8.- Berrazueta JR, López-Jaramillo P, Moncada S. El óxido nítrico: de vasodilatador endógeno a mediador biológico. *Rev Esp Cardiol* 1990;43:421-431.
- 9.- Bradford MM. A rapid a sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Ann Biochem* 1976;72:248-254.
- 10.-Brenner BM, Troy J, Ballermann BJ. Endothelium-dependent vascular responses: Mediators and mechanisms. *J Clin Invest* 1989;84:1373-1378.
- 11.- Buga GM, Griscavage JM, Rogers NE, Ignarro LK. Negative feedback regulation of endothelial cell function by nitric oxide. *Circ Res* 1993;73:808-812.
- 12.- Busconi L, Michel T. Endothelial nitric oxide syntase. N-terminal myristoylation determines subcellular localization. *J Biol Chem* 1993;268(12):8410-8413.
- 13.- Busse R, Mülsch A. Induction of nitric oxide synthase by cytokines in vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 1990;275:87-90.

14.- Campbell GR, Campbell JH. Smooth muscle phenotypic changes in arterial wall homeostasis; implication for the pathogenesis of atherosclerosis. *Exp Mol Pathol* 1985; 42: 139-162.

15.- Caramelo C, Riesco A, Outeriño J, Millás I, Blum G, Monzú B, Casado V, Sánchez L, Mosquera JR, Casado S, López-Farré A. Effects of nitric oxide on red blood cells: changes in erythrocyte resistance to hypotonic hemolysis and potassium efflux by experimental maneuvers that decrease nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 199:447-454.

16.- Carey DJ. Control of growth and differentiation of vascular cells by extracellular matrix proteins. *Annu Rev Physiol* 1991;53:161-177.

17.- Cercek B, Fishbein MC, Forrester JS, Helfant RH, Fagin JA. Induction of insulin-like growth factor I messenger RNA in rat aorta after balloon denudation. *Cir Res.*1990 ; 66: 1755-1760.

18.- Chandler LJ, Kopnisky K, Richards E, Crews FT, Summers C (1995). Angiotensin II decreases inducible nitric oxide synthase expression in rat astroglial cultures. *Am J Physiol*; 268:C700-C707.

19.- Chatterjee S. Role of oxidized human plasma low density lipoprotein in atherosclerosis: effects on smooth muscle cell proliferation. *Mol Cell biochem* 1992; 111: 143-147.

20.- Chesebro JH, Badimón L y Fuster V (1991). Importance of antithrombin therapy during coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 17: 96B-100B.

21.- Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Mechanisms of stenosis after arterial injury. *Lab Invest* 1983; 49:208-215.

22.- Clowes AW, Clowes MM, Fingerle J, Reidy MA. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. V. Role of acute distention in the induction of smooth muscle proliferation. *Lab Invest* 1989; 60:360-364.

23.- Coller BS, Kutok JL, Scudder LE. Studies of activated GP IIb/IIIa receptors on the luminal surface of adherent platelets. Paradoxical loss of luminal receptors when platelets adhere to high density fibrinogen. *J Clin Invest* 1993; 92: 2796-2806.

24.- Coller BS. The role of platelets in arterial thrombosis and the rationale for blockade of platelet GP IIb-IIIa receptors as antithrombotic therapy. *Eur Heart J* 1995; 16: 11-15.

25.- Corbett JA, Tilton RG, Chang K, Hasan KS, Ido Y, Wang JL, Sweetland MA, Lancaster JR, Williamson JR. Aminoguanidine, a novel inhibitor of nitric oxide formation, prevents diabetic vascular dysfunction. *Diabetes* 1992;41:552-560.

26.- Cushing SD, Borliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parham F, Gerrity R,

Schwartz CJ, Fogelman AM. (1990). Minimally modified low density lipoprotein induce monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 5134-5138.

27.- Ding A, Nathan CF, Graycar J, Denynck R, Stuehr DJ, Srimal S. (1990) Macrophage deactivating factor and transforming growth factors β 1, -2 and 3- inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by interferon-gamma. *J Immunol*;145:940-944.

28.- Dominiczak, Bohr D (1996). Nitric oxide and hypertension in 1995. *Curr Opin Nephrol Hyperten* 5:174-180.

29.- Duguid JB.(1946). Thrombosis as a factor in the pathogenesis of coronary atherosclerosis. *J Pathol Bacteriol* 58:207-212.

30.- Durante W, Schini VB, Kroll MH, Catovsky S, Scott-Burden T, White JG, Vanhoutte PM, Schafer AI (1994). Platelets inhibit the induction of nitric oxide synthesis by interleukin-1 β in vascular smooth muscle cells. *Blood* ;83:1831-1838.

31.- Durante W, Schini VB, Catovsky S, Kroll MN. Vanhoutte PM, Schafer AI (1993). Plasmin potentiates induction of nitric oxide synthesis by interleukin-1 β in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol*;264:H617-H624.

32.- EPIC Investigators. (1994). Use of a monoclonal antibody directed against the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor in high-risk coronary angioplasty. *N Engl J Med* 330: 956-961.

33.- Fawcett Don. *Tratado de histología. Editorial Interamericana. Decimoprimer edición.*

34.- Fernández-Alonso MS, Martorane PA, Licka I, van Even P, Trobisch D, Scholkens BA, Paul M. Early induction of angiotensin I-converting enzyme rat carotid artery after balloon. *Hypertension* 1997; 30: 272-277.

35.- Ferns GAA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* 1991; 253: 1129-1132.

36.- Fingerle J, Johnson R, Clowes AW, Majesky MW, Reidy MA. Role of platelets in smooth muscle cells proliferation and migration after vascular injury in rat carotid artery. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:8412-8416.

37.- Fleming I, Gray GA, Stoclet JC. Influence of the endothelium on induction of the L-arginine nitric oxide pathway in rats aortas. *Am J Physiol* 1993; 264: H1200-H1207.

38.- Flores NA, Sheridan DJ.. The pathophysiological role of platelets during myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res* 1994; 28:295-302.

39.- Förstermann U, Nakane M, Tracey WR, Pollock JS. Isoforms of nitric oxide synthase:

functions in the cardiovascular system. *Eur Heart J* 1993;14(1):10-15.

40.- Förstermann U, Closs EI, Pollock JS, Nakane M, Schwarz P, Gath I, Kleinert H. Nitric oxide synthase isozymes: Characterization, purification, molecular cloning and functions. *Hypertension* 1994;23(part 2):1121-1131.

41.- Fressinaud E, Federici AB, Castaman G. The role of platelet von Willebrand factor in platelet adhesion and thrombus formation: A study of 34 patients with various subtypes of type I von Willebrand disease. *Br J Haematol* 1994; 86:327-332.

42.- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373-376.

43.- Furman MI, Gardner TM, Goldschmidt-Clermont PJ. Mechanisms of cytoskeletal reorganization during platelet activation. *Thromb Haemostasis* 1993; 70: 229-232.

44.- García-Gil C, Cortés M. Comparación de las tendencias de mortalidad por enfermedades isquémicas de corazón y otras enfermedades cardiovasculares entre España y otros países desarrollados 1970-1980. *Med Clin (Barc)* 1989; 93: 790-798.

45.- Garg Uttam C, Hassid Aviv. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989; 83:1774-1777.

46.- Gerlach E, Nees S, Becker B. The vascular endothelium: a survey of some newly involving biochemical and physiological features. *Basic Res Cardiol* 1985; 80:459-474.

47.- Green LC, Wagner DA. Analysis of nitrate, nitrite and (15N) nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126:131-138.

48.- Griffiths MJD, Messent TW, MacAllister M, Evans RJ. Aminoguanidine selectively inhibits inducible nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol* 1993; 110:963-968.

49.- Griscavage JM, Rogers NE, Sherman MP, Ignarro LJ. Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide. *J Immunol* 1993; 151 (No. 11):6329-6337.

50.- Gruetter CA, Gruetter DY, Lyon Je, Kadowitz PF, Ignarro LJ. Relationship between cyclic guanosine 3'-5' monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: effects of methylene blue and methemoglobin. *J Pharmacol Exp Ther* 1981; 219:181-186.

51.- Haas TA and Plow EF. Integrin-ligand interactions: a year in review. *Curr Opin Cell Biol* 1994; 6:656-662.

52.- Hansson G, Geng Y, Holm J, Hardhammar, Wennmalm A, Jennische E. Arterial smooth

muscle cells express nitric oxide synthase in response to endothelial injury. J Exp Med, 1994 180: 733-738.

53.- Harpel PC, Hermann A, Zhang X, Ostfeld I, Borth W. Lipoprotein (a), plasmin modulation and atherogenesis. *Thromb Haemost, 1995; 74(1):382-386.*

54.- Henry Y, Lepoivre M, Drapier J-C, Ducrocq C, Boucher J-L, Guissani A. EPR characterization of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles. *FASEB J 1993; 7:1124-1134.*

55.- Heras M, Chesebro JH, Webster MWI y cols. Hirudin, heparin and placebo during deep arterial injury in the pig: the in vivo role of thrombin in platelet-mediated thrombosis. *Circulation 1990; 82:1476-1484.*

56.- Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: A cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun 1988; 157:87-94.*

57- Hickey MJ, Hagen FS, Yagi M. Human platelet glycoprotein V: Characterization of the polypeptide and the related Ib-VI-IX receptor system of adhesive, leucine rich glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90:8327-8331.*

58.- Holmsen H. Platelet secretion and energy metabolism. In: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW, eds. *Hemostasis and Thrombosis: Basis principles and clinical practice, 3rd ed Philadelphia: Lippincott, 1994: 524-545.*

59.- Horwitz AF and Thiery JP. Cell-to-cell contact and extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol 1994; 6:645-647.*

60.- Hourani SMO, Hall DA. Receptors for ADP on human blood platelets. *Trends Pharmacol Sci 1994; 15: 103-108.*

61.- Hynes Ro. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell 1987; 48:549-550.*

62.- Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS and Byrns RE. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA 1984 84:9265-9269.*

63.- Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Kadowitz PJ. Activation of purified soluble guanylate cyclase by endothelium-derived relaxing factor from intrapulmonary artery and vein: stimulation by acetylcholine, bradykinin and arachidonic acid. *J Pharmacol Exp Ther 1986 237:893-900.*

64.- Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol 1990; 30:535-560.*

65.- Ignarro LJ. Endothelium-derived nitric oxide:actions and properties. *FASEB J 1989 ;*

3:31-36.

66.- Ikeda U, Yamamoto K, Maeda Y, Shimpo M, Kanbe T, Shimada K. Endothelin-I inhibits nitric oxide synthesis in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1997; 29:65-69.

67.- Ikeda U, Murakami Y, Kanbe T, Shimada K. Alpha-adrenergic stimulation enhances inducible nitric oxide synthase expression in rat cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1996; 28:789-795.

68.- Inoue N, Venema R, Sayegh H, Ohara Y, Murphy T, Harrison D. Molecular regulation of the bovine endothelial cell nitric oxide synthase by transforming growth factor- β_1 . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994; 15:1255-1261.

69.- Ip JH, Fuster V, Israel D, Badimón L, Badimón J, Chesebro JH. The role of platelets, thrombin and hyperplasia in restenosis after coronary angioplasty. *J. Am Coll Cardiol* 199; 17:77B-88B.

70.- Jackson CL, Raines E, Ross R, Riedy MA. Role of endogenous platelet-derived growth factor in arterial smooth muscle cell migration after balloon catheter injury. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:1218-1226.

71.- Jaffe EA. Physiologic functions of normal endothelial cells. *Ann N Y Acad Sci* 1985; 454:279-291.

72.- Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J Clin Invest* 1973; 52:2745-2756.

73.- Jang IK, Lassila R, Fuster V. Atherogenesis and inflammation. *European Heart Journal* 1993; 14:2-6.

74.- Joly GA, Schini VB, Vanhoutte PM. Balloon injury and interleukin-1 β induce nitric oxide synthase activity in rat carotid arteries. *Cir Res* 199; 71:331-338.

75.- Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 131-138.

76.- Kaida T, Matsuno H, Niwa M, Kozawa O, Miyata H, Uematsu T. Antiplatelet effect of FK633, a platelet glycoprotein IIb-IIIa antagonist, on thrombus formation and vascular patency after thrombolysis in the injured hamster carotid artery. *Throm Haemost* 1997; 77:562-567.

77.- Kanno, Hirata Y, Imai T, Marumo F. Induction of nitric oxide synthase gene by interleukin in vascular smooth muscle cells. *Hypertension* 1993; 22:43-39.

78.- Kilbourn RG, Bellone I. Endothelial cell production of nitrogen oxides in response to interferon in combination with tumor necrosis factor, interleukin-1, or endotoxin. *J Natl*

Cancer Inst 1990; 82:772-776.

79.- Kilbourn RG, Jubran A, Gross SS, Griffith OW, Levi R, Adams J, Lodato RF. Reversal of endotoxin-mediated shock by N^G-methyl-L-arginine, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1990; 172:1132-1138.

80.- Knowles RS, Palacios M, Palmer RMJ, Moncada S. Formation of nitric oxide from L-arginine in the central nervous system: A transducer mechanism for stimulation of the soluble guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:5159-5162.

81.- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* 1994;298:249-258.

82.- Kolpakov V, Gordon D, Kulik T. Nitric oxide-generating compounds inhibit total protein and collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells. *Cir Res* 1995; 76:305-309.

83.- Kourembanas S, McQuillan LP, Leung GK, Faller DV. Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. *J Clin Invest* 1993; 92:99-104.

84.- Kubes P, Suzuki M, Granger DN. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:587-590.

85.- Laemmli NK. Change of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.

86.- Lahera V, Fernández-Tresguerres JA. Factor endotelial relajante (EDRF): ¿Un nuevo concepto de la regulación vascular endocrina? *Endocrinología (Spn)* 1990; 37:340-343.

87.- Lancaster JR. Simulation of the diffusion and reaction of endogenously produced nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:8137-8141.

88.- Langford EJ, Brown AS, Wainwright RJ, de belder AJ, Thomas MR, Radomski MW, Martin JF, Moncada S. Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lacet* (1994), 344.1458-1460.

89.- Le Cras TD, Xue C, Rengasamy A, Johns RA. Chronic hipoxia upregulates endothelial and inducible NO synthase gene and protein expression in rat lung. *Am J Physiol* 1996; 270:L164-L170.

90.- Lee JS, Adrie C, Jacob HJ, Roberts JD, Zapol WM, Bloch KD. Chronic inhalation of nitric oxide inhibits neointimal formation after balloon induced arterial injury. *Circ Res* 1996; 78: 337-341.

91.- Lindner V, Reidy MA. Smooth muscle proliferation after vascular injury is inhibited by an antibody against basic FGF. *J Cell Biochem* 1991, (suppl 15C): 118.

- 92.- López-Farré A, Sánchez de Miguel L, Caramelo C, Gomez-García J, García R, Mosquera JR, de Frutos T, Millás I, Rivas F, Echezarreta G, Casado C. Role of nitric oxide in the autocrine control of growth and apoptosis of endothelial cells. *Am J Physiol* 1997; 272: H760-H768.
- 93.- López-Farré A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millás I, Montón M, Casado S. Effects of aspirin on platelet- neutrophil interactions. Role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation* 1995; 91:2080-2088.
- 94.- López-Farré A, Riesco A, Digiuni E, Mosquera JR, Caramelo C, Sánchez de Miguel L, Millás I, de Frutos T, Cernadas MR, Montón M, Alonso J, Casado S. Aspirin-stimulated nitric oxide production by neutrophils after acute myocardial ischemia in rabbits. *Circulation* 1996; 94:83-87.
- 95.- López-Farré A, Mosquera JR, Sánchez de Miguel L, Millás I, de Frutos T, Montón M, Sierra MP, Riesco A, Casado S. Endothelial cells inhibit NO generation by vascular smooth cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16:1263-1268.
- 96.- Lowenstein CJ and Snyder SH. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 1992; 70:705-707.
- 97.- Lüscher TF. The endothelium. Target and promoter of hypertension? *Hypertension* 1990; 15:482-485.
- 98.- Madri JA, Pratt BM. Endothelial cell-matrix interactions: in vitro models of angiogenesis. *J Histochem Cytochem* 1986; 34:85-91.
- 99.- Majesky MW, Giachelli CM, Schwartz SM. Rat carotid neointimal smooth muscle cells reexpress a developmentally regulated phenotype during repair of arterial injury. *Circ Res* 1992; 71:759-768.
- 100.- Maresta A, Balducelli M, Cantini L, Casari A, Chioin R, Fabbri M, Fontanelli A, Monici Petri PA, Repetto S, De Servi S, for the STARC Investigators. Trapidil (triazolopyrimidine), a platelet-derived growth factor antagonist, reduces restenosis after percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Circulation* 1994; 90: 2710-2715.
- 101.- Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: Nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* 1988; 27:8706-8711.
- 102.- Marletta MA. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J Biol Chem* 1993; 268 (17):12231-12234.
- 103.- Marsden PA, Brenner BM. Nitric oxide and endothelins: Novel autocrine/paracrine regulators of the circulation. *Semin Nephrol*;11:169-185.

- 104.- Masagué J, Attisano L, Wrana JL. The TGF- β family and its composite receptors. *Trends Cell Biol*. 1994; 4:172-178.
- 105.- May GR, Crook P, Moore PK, Page CP. The role of nitric oxide as an endogenous regulator of platelet and neutrophil activation within the pulmonary circulation of the rabbit. *Br J Pharmacol* 1991; 102:759-763.
- 106.- McGuire PG, Orkin R.W. Isolation of rat aortic endothelial cells by primary explant techniques and their phenotypic modulation by defined substrates. *Lab Invest* 1987; 57:94-104.
- 107.- Merhi Y, Provost P, Guidoin R, Latour JG. Importance of platelets in neutrophil adhesion and vasoconstriction after deep carotid arterial injury by angioplasty in pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:1185-1191.
- 108.- Mickelson JK, Lakkis NM, Villareal-Levy G, Hughes BJ, Smith CW. Leukocyte activation with platelet adhesion after coronary angioplasty: a mechanism for recurrent disease? *J Am Coll Cardiol* 1996; 28: 345-353.
- 109.- Mohamed F, Monge JC, Gordon A, Cernacek P, Blais D, Stewart DJ. Lack of role for nitric oxide (NO) in the selective destabilization of endothelial NO synthase mRNA by tumor necrosis factor- α . *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:52-57.
- 110.- Moncada S, Higgs EA. Endogenous nitric oxide: physiology, pathology and clinical relevance. *Eur J Clin Invest* 1991; 21:361-374.
- 111.- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43(2):109-141.
- 112.- Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *New Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.
- 113.- Morel DW; Di Corleto PC, Chilsom GM. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 1984; 4:357-364.
- 114.- Mühl H, Pfeilschifter J. Amplification of nitric oxide synthase expression by nitric oxide in interleukin 1 β -stimulated rat mesangial cells. *J Clin Invest* 1995; 95:1941-1946.
- 115.- Nakayama I, Kawahara Y, Tsuda T, Okuda M, Yokoyama M (1994). Angiotensin II inhibits cytokine-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem*; 269:11628-11633.
- 116.- Nathan CF, Hibbs J.B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr Opin Immunol* 1991; 3:65-70.
- 117.- Nathan CF. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB (Fed Am Soc*

*Exp Biol*J 1992; 6:3051-3064.

118.- Neumann FJ, Marx N, Gawaz M, Brand K, Ott I, Rokitta C, Sticherling C, Meinel C, May A, Schöming A. Induction of cytokine expression in leukocytes by binding of thrombin-stimulated platelets. *Circulation* 1997; 95:2387-2394.

119.- Newby AC, Henderson AH. Stimulus-secretion coupling in vascular endothelial cells. *Annu Rev Physiol* 1990; 52:661-674.

120.- Nicholson S, Bonecini-Almeida M da G, Lapa e Silva JR, Nathan C, Xie Q-W, Mumford R, Weidner JR, Calaycay J, Geng J, Boechat N, Linhares C, Rom W, Ho JL. Inducible nitric oxide synthase in pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. *J Exp Med* 1996; 183: 2293-2302.

121.- Niewiarowski S. Secreted platelets proteins. In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, eds. *Haemostasis and Thrombosis*, 3rd ed. Vol 1. Edinburg: Churchill Livingstone 1994 167-181.

122.- Nunokawa Y, Ishida N, Tanaka S. Promoter analysis of human inducible nitric oxide synthase gene associated with Cardiovascular homeostasis. *Biochem Biophys Res Commun* 1994;200:802-807.

123.- Packham MA. Role of platelets in thrombosis and haemostasis. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; 72: 278-284.

124.- Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333:664-666.

125.- Palmer RMJ, Bridge L, Foxwell NA, Moncada S. The role of nitric oxide in endothelial cell damage and its inhibition by glucocorticoides. *Br J Pharmacol* 1992; 105:11-12.

126.- Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327:524-525.

127.- Penn MS, Sardel GM, Chilsom GM. Relative significance of endothelium and internal elastic lamina in regulating the entry of macromolecules into arteries in vivo. *Circ Res* 1993; 74:74-82.

128.- Perrella MA, Yoshigumi M, Fen A, Tsai JC, Hiesh CM, Kourembanas S, Lee ME. Transforming growth factor- β 1 but not dexamethasone, down-regulates nitric oxide synthase mRNA after its induction by interleukin-1 β in rat smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1994; 269:14595-14600.

129.- Petros A, Bennedtt D, Vallance P. Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hipotension in patients with septic shock. *Lancet* 1991; 338:1557-1558.

130.- Plow EF, Ginsberg MH. *The molecular basis of platelet function*. In: Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ, Furie B, Cohen HJ, eds. *Hematology. Basis, Principles and Practice*. New York: Churchill Livingstone; 1991; 1165-1176.

131.- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. *Characterization of the L-arginine nitric oxide pathway in human platelets*. *Br J Pharmacol* 1990;101:325-328.

132.- Radomski MW, Moncada S. *Regulation of vascular homeostasis by nitric oxide*. *Thromb and Haemostasis* 1993; 70:36-41.

133.- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. *Glucocorticoids inhibit the expression of an inducible, but not the constitutive, nitric oxide synthase in vascular endothelial cells*. *Proc Natl Acad Sci, USA* 1990; 87:10043-10047.

134.- Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. *Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium*. *Lancet* 1987; 2:1057-1058.

135.- Raij L, Baylis C. *Glomerular actions of nitric oxide*. *Kidney Int* 1995; 48:20-32.

132.- Rangaswamy S, Penn MS, Saidel GM, Chilsom GM. *Exogenous oxidized low density lipoprotein injures and alters the barrier junction of endothelium in rats in vivo*. *Circ Res* 1997; 80:37-44.

136.- Ranjan V, Xiao Z, Diamond S. *Constitutive NOS expression in cultured endothelial cells is elevated by fluid shear stress*. *Am J Physiol* 1995 (*Heart Circ Physiol* 38) 269:H550 - H555.

137.- Rees DD, Palmer RMJ, Hodson HF. *A specific inhibitor of nitric oxide formation from L-arginine attenuates endothelium-dependent relaxation*. *Br J Pharmacol* 1989; 96:418-424.

138.- Reidy MA, Yoshida K, Harker LA, Schwartz SM. *Vascular injury: quantification of experimental focal endothelial denudation in rats using indium-111-labeled platelets*. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 305-311.

139.- Riesco A, Caramelo C, Blum G, Montón M, Gallego MJ, Casado S, López-Farré A. *Nitric oxide-generating system as an autocrine mechanism in human polymorphonuclear leucocytes*. *Biochem J* 1993;292(Pt 3): 791-796.

140.- Robbins S, Cotran R, Kumar V. *Patología estructural y funcional*. 1988. Editorial Interamericana, tercera edición.

141.- Rodeberg DA, Chaet MS, Bass RC, Arkovitz MS, García VF. *Nitric oxide: An overview*. *Am J Sur* 1995; 170:292-303.

142.- Ross R. *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s*. *Nature* 1993; 362:801-809.

143.- Ross R, Raines EW, Bowen-Pope DF. *The platelet derived growth factor. Cell* 1986; 46:155-164.

144.- Roth GJ.. *Developing relationships: Arterial platelet adhesion, glycoprotein Ib, and leucine-rich glycoproteins. Blood* 1991; 77:5-19.

145.- Ruggeri ZM, Ware J. *von Willebrand factor. FASEB J* 1989; 7:308-316.

146.- Ruggeri ZM. *Mechanisms of shear induced platelet adhesion and aggregation. Thromb Haemostasis* 1993; 70:119-123.

147.- Sarembock IJ, Gertz D, Gimple LW, Owen RM, Powers ER, Roberts WC: *Effectiveness of recombinant desulphatohirudin in reducing restenosis after balloon angioplasty of atherosclerotic femoral arteries in rabbits. Circulation* 1991, 84:232-243.

148.- Schini VB, Junquero DC, Scott-Burden T, Vanhoutte PM. *Interleukin-1 β induces the production of an L-arginine derived relaxing factor from cultured smooth muscle cells from rat aorta. Biochem. Biophys Res Commun.* 1991; 176: 114-121.

149.- Schini VB, Schray-Utz B, Busse R, Vanhoutte PM. *Insulin-like growth factor I inhibits induction on nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells. Circ Res* 1994; 74:24-32.

150.- Schini VB, Vanhoutte PM. *Role of L-arginine-nitric oxide pathway in vascular smooth muscle. Eur Heart J* 1993;14(1):16-21.

151.- Schini VB, Catowsky S, Durante W, Scott-Burden T, Schafer A, Vanhoutte PM. *Thrombin inhibits induction of nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells. Am J Physiol* 1993; 264(Heart Circ. Physiol.33):H611-H616.

152.- Scott-Burden T, Schini VB, Elizondo E, Junquero DC, Vanhoutte PM. *Platelet-derived growth factor suppresses and fibroblast growth factor enhances cytokine-induced production of nitric oxide by cultured smooth muscle cells. Circ Res* 1992; 71:1088-1100.

153.- Scott-Burden T, Schini VB, Elizondo E, Junquero DC, Vanhoutte PM. *Platelet-derived growth factor suppresses and fibroblast growth factor enhances cytokine- induced production of nitric oxide by cultured smooth muscle cells. Circ Res* 1992; 71:1088-1100.

154.- Sessa WC, Pritchard K, Seyedi N, Wang J, Hintze TH. *Chronic exercise in dogs increases coronary nitric oxide production and endothelial cell nitric oxide synthase gene expression. Circ Res* 1994; 74:349-353.

155.- Shimokada K, Raines WE y cols. *A significant part of macrophage derived growth factor consists of at least 2 forms of PDGF. Cell* 1985; 43: 277-286.

156.- Shirotani M, Yui Y, Kawai C.. *Restenosis after coronary angioplasty : pathogenesis of*

neointimal thickening initiated by endothelial loss. *Endothelium* 1993; 1: 5-22.

157.- Sixma JJ. Interaction of blood platelets with the vessel wall. In: Bloom AL, Forbes CD, Thomas DP, Tuddenham EGD, eds. *Haemostasis and Thrombosis*, 3rd ed, Vol 1 Edinburg: Churchill Livingstone; 1994; 259-285.

158.- Steele PM, Chesebro JH, Stanson AW y cols. Balloon angioplasty. natural history of the pathophysiology response to injury in a pig model. *Cir Res* 1985; 57:105-112.

159.- Szabó C, Wu C, Mitchell A, Gross S, Thiernemann C, Vane J .Platelet-activating factor contributes to the induction of nitric oxide synthase by bacterial lipopolysaccharide. *Circ Res* 1993; 73:991-999.

160.- Tozer EC; Carew TE. Residence time low-density lipoprotein in the normal and atherosclerotic rabbit aorta. *Circulation* 1997; 80: 208-218.

161.- Tsao PS, Buitrago R, Chan JR, Cooke JP. Fluid flow inhibits endothelial adhesiveness. *Circulation* 1996; 94:1682-1689.

162.- van der Wall, Das PK, Tigges AJ. Adhesion molecules on the endothelium and mononuclear cells in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1992; 141: 1427-1433.

163.- van der Wall, Becker AE, van der Loss, 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.

164.- Virchow R. Phlogose und thrombose im Gefäßsystem. In Virchow R (ed). *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftliche Medizin*. Berlin, Meidinger Sohn 1856 pp458-463.

165.- Vodovotz Y, Bogdan C, Paik J, Xie Q-W, Nathan C. Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor β . *J Expr Med* 1993; 178:605-613.

166.- Von der Leyen HE, Gibbons GH, Morishita R, Lewis NP, Zhang L, Nakajima M, Kaneda Y, Cooke JP, Dzau VJ. Gene therapy inhibiting neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 1995; 92:1137-1141.

167.- von Rokitansky. 1844. *Handbuch der Pathologische Anatomie*. Wien.

168.- Warner SJ, Libby P. Human vascular smooth muscle cells : Target for and source of tumor necrosis factor. *J. Immunol* 1989; 142:100-109.

169.- Ware JA, Heistad DD. Platelet-endothelium interactions. *Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. N Engl J Med* 1993; 328: 628-635.

- 170.- Watkins RW, Pula K, Cook J, Hoos L, McLeod R, Prioli NA, Davis HR. NG-Nitro-L-Arginine methyl ester does not affect balloon catheter induced intimal hyperplasia in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; 197:304-309.
- 171.- Weibel, ER and GE Palade: New cytoplasmic components in arterial endothelium *J Cell Biol* 1964; 23:101-104.
- 172.- Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989; 320:365-376.
- 173.- White KA, Marletta MA. Nitric oxide synthase is a cytochrome p-450 type hemoprotein. *Biochemistry* 1992; 31:6627-6631.
- 174.- Wilcox JN. Thrombin and other potential mechanisms underlying restenosis. *Circulation* 1991; 84: 432-435.
- 175.- Wilentz JR, Sanborn TA, Haudenschild CC, Valeri CR, Ryan TJ, Faxon DP Platelet accumulation in experimental angioplasty: time course and relation to vascular injury. *Circulation* 1987; 75: 636-642.
- 176.- Wilson PWF. Established risk factors and coronary artery disease. The Framingham study. *Am J Hipertens* 1994; 7:7S-12S.
- 177.- Wright CD, Mulsch A, Busse R, Osswald H. Generation of nitric oxide by human neutrophils. *Biochem Biophys Acta* 1989; 160:813-819.
- 178.- Yen M-H, Chen S-J, Wu C-C. Comparison of responses to aminoguanidine and N^w-Nitro-L-arginine methyl ester in the rat aorta. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1995; 22 :641-645.
- 179.- Yoshizumi M, Perella M, Burnett J, Lee Jr. Tumor necrosis factor downregulates an endothelial nitric oxide synthase mRNA by shortening its half-life. *Cir Res* 1993; 73:205-209.
- 180.- Yui Y, Hattori R, Kosuga K, Eizawa H, Hiki K, Ohkawa S, Ohnishi K, Terao S, Kawai C. Calmodulin-independent nitric oxide synthase from rat polymorphonuclear neutrophils. *J Biol Chem* 1991; 226:3369-3371.
- 181.- Zeiher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R. Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein-1 in cultured human endothelial cells. *Circ Res* 1995; 76:980-986.
- 182.- Zucker MB, Katz IR. Platelet factor 4: Production, structure and physiologic and immunologic action. *Proc Soc Exp Biol Med* 1991; 198: 693-702.

EPÍLOGO

Cuando un general romano entraba victorioso en la ciudad de Roma, después de realizadas largas campañas, se organizaba un espectacular desfile donde se paseaban todos los tesoros obtenidos, todos los esclavos vencidos y encadenado a su brillante carro llevaba al rey del pueblo derrotado. En ese momento, era la máxima figura de la urbe. Sin embargo, junto a él en el carro, un esclavo le susurraba al oído : " Sic transic gloria mundis " (" así pasa la gloria de este mundo ").