

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**MODULACION FARMACOLOGICA DE
FACTORES IMPLICADOS EN LA
FORMACION Y DESESTABILIZACION DE
LA LESION ATEROSCLEROTICA
EXPERIMENTAL**



Directores: Dr. Jesús Egido de los Ríos y Dr. José Tuñón Fernández.

TESIS DOCTORAL

MIGUEL ANGEL HERNANDEZ PRESA

Madrid, 1997.



ARCHIVO

Fundación Jiménez Díaz

CLINICA DE NUESTRA SEÑORA DE LA CONCEPCION

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

D. Jesús Egido de los Ríos, Doctor en Medicina y Catedrático de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y D. José Tuñón Fernández, Doctor en Medicina y médico adjunto del servicio de Cardiología de la Fundación Jiménez Díaz.

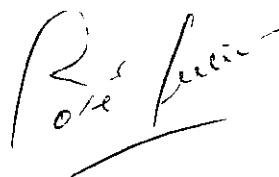
CERTIFICAN

Que Don Miguel Angel Hernández Presa, Licenciado en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid, ha realizado en el laboratorio de investigación de la Fundación Jiménez Díaz, bajo nuestra dirección, la presente Tesis Doctoral.

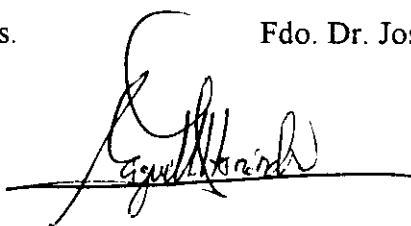
Y para que conste, firmo la presente en Madrid, a 6 de Octubre de 1997.



Fdo. Dr. Jesús Egido de los Ríos.



Fdo. Dr. José Tuñón Fernández



Fdo. Doctorando. Miguel Angel Hernández Presa

A mis padres y hermanos

A Carolina

*“ Un hombre de ciencia es un prisionero de sus ideas si no sabe
como preguntar a la naturaleza y si no posee herramientas
convenientes y necesarias para contestarla”
(Claude Bernard)*

AGRADECIMIENTOS

*“ Vengan santos milagrosos
vengan todos en mi ayuda
que la lengua se me añuda
en una ocasión tan ruda”*

(de “*El gaucho Martín Fierro*”, J. Hernández, 1872)

Este poema popular simboliza la dificultad para agradecer a todos aquellos que han hecho posible que por fin me encuentre escribiendo estas líneas. Mientras que en la etapa universitaria el éxito de mi formación dependía de mi constancia y del apoyo incondicional de mis padres, la formación investigadora requiere un esfuerzo multidisciplinar y el respaldo de un gran equipo de investigación.

Quiero agradecer al Dr. J. Egido por darme la oportunidad de formar parte de su equipo y abrirme los ojos al apasionante y a la vez duro mundo de la investigación, por tu confianza y apoyo en que saliera adelante.

Al Dr. J. Tuñón, que con su capacidad de expresar de modo claro y sencillo su experiencia en el campo de la cardiología, ha sabido contagiarme su entusiasmo de seguir avanzando en la lucha contra las enfermedades coronarias.

Al Ministerio de Educación y Ciencia y a la Fundación Conchita Rábago de Jiménez Díaz por la concesión de las becas que me han permitido llevar a cabo esta Tesis. Así como a Parke-Davis, España, por su contribución a la financiación de parte de estos estudios.

A mis compañeras Carmen B y Mónica del “*Atherosclerosis Team*” por vuestra constante ayuda científica y el apoyo que me habéis mostrado dentro y fuera del laboratorio. Carmen, tú sabes bien lo que nos ha costado formar el equipo ¿eh?, pero el esfuerzo ha merecido la pena.

A Carlos y a Jesús (los últimos fichajes del “*Atherosclerosis Team*”) por todos sus consejos y experiencias que me han resultado de mucha ayuda.

AGRADECIMIENTOS

Al equipo de cirugía experimental del Hospital Gómez Ulla, por permitirme utilizar sus instalaciones, y especialmente a Carlos y a Pablo, por haberme enseñado algunas técnicas quirúrgicas que han hecho posible mejorar el modelo presentado en esta tesis.

A los Dres. G. Renedo y L. Ortega por iniciarme en el conocimiento de la histología y de las técnicas inmunohistoquímicas.

Al resto de mis compañeros de laboratorio con los que he compartido el trabajo investigador durante estos años. Algunos ya no están en el laboratorio (Silvia, Eva, Sylvia) y otros continúan (Carmen G, Natalia, Marta, Puri, Raquel, Maritina, Mariajo, Itziar, Olga, Corina, M^a Jesús, Rosario, Oscar y Luis).

A Javi y a Benito, que aunque ya no están por aquí, han representado para mí el otro sector del laboratorio (*el masculino*) y con quienes he compartido charlas científicas y alguna que otra copa.

A todos mis amigos, por su apoyo incondicional en mi tarea investigadora.

A mi prima Mónica, por prestarme algunos de sus libros de Medicina que me ayudaron a comprender muchos aspectos clínicos de la cardiología. Se que desde allá arriba me dedicas la mejor de tus sonrisas y te alegras de que por fin haya llegado este momento. Nadie mejor que tú me ha enseñado el coraje con el que hay que enfrentarse a la vida y la lucha por perseguir aquello que deseas.

A mi familia por confiar en mí desde el principio (*cuando decidí estudiar Biología*) y apoyarme en los momentos difíciles donde la autoestima esta de capa caída. Con vosotros he aprendido que para conseguir una meta hay que vivirla con pasión y ser constante.

Finalmente quisiera dar las gracias a Carolina, por haber sido la promotora más energética y entusiasta de todo lo que he intentado plasmar en esta tesis, soportando largas horas de ordenador y de quirófano, además de muchos fines de semana y vacaciones sacrificadas. Tu paciencia y confianza han sido decisivas para que, por fin, acabara de escribir estas páginas.

RESUMEN

La inflamación en la placa aterosclerótica se considera el principal factor de riesgo asociado a la rotura y trombosis de placa. El enzima de conversión de la angiotensina (ECA), responsable de la conversión de la angiotensina I en angiotensina II (Ang II), parece jugar un papel muy importante en la patogenia de la aterosclerosis. En este sentido los resultados aportados en esta tesis muestran que en un modelo de aterosclerosis acelerada en conejo la Ang II puede ser responsable, al menos en parte, de la acumulación de macrófagos en las arterias dañadas. Además el factor nuclear κ B, implicado en la regulación de genes inflamatorios, muestra un aumento de su actividad tanto en la fase temprana del modelo (7 días) como en la más avanzada (28 días). Así mismo, la expresión de MCP-1 e IL-8, quimioquinas implicadas en el reclutamiento celular, aparecen incrementada en correlación temporal con el infiltrado de macrófagos. El PDGF-B, factor mitogénico y quimiotáctico de CML, y el colágeno I, que es asociado a la consistencia de las placas ateroscleróticas, presentan un aumento de su expresión. La administración de un inhibidor de la ECA (quinapril) produce una disminución de todos estos factores. Sin embargo, la expresión del mRNA y de la proteína del colágeno I no es afectada por el tratamiento. Mediante estudios *in vitro* demostramos que la Ang II induce, en monocitos y en CML, la expresión de MCP-1 y la activación del factor nuclear que lo regula, el NF- κ B. Nuestros resultados sugieren que la Ang II puede ser considerada como un importante regulador de dos fenómenos implicados en la formación de la placa de ateroma, la acumulación de macrófagos y la proliferación de CML.

Por otro lado son muchos los estudios que demuestran que la hiperlipidemia es un factor de riesgo asociado a la enfermedad cardiovascular. Los inhibidores de la HMG-CoA reductasa, principal enzima implicada en la síntesis del colesterol, reducen la incidencia de eventos isquémicos. En un modelo de aterosclerosis en conejo hemos mostrado que la administración de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa (atorvastatina) disminuye de forma significativa el colesterol total, LDL y triglicéridos, y el tamaño de la lesión. También se anula el infiltrado de macrófagos en la placa y se reduce la expresión de MCP-1. Además, la activación de NF- κ B disminuye en el grupo de atorvastatina, tanto en macrófagos como en CML. De igual forma mediante estudios *in vitro* mostramos que las LDL inducen la expresión de MCP-1 y la activación de NF- κ B, en monocitos y CML.

Nuestros resultados pueden aportar una mejor comprensión de los mecanismos patogénicos implicados en la evolución y desestabilización de la placa ateromatosa y proporcionar una posible explicación de la reducción de eventos isquémicos agudos encontrada en pacientes tratados con inhibidores de la ECA y de la HMG-CoA reductasa.

ABREVIATURAS

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En algunos casos se ha mantenido la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

Ang II	Angiotensina II
AP-1	Activador de la proteína-1
APES	3'-Aminopropiltrióxilano
Atv	Atorvastatina
BSA	Albúmina de suero bovino
CE	Célula endotelial
CML	Célula muscular lisa
DMEM	Medio mínimo de Eagle modificado por Dulbecco
DNA	Acido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
ECA	Enzima de conversión de la angiotensina
EDRF	Factor relante derivado del endotelio
EDTA	Acido etilendiamino tetraacético
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
G3PDH	Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
HCl	Acido clorhídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HEPES	Acido N-2-hidroxietilpiperazine-N'-2-etanosulfónico
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
iECA	Inhibidor de la enzima de conversión de la angiotensina
IFN-α	Interferón- α
IgG	Inmunoglobulina G
IL-1	Interleuquina 1
IL-8	Interleuquina 8

ABREVIATURAS

LDL	Lipoproteína de baja densidad
LDLox	Lipoproteína de baja densidad oxidada
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
M-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
MCP-1	Proteína quimiotática de monocitos-1
MOPS	Acido 3-(N-morfolino) propano sulfónico
mRNA	Acido ribonucleico mensajero
NBT	Nitroblue tetrazolium
NF-κB	Factor nuclear κ B
NO	Oxido nítrico
PA-I	Inhibidor del activador del plasminógeno
PBS	Tampón fosfatos salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
PDTC	Pirrolidín ditiocarbamato
PGI₂	Prostaglandina I ₂
PMSF	Fenilmetilsulfonil fluoruro
SDS	Dodecil sulfato sódico
SRA	Sistema renina angiotensina
SSC	Citrato sódico/ cloruro sódico
STF	Suero de ternera fetal
TAE	Tris-acetato-EDTA
TBS	Tampón Tris salino
TF	Factor tisular
TGF-β	Factor de crecimiento transformante
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
t-PA	Activador tisular del plasminógeno
UTP	Uridín trifosfato
VCAM-1	Molécula de adhesión de células vasculares-1

I. INTRODUCCION	1
1. PERSPECTIVA HISTORICA	1
2. CONCEPTO DE ATEROSCLEROSIS. Estructura de la pared arterial	2
3. PATOGENIA DE LA ATEROSCLEROSIS	4
3.1. ¿QUE INICIA LA DISFUNCION ENDOTELIAL?	5
3.2. PROGRESION DE LA LESION	7
3.3. ROTURA DE LA PLACA	10
4. INTERACCIONES CELULARES EN LA ATEROGENESIS	12
4.1. EL ENDOTELIO	12
4.1.1. Funciones del endotelio	12
4.2. LA CELULA MUSCULAR LISA	14
4.2.1. Modulación fenotípica de la CML	14
4.2.2. Migración y proliferación	14
4.2.3. Acumulación y oxidación de lípidos	15
4.3. MONOCITO/MACROFAGO	17
4.3.1. Adhesión y migración	17
4.3.2. Activación y diferenciación	18
4.3.3. Muerte macrofágica y formación del núcleo necrótico.	18
4.4. LINFOCITOS T	20
5. MATRIZ EXTRACELULAR VASCULAR	21
5.1. COLAGENOS	21
6. EL FACTOR NUCLEAR-κB EN LA PATOLOGIA VASCULAR	23
7. EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA VASCULAR	25
7.1. ANGIOTENSINA II Y PATOGENIA VASCULAR	26
7.2. EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA ECA EN LA ATEROSCLEROSIS	27
7.2.1. Efecto sobre la formación y progresión de la placa	27
7.2.2. Efectos de protección en la rotura de la placa	28
7.2.3. Efecto en la trombolisis de la placa	28

8. LOS INHIBIDORES DE LA HMG-CoA REDUCTASA	30
8.1. LAS ESTATINAS COMO TRATAMIENTO DE LA ATROSCLEROSIS.	32
II. OBJETIVOS	34
III. MATERIALES Y METODOS	35
1. MODELOS EXPERIMENTALES	35
1.1. DISEÑO	35
1.1.1. Modelo A	37
1.1.2. Modelo B	40
1.2. TRATAMIENTO FARMACOLOGICO	42
1.3. ESTUDIOS LIPIDICOS	42
1.4. PRESION SISTOLICA Y ACTIVIDAD DE LA ECA	43
1.4.1. Medida de la actividad sérica y tisular de la ECA	43
2. ESTUDIOS HISTOPATOLOGICOS	44
2.1. ANALISIS MORFOMETRICOS	44
2.2. INMUNOHISTOQUIMICA	44
2.2.1. Desarrollo	44
2.2.2. Doble inmunohistoquímica	46
2.3. HIBRIDACION <i>IN SITU</i>	47
2.3.1. Ribosondas empleadas. Marcaje	47
2.4. CUANTIFICACION	48
3. CULTIVOS CELULARES	49
3.1. CELULAS MUSCULARES LISAS (CML)	49
3.2. LINEA CELULAR U937	49
4. AISLAMIENTO DE LDL	49

5. ESTUDIOS DE BIOLOGIA MOLECULAR	50
5.1. EXTRACCION DE RNA	50
5.2. NORTHERN BLOT	51
5.3. PREHIBRIDACION E HIBRIDACION	51
5.4. PREPARACION DE SONDAS	52
5.4.1. Sondas utilizadas para estudios <i>in vitro</i>	52
5.4.2. Sondas específicas para estudios <i>in vivo</i>	53
5.4.3. Purificación y marcaje de sondas	53
5.5. ESTUDIOS POR RT-PCR	54
6. ANALISIS DE LA ACTIVACION DEL FACTOR NUCLEAR- κ B (NF- κ B)	56
6.1. EXTRACCION DE PROTEINAS	56
6.1.1. Proteínas celulares (de tejido)	56
6.1.2. Proteínas nucleares (de células)	56
6.2. MARCAJE DEL OLIGONUCLEOTIDO CONSENSO	57
6.3. ENSAYO DE RETARDO DE MOVILIDAD ELECTROFORETICA	57
6.3.1. Ensayo de unión	57
6.3.2. Controles	57
6.4. ENSAYOS DE SUPERRETARDO	58
6.5. DETECCION DE NF- κ B <i>IN SITU</i> (SOUTH-WESTERN)	58
6.5.1. Preparación de oligonucleótidos	58
6.5.2. Detección	59
7. ANALISIS ESTADISTICO	60
IV. RESULTADOS	61
PARTE I: ESTUDIOS <i>IN VIVO</i>	
1. EFECTO DE LA INHIBICION DE LA ECA	61
1.1. EVOLUCION CLINICA EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO	62
1.1.1. Evolución del peso	62
1.1.2. Presión arterial	62
1.1.3. Parámetros bioquímicos	63

1.2. ACTIVIDAD DE LA ENZIMA DE CONVERSION DE LA ANGIOTENSINA	64
1.2.1. Actividad en suero	64
1.2.2. Actividad tisular	64
1.3. ESTUDIOS HISTOPATOLOGICOS	66
1.3.1. Análisis de las lesiones vasculares	66
1.3.2. Evaluación de la presencia de macrófagos y MCP-1	70
1.4. CITOQUINAS EN ARTERIAS FEMORALES DAÑADAS	75
1.4.1. Expresión de MCP-1	75
1.4.2. Expresión e inmunolocalización de IL-8	79
1.4.3. Expresión de IL-1 β	83
1.4.4. Expresión de TNF- α	85
1.5. FACTORES DE CRECIMIENTO Y PROTEINAS DE MATRIZ	87
1.5.1. Expresión de PDGF-B	87
1.5.2. Expresión e inmunolocalización de colágeno I	89
1.6. ACTIVIDAD NF- κ B EN LAS ARTERIAS DE CONEJO	93
2. EFECTO DE LA INHIBICION DE LA HMG-CoA REDUCTASA	101
2.1. EVOLUCION DEL PESO Y DE LOS LIPIDOS PLASMATICOS	101
2.2. ANALISIS DE LAS LESIONES VASCULARES	103
2.3. EVALUACION DE LA PRESENCIA DE MACROFAGOS EN LAS LESIONES	105
2.4. EXPRESION DE MCP-1 EN LAS ARTERIAS FEMORALES	106
2.5. EXPRESION PROTEICA DE MCP-1 EN LAS LESIONES	107
2.6. ACTIVACION NF- κ B EN LA FEMORAL LESIONADA, AORTA E HIGADO	109
 PARTE II: ESTUDIOS <i>IN VITRO</i>	
1. EXPRESION DEL GEN MCP-1 EN MONOCITOS Y CML	114
2. ACTIVIDAD NF- κ B EN MONOCITOS Y CML ESTIMULADAS CON ANG II	117
3. ACTIVIDAD NF- κ B EN MONOCITOS Y CML ESTIMULADAS CON LDL	120

V. DISCUSION	122
1. EFECTO DE LA INHIBICION DE LA ECA EN UN MODELO DE HIPERCOLESTEROLEMIA	123
1.1. ACTIVIDAD DE LA ECA Y FORMACION NEOINTIMAL	123
1.2. LA ANG II PARTICIPA EN EL RECLUTAMIENTO DE MACROFAGOS HACIA LA NEOINTIMA	124
1.3. LA ANG II PROMUEVE LA EXPRESION DEL mRNA DEL MCP-1 VIA ACTIVACION DE NF-κB EN CULTIVOS DE MONOCITOS Y CML ..	125
1.4. LA INHIBICION DE LA ECA DISMINUYE LA ACTIVACION NF-κB EN VASOS DAÑADOS	126
1.5. LA DIETA ATEROGENICA POTENCIA LA ACTIVACION DE NF-κB EN LAS AORTAS NO DAÑADAS	127
1.6. EFECTO DEL QUINAPRIL SOBRE LA EXPRESION DE IL-8	128
1.7. EXPRESION DE IL-1β Y TNF-α	129
1.8. REGULACION DEL PDGF-B Y COLAGENO I POR QUINAPRIL	130
1.8.1. Efecto sobre la expresi3n de PDGF-B	130
1.8.2. Efecto sobre la expresi3n de col3geno I	131
2. EFECTO DE LA INHIBICION DE LA HMG-CoA REDUCTASA EN UN MODELO DE HIPERLIPIDEMIA MIXTA	132
2.1. LA INHIBICION DE LA HMG-COA REDUCTASA DISMINUYE LA FORMACION NEOINTIMAL	132
2.2. LA INHIBICION DE LA HMG-COA REDUCTASA: ¿VENTAJAS MAS ALLA DE LA REDUCCION DEL COLESTEROL? EL PAPEL DE LOS ISOPRENOIDES	133
2.3. LA INHIBICION DE LA HMG-COA REDUCTASA ANULA LA INFILTRACION DE MACROFAGOS EN LA LA LESION Y REDUCE LA EXPRESION DE MCP-1	134
2.4. ATORVASTATINA REDUCE LA ACTIVACION NF-κB EN AORTA, HIGADO Y ARTERIA FEMORAL	137
VI. CONCLUSIONES	138
VII. BIBLIOGRAFIA	140

I.- INTRODUCCION

1.- PERSPECTIVA HISTORICA

La aterosclerosis es una condición patológica que ocasiona trastornos tan importantes como la cardiopatía isquémica, los accidentes cerebrovasculares y la arteriopatía periférica. Todo esto constituye un problema no sólo médico-científico, sino social. En España la tasa de mortalidad por enfermedad cardiovascular es de las más bajas del mundo occidental (García-Gil et al., 1989), sin embargo, más del 40% del total de los fallecimientos son debidos a un proceso de origen cardiovascular.

Al contrario de lo que se pudiera creer, este no es un problema nuevo sino que estudios paleopatológicos han venido a demostrar que esta enfermedad ya existía en civilizaciones tan antiguas como la egipcia, como se ha podido comprobar en estudios realizados en momias de faraones (Sandison, 1967).

Pero no fue hasta mediados de este siglo cuando se estableció que esta enfermedad era la causa de la mitad de las muertes en Europa Occidental y Estados Unidos. Todavía no se conoce bien su patogenia, aunque en los últimos 15 años ha aumentado considerablemente nuestro conocimiento sobre sus mecanismos por dos razones: en primer lugar, ha habido importantes avances en las técnicas de biología celular, molecular e inmunohistoquímica aplicadas al estudio de las células que componen la pared vascular (músculo liso y endotelio); en segundo lugar, ha progresado nuestro conocimiento de las alteraciones del metabolismo de los lípidos que se asocian a este trastorno.

2.-CONCEPTO DE ATEROSCLEROSIS. Estructura de la pared arterial

La alteración que subyace a este grupo de enfermedades es la afección del árbol vascular, conocida como “*arteriosclerosis*”, caracterizada por un proceso generalizado, relacionado muy directamente con la edad, y que se presenta con un aumento difuso del grosor de las capas íntima y media de las arterias, con pérdida de elasticidad de las mismas. Cuando este proceso tiene lugar sólo como consecuencia del envejecimiento y la involución del vaso, el fenómeno se conoce como “*angiosclerosis*”, y afecta, generalmente, a los vasos de mayor calibre. Sin embargo, en alguna forma de arteriosclerosis, este proceso tiene lugar de forma más notable, identificándose una lesión típica denominada *placa de ateroma*. Por tanto, la “*aterosclerosis*” es una forma de arteriosclerosis definida por este tipo de lesión y responsable, en último lugar, del mayor número de casos de morbilidad y mortalidad cardiovascular.

En líneas generales, más adelante se discutirá en profundidad, podemos definir la aterosclerosis como un proceso de origen multifactorial que cursa con la formación de engrosamientos focales de la íntima arterial, compuestos por una acumulación de lípidos, células y tejido fibroso que dan lugar a las anteriormente citadas placas de ateroma. Estas resultan de una respuesta inflamatoria y fibroproliferativa exagerada a distintos tipos de agresión al endotelio y al músculo liso de la pared vascular. Su formación es un proceso lento, a lo largo de años, que afecta inicialmente a la capa íntima arterial y, secundariamente, a capa media.

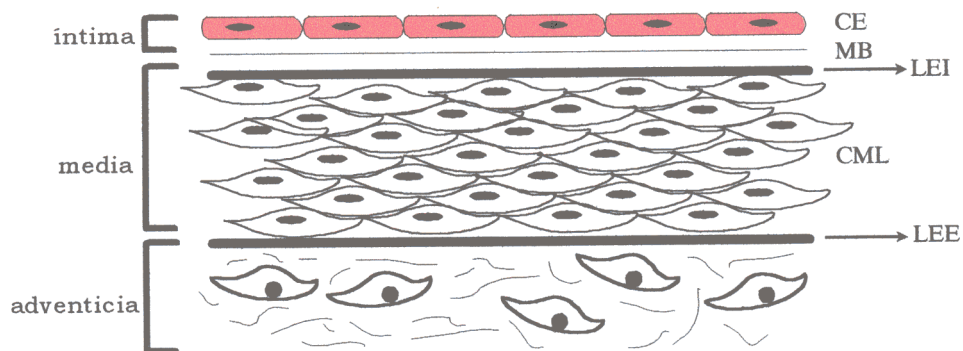
Las células que forman las lesiones ateromatosas son los macrófagos, las células musculares lisas (CML) y los linfocitos T. Por el contrario, los neutrófilos, aunque son capaces de destruir tejidos al secretar enzimas proteolíticas (Weiss, 1989), raramente se encuentran en las placas intactas (Jonasson et al., 1986). Se les puede encontrar ocasionalmente en placas fisuradas, probablemente como consecuencia de una infiltración desde el torrente sanguíneo (van der Wall et al., 1994).

Las arterias sanas están formadas por tres capas (Fig. 1):

- **Capa íntima:** es la más interna, está constituida por un monoestrato de células endoteliales en contacto con la sangre, una membrana basal muy delgada y una capa de colágeno, fibras elásticas, CML y algunos fibroblastos. La íntima actúa como barrera semipermeable para el paso de diversos componentes plasmáticos, como lípidos y células; además, produce una gran variedad de moléculas con propiedades antitrombóticas y vasotónicas.

- **Capa media :** está formada por CML y elementos de tejido conectivo (colágeno y fibras elásticas) permite las variaciones en el diámetro de la luz arterial y está separada de la íntima y de la adventicia por las láminas elástica interna y externa respectivamente.

- **Capa adventicia :** formada por tejido fibroblástico alberga los *vasa vasorum* y *vasa nervorum* e interviene en la nutrición de la capa media.



Abreviaturas: CE, célula endotelial; CML, célula muscular lisa; LEE, lámina elástica externa; LEI, lámina elástica interna; MB, membrana basal.

Figura 1. Esquema de las diferentes capas de una arteria sana.

3.- PATOGENIA DE LA ATEROSCLEROSIS

Desde el siglo pasado se han postulado distintas hipótesis sobre el origen de la aterosclerosis. La *hipótesis de la incrustación*, defendida por von Rokitansky (von Rokitansky, 1844) y más tarde ampliada por Duguid, proponía que el engrosamiento intimal era el resultado de depósitos de fibrina y otras sustancias sanguíneas que conducían a una organización de fibroblastos y a una deposición lipídica secundaria (Duguid, 1946).

En cambio 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 estos depósitos (Virchow, 1856).

Actualmente la hipótesis más aceptada es la formulada por Russel Ross (Revisión Ross et al, 1996), la llamada *hipótesis de la respuesta a la agresión*, 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. Dicha lesión no tiene por qué ser orgánica ni producir una denudación o rotura de la capa endotelial sino que basta 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 conduce a un proceso inflamatorio crónico que contribuye a la formación de la placa aterosclerótica.

La hipótesis caracteriza tres estadios en el desarrollo de la lesión :

(A) macrófagos ricos en lípidos y linfocitos T se acumulan para formar la *estría grasa*, (B) posteriormente ésta puede progresar a una *lesión fibroadiposa* con el acúmulo de macrófagos y CML que migran desde la capa media y (C) finalmente se forma la *placa fibrosa*, compuesta de tejido conectivo sobre un núcleo lipídico y de células necróticas. Las placas fibrosas pueden sufrir una rotura que ponga en contacto el núcleo lipídico, altamente trombogénico, con el torrente circulatorio, dando así lugar a la formación de un trombo que impida el flujo sanguíneo.

De acuerdo con la clasificación de Fuster (Jang et al., 1993), 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 del endotelio con daño intimal, pero la lámina elástica interna se mantiene intacta, mientras que en la lesión tipo III estaría afectada la íntima y la capa media.

3.1.- ¿QUE INICIA LA DISFUNCION ENDOTELIAL ?

Los factores que desencadenan el daño endotelial son desconocidos, siendo potenciales candidatos los llamados factores de riesgo coronario: las dislipemias, la hipertensión, el tabaco y la diabetes. En particular, numerosos datos genéticos, clínicos, experimentales y epidemiológicos resaltan el papel que juegan los lípidos en este aspecto. Además, en determinadas circunstancias, se piensa que las infecciones virales, el daño inmune o los niveles elevados de homocisteína también contribuyen al daño endotelial (Wilson, 1994).

La lesión aterosclerótica se caracteriza 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 se producen turbulencias del flujo sanguíneo (Asakura et al., 1990) y una menor fuerza de cizalla sobre la pared del vaso. En consecuencia, el endotelio expresa un fenotipo diferente y sus células no están alineadas como en el resto del vaso, sino dispuestas sin una orientación definida, existiendo además un aumento del recambio celular y una disminución de las uniones intercelulares. Esto 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 espacio subendotelial en cantidades que son reguladas por el endotelio y probablemente por la lámina elástica interna (Penn et al, 1993). Una elevación de los niveles plasmáticos de LDL conduciría a su acumulación en determinados lugares favorecida por los factores hemodinámicos (Tsao et al, 1996) y mecánicos arriba mencionados (Figura 2).

Debido a la tendencia de las LDL a unirse a proteoglicanos (glicoproteínas componentes de la matriz extracelular), se incrementaría el tiempo de residencia de estas moléculas en el espacio subendotelial (Tozer et al., 1997) y aumentaría la probabilidad de una oxidación oportunista, quizás por una producción de radicales libres del endotelio adyacente, por CML y/o macrófagos aislados (Morel et al, 1984) produciéndose las llamadas LDL oxidadas (LDLox).

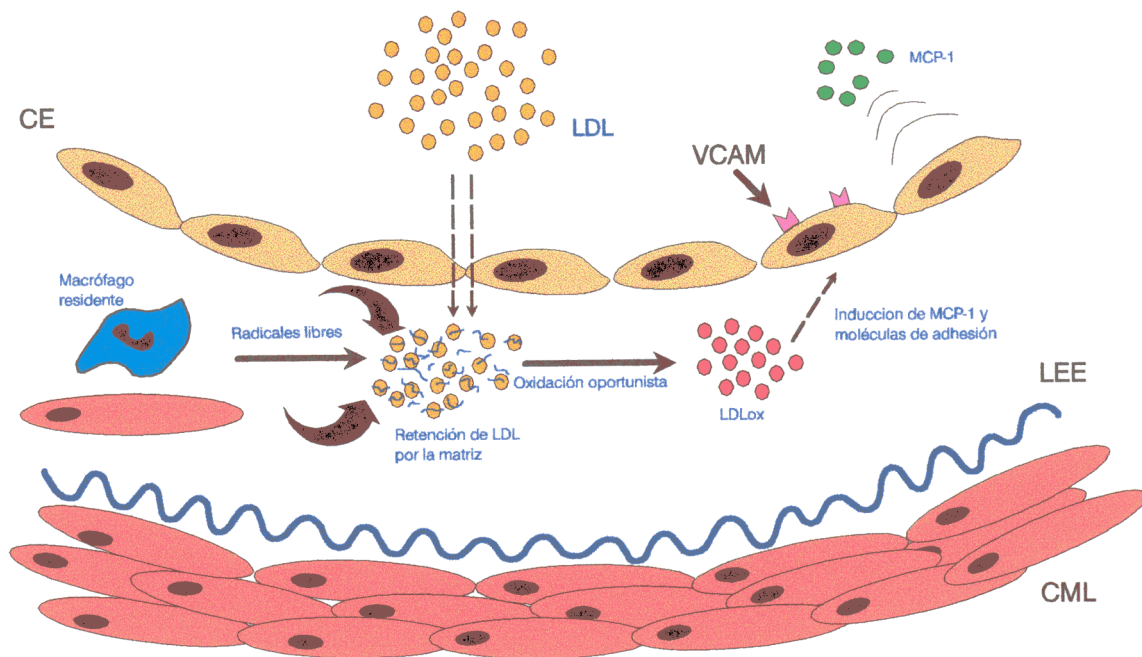


Figura 2. Esquema hipotético de la formación de la estria grasa. Las LDL penetran en la íntima y se van acumulando. En este proceso influye el recambio de células endoteliales, la concentración plasmática de las lipoproteínas y el tamaño de la íntima. Al quedar retenidas las LDL por la matriz extracelular se incrementa su tiempo de residencia en la íntima con lo que aumenta la probabilidad de una oxidación oportunista. La oxidación puede ser debida a radicales libres de oxígeno producidos por el endotelio, macrófagos y CML aisladas. CE: célula endotelial; CML: cél. muscular lisa; LDL: lipoproteína de baja densidad; LDLox: LDL oxidada; LEE: lámina elástica externa; MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos; VCAM-1: molécula de adhesión celular vascular-1.

Las LDLox pueden dañar o activar el endotelio (Rangaswamy et al., 1997), incrementando el recambio de estas células y permitiendo la entrada de más macromoléculas plasmáticas. Estas lipoproteínas modificadas también estimulan la expresión de moléculas de adhesión (van der Wal et al., 1992) y la secreción de factores quimiotácticos, como la proteína quimiotáctica para monocitos (MCP-1) por las células endoteliales y CML (Cushing et al., 1990), incrementando la adhesión y migración de los monocitos y linfocitos T circulantes, además de fomentar la migración de CML hacia la íntima (Chatterjee et al., 1992).

La transmigración subendotelial de monocitos, debido a un gradiente de factores quimiotácticos, conduce al acúmulo de éstos en la íntima, donde son expuestos a diversos factores secretados por las propias células endoteliales (CE) y por las CML, que producen su activación y diferenciación a macrófagos (Figura 3).

Las LDL modificadas son reconocidas por unos receptores denominados receptores basurero o "scavengers" (Steinberg, 1997) que se encuentran en macrófagos (Brown et al., 1983; Acton et al., 1994) y en CML (Li et al., 1995). Este receptor, a diferencia del receptor LDL, no está regulado por el contenido de colesterol intracelular, por lo que los macrófagos y las CMLs se van cargando de lípidos formando las denominadas "células espumosas" (Mitchinson, 1994). La acumulación de estas células conduce al primer estadio de la aterosclerosis, *la estría grasa*.

3.2.- PROGRESION DE LA LESION

Tras la formación de la estría grasa, la acumulación continuada de lípidos y los productos liberados por los macrófagos, como el TNF- α (Dixit et al., 1990), IL-1 β (Dinarello, 1996), IL-8 (Apostolopoulos et al., 1996) y radicales libres de oxígeno, conducen a un mayor daño endotelial acompañado de citolisis. Por otro lado, las plaquetas junto con monocitos y CE, liberan factores mitogénicos como el PDGF (Billett et al., 1996), que estimulan la migración, proliferación y síntesis de matriz extracelular por parte de las CML. Todo ello da lugar a que la lesión progrese hacia una placa madura (Figura 3).

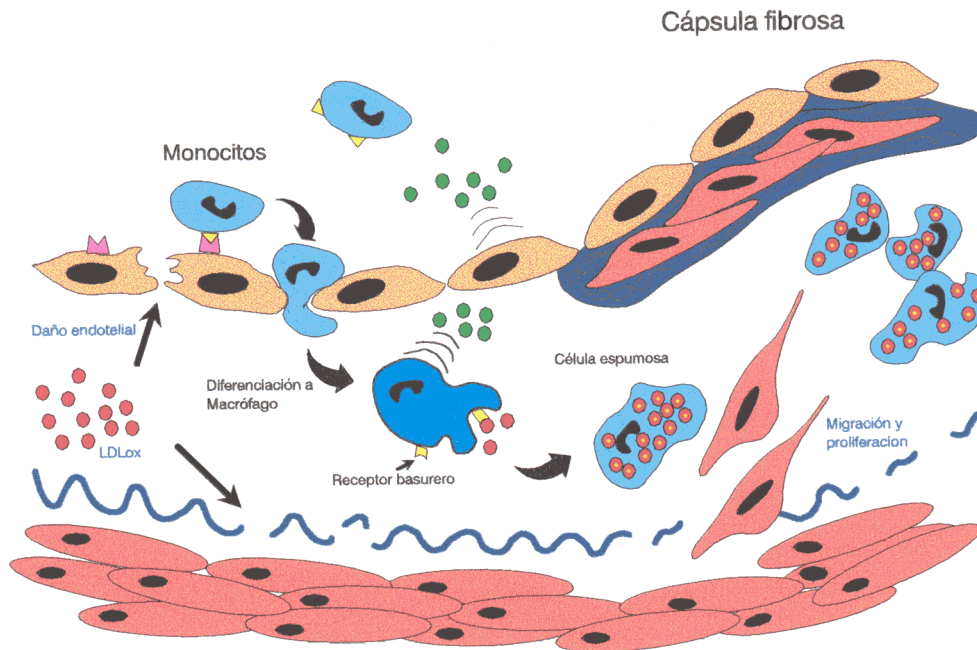


Figura 3. Esquema de la progresión de la lesión hacia una placa madura. Las LDLox pueden dañar la LEE y el endotelio permitiendo la entrada de más macromoléculas plasmáticas. Las LDLox pueden también facilitar la invasión de monocitos hacia la íntima al inducir MCP-1 y moléculas de adhesión superficial a las que se unen los monocitos. Estos se diferencian a macrófagos que toman las LDLox mediante el receptor basurero. Este a diferencia del receptor LDL, no está regulado por el contenido de colesterol intracelular, por lo que estos macrófagos y las CMLs se van cargando de lípidos formando las denominadas “células espumosas”. Todos estos eventos conducen al cambio de fenotipo de las CML que proliferan y migran hacia la íntima. Las CML se acumulan y producen colágeno originando la formación de la cápsula fibrosa.

La continua ingesta de LDLox por las células espumosas, por medio de los receptores basurero, provoca finalmente su rotura, con la consiguiente liberación de su contenido lipídico al medio extracelular. De esta manera se va formando un núcleo lipídico avascular e hipocelular, que es cubierto por una matriz extracelular rica en colágeno y elastina y por CML denominada *cápsula fibrosa* (figura 4).

Según Peter Libby, la cápsula fibrosa debe ser considerada como una estructura dinámica donde hay un equilibrio entre la síntesis de colágeno por las CML y su degradación (Libby, 1995).

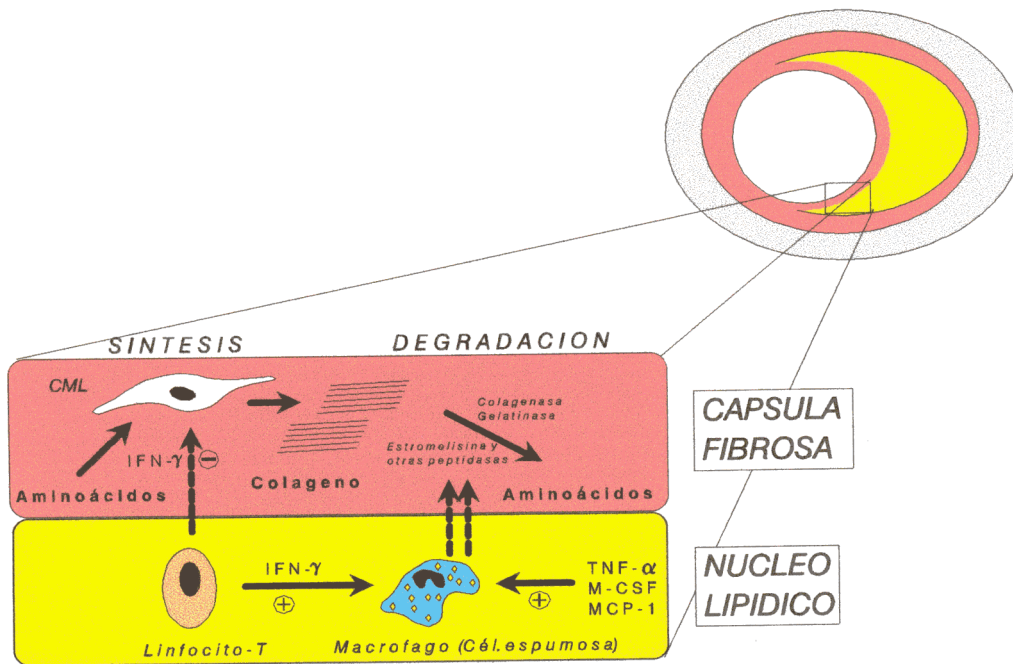


Figura 4. *Metabolismo del colágeno en la cápsula fibrosa.* Las CML sintetizan las proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno, a partir de aminoácidos. En una placa inestable, el interferón- γ (IFN- γ) producido por células T activadas puede inhibir la síntesis de colágeno, interfiriendo en el equilibrio existente entre síntesis y degradación de éste en la cápsula fibrosa. Los macrófagos activados secretan proteinasas que rompen el colágeno en péptidos y eventualmente en aminoácidos. Esta degradación de la matriz extracelular puede debilitar la cápsula fibrosa haciéndola más susceptible a la rotura y a la precipitación del síndrome coronario agudo. El IFN- γ secretado por los linfocitos T puede a su vez activar a los macrófagos. En las placas también hay otros activadores de macrófagos entre los que podemos destacar el TNF- α , M-CSF y el MCP-1.

La pérdida de CML, posiblemente por muerte apoptótica (Geng et al., 1995), y la liberación de factores como el IFN- γ (Hasson et al., 1989) conducen a una reducción de la síntesis de colágeno. Así mismo, los macrófagos liberan metaloproteinazas capaces de

degradar el colágeno que forma la cápsula. En conjunto se produce un desbalance entre síntesis y degradación de colágeno que lleva al debilitamiento de la placa haciéndola más propensa a la rotura.

3.3.- ROTURA DE LA PLACA

La presencia de un proceso immuno-inflamatorio en la placa aterosclerótica es considerado un mecanismo decisivo que conduce a su desestabilización, rotura y la subsecuente formación de un trombo, que es la base de las consecuencias clínicas más severas de la aterosclerosis (Figura 5). En este sentido los estudios *post-mortem* sobre la composición de la placa han demostrado que placas que producen una estenosis pequeña o moderada pero blandas y ricas en lípidos, son más propensas a romperse que aquellas que son más grandes pero que poseen una cápsula fibrosa más dura y gruesa (Revisado en Falk et al., 1996).

La mayoría de las trombosis de las lesiones ateroscleróticas van precedidas de una fisura en la placa que pone en contacto el núcleo lipídico, rico en factor tisular, con la sangre (Toschi et al., 1997; Fernández-Ortiz et al., 1994). Además, se ha demostrado la presencia de macrófagos y CML activadas en la proximidad de las zonas de fisura en placas de pacientes muertos por infarto agudo de miocardio (van der Wal et al., 1994). Por tanto, la reacción inflamatoria parece jugar un importante papel en la rotura de la placa.

Igualmente, se ha encontrado una mayor incidencia de infiltración de macrófagos en las muestras de aterectomía de pacientes con síndromes isquémicos agudos que en las procedentes de pacientes con angina estable (Moreno et al., 1994).

Estas células, como se ha mencionado anteriormente, son capaces de liberar enzimas proteolíticos que podrían degradar la cápsula de la lesión aterosclerótica, debilitándola y facilitando su rotura. De hecho, diversos grupos han encontrado aumentada la expresión de estos enzimas en la placa (Matrisian et al., 1992; Galis et al., 1994).

La presencia de macrófagos en la cápsula es debida a la liberación de sustancias quimiotácticas por las células residentes e infiltrantes. Entre éstas se halla el MCP-1, cuya presencia ya ha sido demostrada en lesiones ateroscleróticas humanas, fundamentalmente en las áreas infiltradas por macrófagos (Nelken et al., 1991; Ylä-Herttuala et al., 1991). Estudios recientes muestran que se encuentra más frecuentemente en las muestras de aterectomía procedentes de placas inestables, pacientes con síndrome coronario agudo, que en las de pacientes con angina estable (Weber KJ et al., 1995).

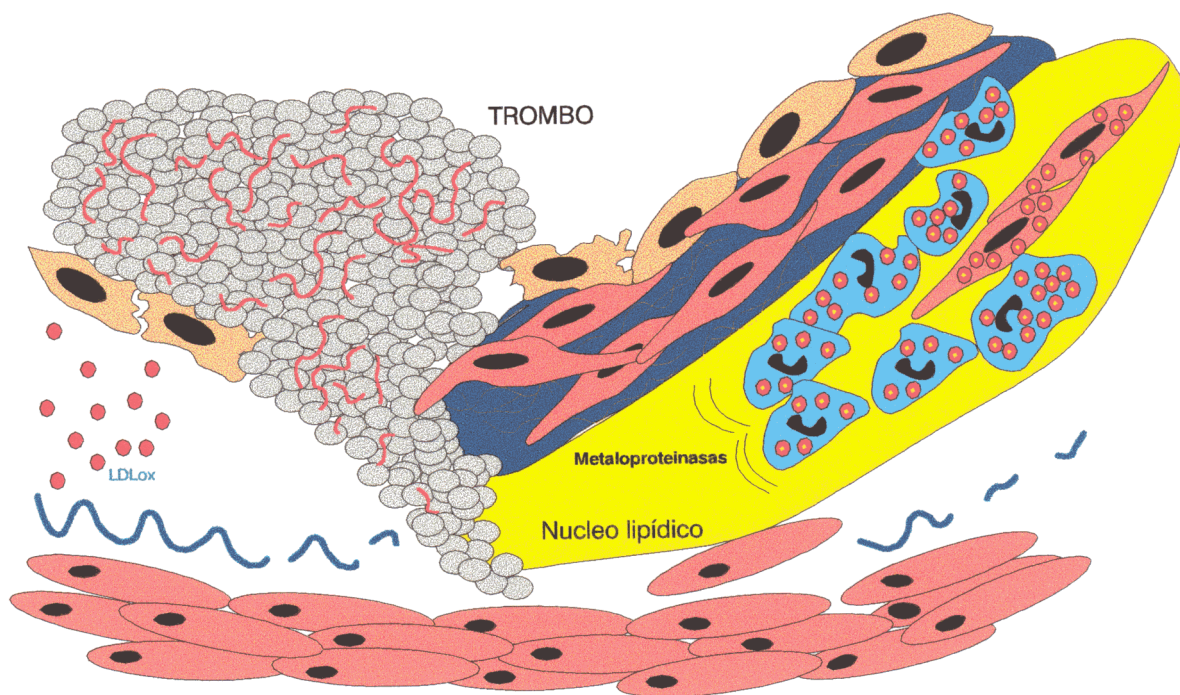


Figura 5. Esquema de una lesión avanzada con rotura de la placa y trombo.

La acumulación de células espumosas y la formación de un núcleo lipídico origina una placa blanda. Los macrófagos liberan metaloproteinasas que degradan las fibras de colágeno y elastina (en naranja) que dan consistencia a la cápsula fibrosa, debilitándola y favoreciendo así su rotura. El contacto de la sangre circulante con el núcleo lipídico, rico en sustancias procoagulantes, provoca la formación de un trombo.

4.- INTERACCIONES CELULARES EN LA ATEROGENESIS

4.1.- EL ENDOTELIO

El endotelio es un regulador importante de la homeostasia vascular (Dicorleto et al., 1993). El normal funcionamiento de las células endoteliales (CE) que recubren las paredes de los vasos sanguíneos ayuda a mantener una circulación fluida, produce factores antitrombóticos y fibrinolíticos, media el tono vascular con la producción de sustancias vasoconstrictoras y vasorelajantes y modula el crecimiento de los vasos sanguíneos. La disfunción de las células endoteliales provocada por estímulos fisiopatológicos contribuye a la iniciación y progresión de la enfermedad vascular (Gimbrone, 1995).

4.1.1.-Funciones del endotelio

El endotelio vascular cumple una serie de funciones que mantienen una correcta homeostasis (tabla I). La estructura morfológica (Stary et al, 1992) y la estratégica posición anatómica de las CE crea una barrera selectivamente permeable entre las CML vasculares y componentes de la circulación como plaquetas, monocitos, lipoproteínas y hormonas (Ross, 1993).

Dado que la superficie luminal deber ser no adhesiva para mantener la fluidez de la circulación, las CE producen y liberan factores antitrombóticos, anticoagulantes y fibrinolíticos. Entre éstos cabe destacar las prostaciclina (PGI_2) y el NO, potentes vasodilatadores e inhibidores de agregación plaquetaria (Griendling et al., 1996).

Cuando se produce la disfunción endotelial, se disminuye la producción de PGI_2 y de EDRF-NO, lo que hace a las CE más trombogénicas que las de un endotelio sano. Como resultado se incrementa la expresión de moléculas de adhesión (O'Brien et al., 1996; Jang et al., 1994) fomentándose la acumulación de macrófagos en la íntima subendotelial (Steinberg D, 1997; Richardson et al., 1994). Además, al secretarse citoquinas y factores de crecimiento se potencia la migración y proliferación de las CML.

Tabla I. Características de un endotelio en estado normal y dañado

Función	Normal	Dañado
Permeabilidad	Limita el paso de grandes moléculas	Se incrementa el paso de grandes moléculas (LDL...) hacia el subendotelio
Trombogenicidad	Las plaquetas son repelidas por cargas negativas de superficie y su agregación es inhibida por la producción de PGI ₂ y EDRF-NO. Se promueve la trombolisis al producirse tPA.	Se promueve la actividad protrombótica mediante la secreción de PA-I y TF. Disminuye la producción de PGI ₂ , tPA y EDRF-NO.
Tono vasomotor	Producción de factores vasodilatadores como EDRF-NO y PGI ₂ .	Se promueve la vasoconstricción con ET-1, ANG II y prostaglandinas vasoconstrictoras.
Migración y proliferación de CML	Producción de heparán sulfato y EDRF-NO que inhiben la migración y proliferación de las CML.	Aumento de la secreción de PDGF y ET-1 que inducen migración y proliferación de CML.
Inflamación	Los leucocitos no se adhieren a la superficie endotelial.	Los leucocitos son reclutados en el lugar donde se ha producido el daño mediante la expresión por el endotelio de moléculas de adhesión. Los linfocitos T son reclutados al expresar las CE proteínas del complejo principal de histocompatibilidad y moléculas de adhesión.

Abreviaturas: ANG II: angiotensina II; CE: célula endotelial; CML: célula muscular lisa; ET-1: endotelina-1; EDRF-NO: factor relajante derivado del endotelio-óxido nítrico; PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas; PGI₂: prostaglandina I₂; tPA: activador tisular del plasminógeno; PA-I: inhibidor del activador del plasminógeno; TF: factor tisular.

4.2.- LA CELULA MUSCULAR LISA

El tamaño, elasticidad e integridad de las arterias viene determinado por las células de musculo liso (CML) de la capa media y por la matriz de tejido conectivo compuesto por colágeno, elastina y proteoglicanos, sintetizados y depositados por éstas. En las arterias sanas, las CML son las principales componentes de la capa media, aunque también están presentes en la íntima de algunos segmentos arteriales (Stary et al., 1992).

4.2.1.- Modulación fenotípica de la CML

En la aterosclerosis, el principal evento que conduce a la fibroproliferación es la modulación del fenotipo de la CML en el área más próximo a la íntima. En respuesta a diferentes estímulos las CML pueden presentar dos fenotipos distintos, el contráctil (el predominante) y el sintético (Owens, 1996). Cuando presentan el fenotipo contráctil, responden a factores que inducen cambios vasomotores. Por el contrario, en el estado sintético son capaces de expresar genes de factores de crecimiento y proteínas de matriz extracelular (Ross, 1993). Este fenotipo es característico de las lesiones ateroscleróticas.

La fibronectina es un conocido promotor del cambio de fenotipo contráctil al sintético, mientras que la laminina y los eicosanoides tienen el efecto contrario (Raines et al., 1993).

4.2.2.- Migración y proliferación

La primera acción de las CML una vez que adquieren el fenotipo sintético es migrar hacia la lámina elástica interna en respuesta a factores quimiotácticos producidos por macrófagos y células endoteliales, como el PDGF (Okazaki et al., 1992). Los distintos factores estimulatorios e inhibitorios de la migración, proliferación o cambio fenotipo se muestran en la tabla II.

La proliferación de las CML en las lesiones ateroscleróticas es episódica existiendo periodos cortos de rápida proliferación separados por otros más largos de estado quiescente. Estas observaciones son consistentes con la posibilidad de que el crecimiento de las placas pueda ser episódico, particularmente en la lesión coronaria, donde el riesgo de fisura y trombosis aumenta a medida que la placa progresa (Fuster et al., 1990).

4.2.3.- Acumulación y oxidación de lípidos

Tanto los macrófagos como las CML pueden acumular lípidos transformándose en células espumosas en las lesiones ateroscleróticas (Ross, 1986). Aunque las CML y los macrófagos, son capaces de modificar las lipoproteínas mediante oxidación y así aumentar su aterogenicidad (Steinberg et al., 1989), los receptores de las LDLox se encuentran raramente asociados con áreas ricas en CML.

Tabla II. Factores estimulantes e inhibitorios de la migración, proliferación y fenotipo de las células musculares lisas.

Factores	Fuente	Proliferación*	Migración*	Fenotipo†
(A) Factores de crecimiento y citoquinas				
Factor de crecimiento epidérmico (EGF)	P	+		
Factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF)	CE, M, CML	++	0	
Factor de crecimiento epidérmico que une heparina (HB-EGF)	CE, M, CML	++	+	
Factor de crecimiento de insulina (IGF-I)	CE, M, P, CML	+	+	
Interferón- γ (IFN- γ)	M, T	\pm		
Interleuquina-1 (IL-1)	CE, M, P, CML, T	+		
Interleuquina-6 (IL-6)	CE, M, CML, T	+		
Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF)	CE, M, P, CML	+	+	
Trombina	PI	+		
Factor de crecimiento transformante α (TGF α)	M	+		
Factor de crecimiento transformante β (TGF β)	CE, M, P, CML, T	\pm	+	
Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)	CE, M, CML, T	+		
(B) Agentes vasoactivos, prostaglandinas y leucotrienos				
Angiotensina II (Ang II)	CE, PI, CML	+ §		
Polipéptido natriurético atrial (ANP)	MC	-		
Factor relajante derivado del endotelio-Oxido Nítrico (EDRF-NO)	CE, M, NP, CML	-		
Endotelina-1 (ET-1)	CE, M, P, PI	+		
Adrenalina/Noradrenalina	HA	+		
Acido hidroxieicosatetraenoico-12 (HETE-12)	P	+		
Leucotrieno B ₄ (LTB ₄)	N		+	
Prostaciclina (PGI ₂)	CE, CML	-		
Prostaglandina E ₁ (PGE ₁)	CE, CML	-		S
Serotonina	P	+ §		
Sustancia P	NP	+		
Vasopresina	NP	+ §		
(C) Matriz extracelular				
Fibronectina (FN)	CE, M, P, PI, CML	+		S
Heparina	CE, CML	-	-	
Laminina	CE, CML			C
Osteonectina (SPARC)	CE, CML, P		-	
Tenascina (TN)	CML			
Trombospondina (TSP)	CE, CML, P	+		

Abreviaturas: CE, célula endotelial; CML, célula muscular lisa; HA, hormona adrenal; M, monocito/macrófago; MC, miocito cardiaco; N, neutrófilo; NP, neuropéptido; P, plaquetas; PI, plasma; T, células T.

* +, estimulatorio; -, inhibitorio; \pm , estimulatorio o inhibitorio, dependiendo de las condiciones.

† S, sintético; C, contráctil.

§ estimulación de hipertrofia celular, pero no de proliferación.

4.3.- MONOCITO/MACROFAGO

El fagocito mononuclear es un elemento muy importante en el mecanismo de defensa, ya que puede secretar mediadores y enzimas, presentar antígenos y actuar como célula basurero o “scavenger”.

Los macrófagos están presentes en todos los estadios de la aterosclerosis y aunque son capaces de producir sustancias que pueden estimular la progresión de la lesión, quizás el papel alternativo de estas células en los primeros estadios de la enfermedad probablemente sea el de respuesta de protección. Sin embargo, con una inflamación crónica y un influjo de monocitos continuado, esa respuesta protectora se convierte en parte en la responsable de la progresión de la lesión.

4.3.1.- Adhesión y migración

Uno de los fenómenos iniciales que se observan en el proceso aterogénico es la adhesión de monocitos al endotelio vascular y posterior migración a la íntima (Rosenfeld et al., 1987). Este proceso está mediado por la expresión de moléculas de adhesión en las células endoteliales, tales como la molécula de adhesión de células vasculares-1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) (Faruqi et al., 1993).

Entre los muchos estímulos que inducen la expresión de estas moléculas destacan la reducción del flujo sanguíneo en determinadas regiones del árbol arterial (Tsao et al., 1996) y un componente de las LDLox, la lisofosfatidilcolina (Kume et al., 1992). El aumento de la adhesión de los monocitos a la pared del vaso también está mediado por un incremento de la expresión de ligandos de moléculas de adhesión en la superficie de los monocitos. Estos ligandos pertenecen a la familia de las integrinas, como la integrina $\alpha_4\beta_1$ (Smyth et al., 1997; Hogg et al., 1993).

La migración de los monocitos hacia el espacio subendotelial ocurre en respuesta a un gradiente de factores quimiotácticos como el MCP-1 (Nelken et al., 1991), TNF- α (Tipping et al., 1993), IL-1 β (Moyer et al., 1991) y M-CSF (Clinton et al., 1992; Rosenfel et al., 1992), que pueden ser producidos por CE, CML, y/o macrófagos ya residentes en la íntima.

4.3.2.- Activación y diferenciación

Una vez llegado a la íntima, el monocito es expuesto a multitud de factores como lipoproteínas modificadas, citoquinas, sustancias quimiotácticas y factores de crecimiento, que pueden inducir su activación y diferenciación hacia macrófago (Raines et al., 1996). Los macrófagos activados producen moléculas biológicamente activas como citoquinas, factores de crecimiento y radicales libres (tabla III), que modulan la actividad de las células de su alrededor (Adams et al., 1992). Algunos de estos productos secretados actúan como reclutadores de monocitos circulantes y de CML de la capa media, contribuyendo de esta forma a la amplificación de la inflamación. Además, experimentalmente se ha podido comprobar que los macrófagos son capaces de proliferar contribuyendo así al crecimiento de la lesión (Rosenfeld et al., 1990).

4.3.3.- Muerte macrofágica y formación del núcleo necrótico

La presencia del núcleo necrótico es característica de la lesión aterosclerótica avanzada (revisado en Falk et al., 1996). Generalmente es una región acelular rica en lípidos, situada en la base de la placa, que contiene restos celulares y puede llegar a estar calcificada. Se postula que su formación es debida, entre otros factores, a las células espumosas derivadas de macrófagos que quedan atrapadas en el interior de la lesión (Quinn et al., 1988) y mueren por apoptosis (Han et al., 1994), por hipoxia o por efectos citotóxicos de lípidos oxidados o citoquinas producidas por otras células; al morir, los macrófagos liberan al medio extracelular los lípidos almacenados y enzimas proteolíticas que afectan a la estabilidad de la placa (Moreno et al., 1994).

Tabla IV. Algunos factores expresados por monocitos/macrófagos en la aterosclerosis

Molécula	Posible papel
Citoquinas	
Interleuquina-1 (IL-1)	Aumenta la expresión de moléculas de adhesión, induce proliferación y migración de CML, modulación inmune e inducción de genes secundarios.
interleuquina-6 (IL-6)	Activación de la coagulación e inducción de genes secundarios en las CML.
Interleuquina-8 (IL-8)	Reclutamiento de linfocitos y células endoteliales.
Proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1)	Reclutamiento de monocitos, activación de las integrinas β_2 .
Factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF)	Reclutamiento, proliferación y supervivencia de monocitos.
Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)	Aumenta la expresión de moléculas de adhesión endoteliales, quimiotáctico de monocitos y proliferación de CML.
Enzimas e inhibidores	
Colagenasa	Degradación de matriz, migración celular, expansión y rotura de la placa.
Complemento C3b	Protrombótico y estimulación de la toma de lipoproteínas.
Factor XIIIa	Protrombótico.
Gelatinasa	Degradación de matriz, migración celular, expansión y rotura de la placa.
Lipoproteína lipasa	Alteración del metabolismo lipoproteico e hidrólisis de VLDL.
15-Lipoxigenasa	Oxidación de LDL y formación de células espumosas.
Inhibidor de la activación del plasminógeno (PA-I)	Antifibrinolítico.
Estromelisinina	Degradación del tejido conectivo, migración celular, posible expansión y rotura de la placa.
Inhibidores de metaloproteinasas (TIMP 1 y 2)	Prevención de la degradación de matriz.
Proteínas extracelulares	
Osteopontina	Adhesión celular, migración, neovascularización y calcificación.
Osteonectina	Migración celular y neovascularización.
Trombospondina	Migración celular y neovascularización.
Sustancias reguladoras de la migración y crecimiento de otras células	
Factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF)	Quimiotáctico de células endoteliales e inductor de proliferación.
Factor de crecimiento epidermal que une heparina (HB-EGF)	Quimiotáctico de CML e inductor de proliferación.
PDGF	Quimiotáctico de CML e inductor de proliferación.
Endotelina-1	Vasoconstricción.

4.4.- LINFOCITOS T

Estudios inmunohistoquímicos han demostrado que aproximadamente el 25% de las células de la cápsula fibrosa son linfocitos T y muchos de éstos están activados (O'Brien et al., 1996; Hansson et al., 1989), por lo que se puede considerar que en el desarrollo de la aterosclerosis también participa de alguna forma una respuesta inmune. Estos linfocitos T pueden liberar factores tales como IL-1 β e IFN- γ que pueden promover o retardar el desarrollo de la lesión (Hansson, 1994; Kishikawa et al., 1993). Los antígenos que provocan esta respuesta no se conocen bien todavía, pero como principales candidatos, entre otros, destacan los constituyentes de las lipoproteínas modificadas, fragmentos de Apo B y las llamadas proteínas de choque térmico (Frostedgard et al., 1996; Kiessling et al., 1991). De los distintos fenotipos de los linfocitos T, el predominante en los estadios iniciales de la lesión es el CD8⁺ que responde a antígenos de la clase HLA de clase I (Benditt et al., 1983).

Como se ha podido comprobar en algunos modelos experimentales (Richardson et al., 1994), el reclutamiento de linfocitos T se produce como consecuencia de la expresión focal en el endotelio de moléculas de adhesión como el VCAM-1 (Jang et al., 1994), a las que se unen receptores de superficie denominados integrinas (CD11/CD18) que se expresan en los linfocitos. Estos entran en la íntima siguiendo un gradiente de concentración de agentes quimiotácticos, como el MCP-1 o fragmentos peptídicos (C3a, C5a) producidos por la activación del complemento (Seifert et al., 1989). Una vez en la íntima son activados por macrófagos y ambos van a producir citoquinas que actúan sobre las células endoteliales, CML, macrófagos y células espumosas para regular la expresión de moléculas de adhesión, quimiotaxis, actividad procoagulante, proliferación, contractilidad y toma de colesterol, incrementándose de este modo el tamaño de la lesión.

5.- MATRIZ EXTRACELULAR VASCULAR

La matriz extracelular está formada por una serie de componentes que no sólo mantienen la estructura de la pared del vaso, sino que también regulan eventos claves de su fisiología al interactuar con las células vasculares, participando en la regulación de la adhesión, migración y proliferación durante el desarrollo vascular.

La composición de la matriz extracelular está controlada por una regulación coordinada y diferencial de la síntesis y reciclamiento de cada uno de sus componentes. Esta regulación produce diferencias en la composición de la matriz durante el desarrollo vascular entre las distintas capas de la pared del vaso. El correcto balance de los componentes de cada capa es esencial para el mantenimiento de la integridad de la pared vascular y para su resistencia a roturas y hemorragias. Un desbalance entre la síntesis y degradación de la matriz extracelular conduce a que la lesión progrese.

Los principales componentes de la matriz extracelular se muestran en la tabla IV, de ellos los más importantes son los colágenos. De los 19 subtipos de colágenos genéticamente distintos que se conocen, seis están presentes en los vasos (I, III, IV, V, VI, VIII) (Rauterburg et al., 1993; Katsuda et al., 1992).

5.1- COLAGENOS

Los colágenos son componentes muy importantes de la lesión aterosclerótica, no sólo porque representan su principal constituyente extracelular sino porque también juegan un papel decisivo en la hemostasis y trombosis a través de la estimulación de las plaquetas (Barnes, 1985). Su presencia en la cápsula fibrosa es esencial ya que las cápsulas delgadas y con escaso contenido en colágeno son más propensas a la rotura (Loree et al., 1992). Esto se ha visto en placas de aorta humana donde aquellas que han sufrido rotura tenían menos colágeno que las intactas (Burleigh et al., 1992).

Van der Wal y colaboradores han observado que las placas coronarias más fibrosas, que son las más resistentes a la rotura, tienen más contenido en colágeno y en CMLs, mientras que las más ricas en lípidos tienen una cápsula fina compuesta por una matriz laxa y con infiltrados de macrófagos y células T (van der Wal et al., 1994).

Tabla V. *Algunos de los componentes de la matriz extracelular vascular*

Fibras de colágeno	Membrana basal
Colágeno tipo I	Colágeno tipo IV
Colágeno tipo III	Colágeno tipo VIII
Colágeno tipo IV	Laminina
Colágeno tipo V	Perlecano
Colágeno tipo VI	Proteoglicanos
Glicoproteínas	Ac. hialurónico
Fibronectina	Versicano
Trombospondina	Decorina
Tenascina	Biglicano
Osteopontina	Lumicano
Fibras elásticas	Perlecano
Elastina	
Fibrilina	

De los distintos tipos de colágenos, el **colágeno I** es el mayoritario, representando el 80-90% de los colágenos totales del vaso (Rekhter et al., 1993; Sakata et al., 1993). En la enfermedad vascular, su expresión se produce principalmente en la cápsula fibrosa y regiones vascularizadas de placas primarias, presentando mucho menos colágeno I el centro de la placa donde el contenido lipídico es mayor. Este colágeno no sólo participa en el mantenimiento de la estructura de la placa sino que también interacciona con las CMLs induciendo el cambio del fenotipo contráctil al sintético (Barnes et al., 1985).

6.- EL FACTOR NUCLEAR- κ B EN LA PATOLOGÍA VASCULAR

NF- κ B es el nombre genérico de una familia de factores de transcripción diméricos (NF- κ B/Rel), formados por monómeros que tienen una región de aproximadamente 300 aminoácidos denominada Rel, que se une a la secuencia específica (κ B) del DNA, presente en el promotor de los genes que regula.

La forma clásica del NF- κ B es un heterodímero (p50-p65) que se encuentra en forma inactiva en el citoplasma formando complejo con su inhibidor I κ B (Bauerle et al., 1996) (Figura 6). La activación de NF- κ B, por diversos factores como mediadores inflamatorios (Thamos et al., 1995), virus, LDL mínimamente modificadas (Berliner et al., 1995) o fuerzas de cizalla (Khachigian et al., 1995), implica la disociación del I κ B, previa fosforilación y posterior degradación (Sun et al., 1993), y la translocación del heterodímero al núcleo uniéndose a la secuencia específica del DNA.

Este factor controla la transcripción de múltiples genes de proteínas relacionadas con procesos inflamatorios, incluyendo genes de moléculas de adhesión (Collins et al., 1995), quimioquinas como MCP-1 e IL-8 (Ueda et al., 1994; Ferran et al., 1995) y el PDGF (Khachigian et al., 1995). Por este motivo el NF- κ B es un elemento clave en la respuesta inflamatoria y representa una diana molecular interesante para el desarrollo de terapias anti-inflamatorias.

Otro factor de transcripción nuclear implicado en la aterosclerosis es la proteína activadora-1 (AP-1) (Karin, 1995), formado por las proteínas cJun y cFos que dan lugar a homo o heterodímeros (Jun-Jun o Fos-Jun). El AP-1 está implicado en la regulación de genes relacionados con el crecimiento (Angel et al., 1990) y con la expresión del colágeno I, principal proteína de matriz que se encuentra en las lesiones ateroscleróticas (Chung et al., 1996).

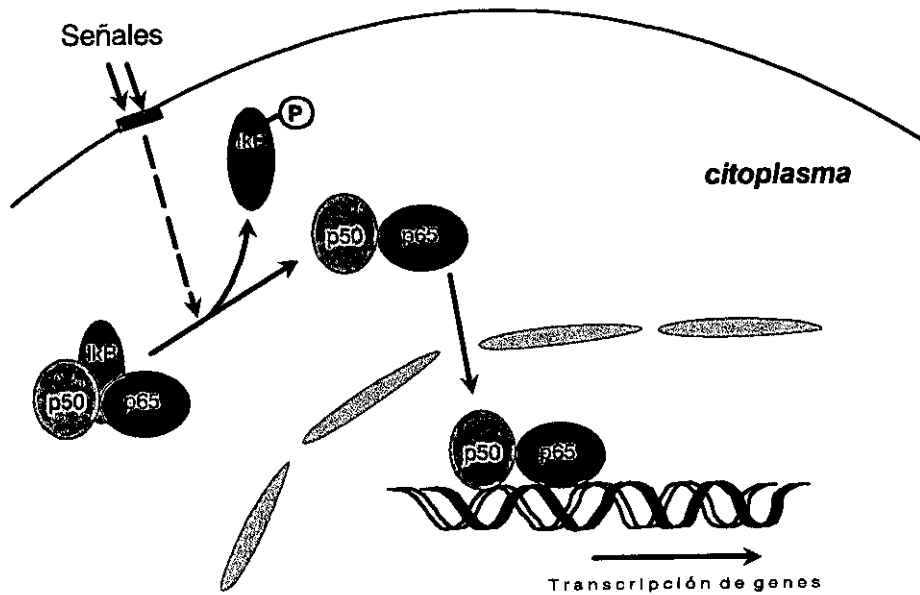


Figura 6. Esquema de la activación del factor nuclear- κB . El factor nuclear κB es un complejo dimérico que se forma por la combinación de los distintos miembros de la familia Rel, como es el caso del p50 y p65, dicho complejo se encuentra inactivo en el citoplasma al estar unido a una proteína inhibitoria denominada I κB . El NF- κB puede ser activado por múltiples estímulos extracelulares que activan una serie de señales de transducción que conducen a la fosforilación del I κB y a su posterior degradación. Esto permite la translocación del dímero al núcleo donde se une al DNA, participando de este modo en la activación de la transcripción de diversos genes implicados en la respuesta inflamatoria.

7.- SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA VASCULAR

El sistema renina-angiotensina (SRA) desarrolla un importante papel en la homeostasis circulatoria (Dzau et al., 1991). En el SRA sistémico, la renina segregada por el riñón convierte en angiotensina I el angiotensinógeno segregado por el hígado (figura 7). Finalmente, la angiotensina I es convertida en angiotensina II (Ang II) por el **enzima de conversión de la angiotensina (ECA)** presente principalmente en el endotelio vascular pulmonar. Sin embargo, se ha demostrado que los componentes del SRA también son sintetizados por las células de la pared vascular (Diet et al., 1996; Lindpainter et al., 1993).

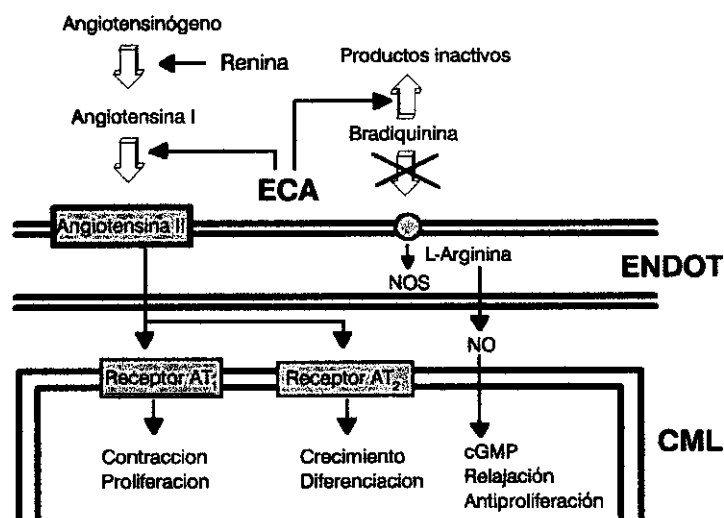


Figura 7. Esquema de los componentes del sistema renina-angiotensina.

Abreviaturas: ECA: enzima de conversión de la Angiotensina; NOS: óxido nítrico sintasa; NO: óxido nítrico; ENDOT: endotelio; CML: célula muscular lisa.

Sólo existen dudas de que la renina sea sintetizada en la propia pared vascular o simplemente sea captada del plasma. En todo caso, lo importante no es su procedencia sino el hecho de que una vez en la pared vascular parece regularse de manera independiente a la plasmática (Dzau et al., 1994).

La confirmación a nivel experimental de que la concentración de ECA tisular es la que controla la producción local de Ang II (Rakugi et al., 1994; Schunkert et al., 1990) demuestra que el SRA tisular es regulado independientemente del plasmático. La ECA no sólo produce Ang II, sino que también inactiva la ruta de las bradiquininas, que son potentes factores vasodilatadores y antiproliferativos (Hornig et al., 1997).

7.1.- ANGIOTENSINA II Y PATOGENIA VASCULAR

La Ang II es un potente vasoconstrictor que actúa a través de diferentes subtipos de receptores; existen al menos dos grandes grupos, denominados AT₁ y AT₂ que se diferencian por su unión a antagonistas, susceptibilidad a agentes reductores y segundos mensajeros. La mayoría de los efectos cardiovasculares de la Ang II están mediados por el receptor AT₁, mientras que el papel de los receptores AT₂ no está muy claro (Reagan et al., 1996).

La Ang II puede producir estrés oxidativo (Oskarsson et al., 1997) y elevar la presión sanguínea alterando de este modo la estructura y función arterial. La hipertensión puede incrementar la permeabilidad de las CE (Wiener et al., 1969) y producir una serie de cambios en dichas células que inducen aumento de la adherencia de leucocitos, acumulación de CML y macrófagos en el espacio subendotelial e incremento de la matriz extracelular (Takasaki et al., 1990).

En los últimos años se viene considerando a la Ang II como una citoquina más ya que parece estar implicada en la proliferación celular y en el acúmulo de matriz extracelular (Egido, 1996). Además, tiene un efecto directo sobre el desarrollo y migración de las CML al activar la expresión de factores de crecimiento como el PDGF, FGF y TGF- β (Itoh et al., 1993; Gibbons et al., 1992). También hay evidencias que muestran que la Ang II es quimiotáctico de monocitos (Goetzel et al., 1980) y tiene la capacidad de estimular la transformación de monocitos a macrófagos en presencia de LDLox y estos a su vez en presencia de estas lipoproteínas pueden provocar la expresión celular de ECA y posiblemente la síntesis de Ang II (Dzau et al., 1996). Estos datos sugieren que el sistema renina-angiotensina está implicado en la formación y progresión de la placa aterosclerótica.

7.2.- EFECTO DE LOS INHIBIDORES DE LA ECA EN LA ATEROSCLEROSIS

Pocos fármacos han tenido un impacto tan marcado en la Cardiología actual como los inhibidores de la ECA (iECAs). Se trata de un grupo de fármacos que se usaron en un principio como hipotensores y posteriormente han mostrado su eficacia en pacientes con disfunción sistólica ventricular izquierda (DSVI), como se ha podido comprobar en ensayos clínicos como el CONSENSUS (The CONSENSUS Trial study group, 1987) y el SOLVD (The SOLVD investigators, 1991) ya que disminuyen la mortalidad cuando se añaden al tratamiento convencional (Digoxina y diuréticos). De igual modo, si se administran tras un infarto de miocardio con DSVI, previenen la dilatación ventricular y reducen la mortalidad (Pfeffer et al., 1992). En los últimos años ha comenzado a especularse con la posibilidad de que, además, tengan acción antiaterogénica y puedan disminuir la incidencia de eventos isquémicos agudos ya que en los estudios SAVE (Pfeffer et al., 1992) y SOLVD, reducían la incidencia de angina inestable y de infarto de miocardio en un 15% y un 23%, respectivamente.

7.2.1.- Efecto sobre la formación y progresión de la placa

En el estudio TREND (Mancini et al., 1996), se ha visto que la administración del iECA quinapril durante seis meses normaliza la función endotelial en un 22% de los pacientes que previamente presentaban disfunción endotelial, esta acción se debe probablemente a una menor degradación del NO, potente vasodilatador, por una reducción de la producción de radicales superóxido o a un aumento de la síntesis de NO.

Por otra parte, se sabe que una vez producido el daño endotelial, la Ang II al ser quimiotáctica puede estimular la migración de neutrófilos y macrófagos hacia el interior del vaso (Farber et al., 1990) y además estimula el crecimiento y proliferación de CML, puesto que induce una serie de proto-oncogenes (c-fos, c-myc), citoquinas y factores de crecimiento como el PDGF (Lonn et al., 1994). Estos hechos hablan en favor de que los iECAs puedan interferir con las fases de formación y progresión lenta de la placa (Chobanian et al., 1990), aunque esto sólo se ha confirmado a nivel experimental (Clozel et al., 1993; Bell et al., 1990) y no en humanos.

7.2.2.- Efectos de protección en la rotura de la placa

Los iECAs son eficaces en la eliminación de radicales de oxígeno citotóxicos y LDLox, que son altamente aterogénicas y pueden ser captadas por los macrófagos que se van acumulando en la placa. En este sentido, se ha comprobado que el tratamiento con iECAs disminuye la infiltración de macrófagos y su contenido en colesterol en el modelo de aterosclerosis de conejo hiperlipémico, aumentando la matriz extracelular (Chobanian et al., 1990). Así pues, es posible que los iECAs reduzcan la tasa de eventos isquémicos agudos disminuyendo el infiltrado de macrófagos que, como hemos visto, pueden debilitar la placa y hacerla más susceptible a la rotura. Sin embargo, estos efectos no se han comprobado hasta ahora en un modelo de aterosclerosis inducido por hiperlipemia y daño vascular. Las lesiones así obtenidas tienen componente fibroso, celular y graso, y son más parecidas a las presentes en la aterosclerosis humana. Por otra parte no se ha descrito a qué nivel actúan los iECAs para reducir el infiltrado de macrófagos.

Otros autores han propuesto que los iECAs podrían reducir la incidencia de la rotura de la placa al disminuir la tendencia al vasoespasmo, producido por la liberación de factores vasoconstrictores como la endotelina-1. Sin embargo se trata de una hipótesis que no ha sido demostrada (Lonn et al., 1994).

7.2.3.- Efecto en la trombosis de la placa

No toda rotura de placa da lugar a un trombo oclusivo y, por tanto, a un evento isquémico agudo (Davies, 1997). El tamaño del trombo puede variar según el sustrato trombogénico de la placa y el estado de los mecanismos de coagulación y fibrinólisis en ese momento.

Estudios recientes en humanos muestran la implicación de la Ang II en la atenuación de la trombolisis al estimular el inhibidor del activador del plaminógeno (PAI) (Feener et al., 1995; van Leeuwen et al., 1994). Esto potenciaría la trombogénesis que sigue a la rotura de las placas y haría más probable que resultaran en una oclusión total o subtotal del vaso, dando lugar a los eventos isquémicos agudos (infarto de miocardio, angina inestable e, incluso, muerte súbita).

Parte de los efectos beneficiosos de los iECAs en la enfermedad coronaria pueden deberse a que interfieren con la formación de trombos sobre la lesión aterosclerótica. Así, se ha visto *in vivo* que reducen la agregación plaquetaria y la sensibilización a sustancias proagregantes inducida por la Ang II (Swartz et al., 1990). Además, como la expresión de PAI aumenta en presencia de Ang II (Vaughan et al., 1995) así como en respuesta al daño vascular en la neointima de la carótida de rata (Hamdan et al., 1996), la administración de iECAs puede favorecer la fibrinólisis.

Por otra parte, los iECAs aumentan la producción endotelial del activador del plasminógeno (t-PA) *in vivo* al evitar la degradación de la bradiquinina (Smith et al., 1985), e incrementan la producción de uroquinasa en cultivo de células endoteliales (Bell et al., 1992). En humanos, se ha demostrado que el Captopril reduce el incremento de los niveles plasmáticos de PAI-1 (Wright et al., 1994) que se produce en el post-infarto agudo de miocardio (IAM) y que podría constituir un factor de riesgo para reinfarto (Hamsten et al., 1987).

8.- LOS INHIBIDORES DE LA HMG-CoA REDUCTASA

Las evidencias experimentales y epidemiológicas que asocian los niveles de colesterol elevados, especialmente el colesterol LDL, y un riesgo aumentado de enfermedad coronaria (LaRosa et al., 1990; Pekkanen et al., 1990) han producido un enorme interés por el desarrollo de fármacos que reduzcan este riesgo; de este modo la inhibición de la síntesis de colesterol se ha convertido en uno de los objetivos principales del desarrollo farmacéutico.

A pesar de su reciente introducción para el uso clínico, los fármacos hipolipemiantes han demostrado una alta eficacia en reducir la incidencia de eventos isquémicos (Brown et al., 1996) y concretamente, los inhibidores de la HMG-CoA reductasa o estatinas disminuyen la mortalidad total y coronaria, tanto en prevención primaria (Shepherd et al., 1995) como secundaria (The 4S investigators, 1994). Estos efectos no son explicables por la escasa reducción en la progresión de las lesiones ateroscleróticas que consiguen (Brown et al., 1996) y se han atribuido a una posible acción estabilizadora de la placa. Por otra parte, los inhibidores de la HMG-CoA reductasa han demostrado, en modelos experimentales, que son capaces de estabilizar la placa aterosclerótica cuantitativamente (Dowell et al., 1995; Shiomi et al., 1995).

Una de las razones por las que la terapia dietética tiene una efectividad limitada para reducir los niveles de colesterol, es que la mayor parte de éste no se ingiere con la comida, sino que es fabricado en el hígado mediante el proceso de biosíntesis. Las estatinas reducen los niveles de colesterol al inhibir el paso limitante en la ruta de biosíntesis de este: la conversión del 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) en mevalonato mediante el enzima **HMG-CoA reductasa** (Figura 8). El bloqueo de este enzima deplecciona las células de derivados del ácido mevalónico, entre los que se encuentran los isoprenoides (Goldstein et al., 1990). La prenilación de proteínas representa un nuevo tipo de modificación post-traduccional y las proteínas isopreniladas juegan un papel fundamental en numerosos procesos celulares (Guijarro et al., 1997). Las proteínas de la familia Ras (proteínas G implicadas en la transducción de la señal desde diferentes receptores) son activas cuando están asociadas a la membrana y esta asociación depende de su unión covalente a un isoprenil de 15 carbonos (farnesil).

La expresión de formas activadas de Ras conduce a una activación de la transcripción específicamente a través del factor nuclear κ B (NF- κ B) (Finco et al., 1993). La disminución de la producción del colesterol endógeno induce un aumento de la expresión de receptores LDL, en la superficie de los hepatocitos, a los que se unen las LDL circulantes, reduciéndose los niveles de colesterol.

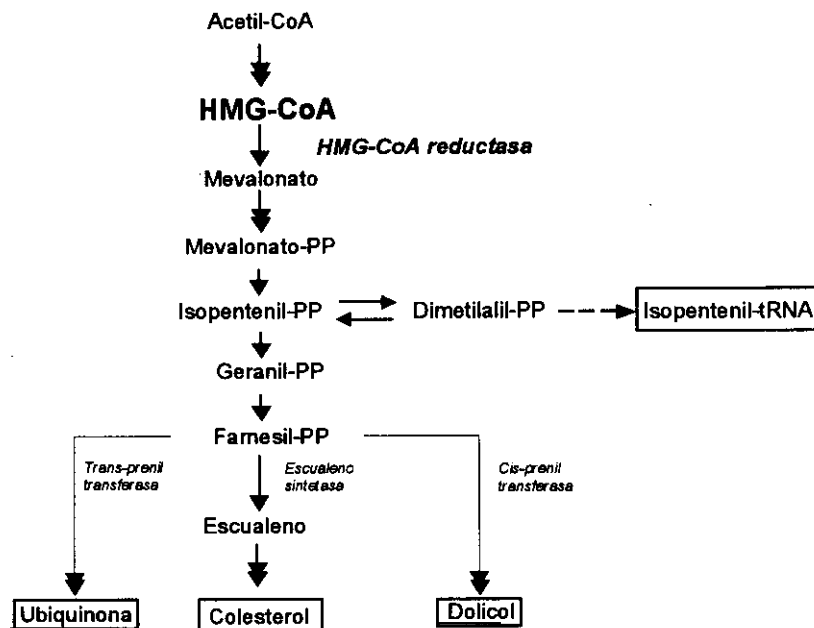


Figura 8. Ruta de biosíntesis del colesterol

8.1.- LAS ESTATINAS COMO TRATAMIENTO DE LA ATEROSCLEROSIS

El tratamiento de la aterosclerosis es un campo de investigación muy activo, donde se van diseñando nuevos fármacos que están siendo ensayados tanto a nivel experimental como clínico; el primero de éstos fue la compactina (Endo et al., 1976), seguido por lovastatina (Alberts, 1980), pravastatina (Tsujita et al., 1986), simvastatina (Stukker et al., 1985) y fluvastatina (Kathawala, 1991). Todos estos compuestos tienen un estructura de anillo similar al mevalonato (Figura 9) diferenciándose en su forma activa que puede ser con anillo abierto y con carácter hidrofílico (pravastatina y fluvastatina) o anillo cerrado y con carácter hidrofóbico (lovastatina y simvastatina). Estas características les confieren distintos niveles de eficacia (Bocan et al., 1994; Davignon et al., 1992).

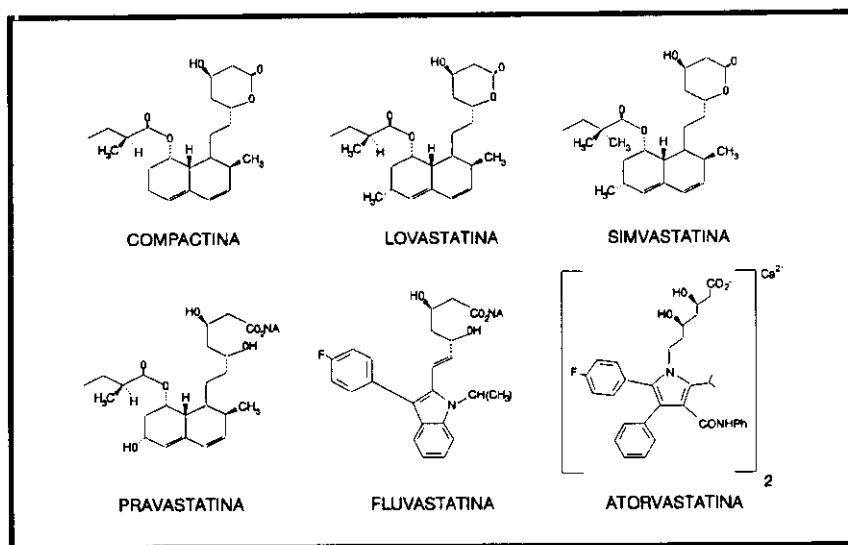


Figura 9. Formas estructurales de distintas estatinas.

Por otro lado, algunos estudios sugieren que los niveles elevados de triglicéridos plasmáticos también se correlacionan con un mayor riesgo de enfermedad coronaria, en especial cuando este tipo de dislipemia se asocia a unos niveles bajos de colesterol HDL (Assmann et al., 1992; Patsch et al., 1992).

En este sentido, estudios recientes implican a los niveles elevados de triglicéridos con el incremento de algunos factores de coagulación (VII_c, VIII_c y X_c) y con un aumento del PAI-1 (Silveria et al., 1994; Asplund-Carlson et al., 1993). Todo esto ha conducido a la obtención de una nueva estatina (Figura 9) denominada atorvastatina (Atv) que además de reducir los niveles de colesterol total y LDL, disminuye los triglicéridos (Bocan et al., 1994). En trabajos previos a nivel experimental atorvastatina es superior a lovastatina y a simvastatina en la reducción de la lesión aterosclerótica, atribuyéndose en parte a su acción directa sobre la pared vascular por su mayor carácter lipofílico y su posible mayor afinidad por el enzima (Bocan et al., 1994).

En resumen, los datos experimentales y los obtenidos en ensayos clínicos preliminares sugieren que las estatinas constituyen herramientas importantes dentro del arsenal terapéutico para tratar la hipercolesterolemia y para la prevención de la aterosclerosis.

II.- OBJETIVOS

Los síndromes coronarios agudos (SCA) se deben a la formación de un trombo sobre la placa aterosclerótica fundamentalmente por la rotura de la misma. En esta rotura juega un papel muy importante la inflamación, ya que las placas inestables presentan un gran infiltrado de macrófagos. En los últimos años, se ha visto que los inhibidores de la ECA y, sobre todo los inhibidores de la HMG-CoA reductasa son capaces de reducir la incidencia de SCA, aunque no se conoce el modo en que actúan. En el presente trabajo, pretendemos estudiar en un modelo de aterosclerosis focal los mecanismos por los cuales la inhibición de la ECA y del HMG-CoA reductasa podrían estabilizar las placas ateroscleróticas, centrándonos fundamentalmente en sus posibles acciones sobre el componente inflamatorio de las mismas.

Los objetivos concretos son los siguientes:

A. Evaluar en un modelo de aterosclerosis experimental el efecto del inhibidor de la ECA quinapril sobre diferentes parámetros relativos a la estabilidad de la lesión aterosclerótica:

1. Infiltrado de **macrófagos** y presencia de **colágeno I**.
2. Presencia de quimioquinas: **MCP-1** e **IL-8**.
3. Citoquinas proinflamatorias: **IL-1 β** y **TNF- α** .
4. Proliferación de CML: **PDGF-B**.
5. La activación de **NF- κ B**: factor nuclear implicado en el control de la transcripción de quimioquinas y la proliferación de CML. En esta parte nos centraremos tanto en su activación como en su localización en la lesión.

B. Determinar en un modelo similar el efecto de **atorvastatina**, un potente inhibidor de la HMG-CoA reductasa, sobre el **infiltrado de macrófagos** y la expresión de **MCP-1**, definiendo la implicación del **factor nuclear κ B** en este proceso.

C. Estudiar *in vitro* la participación de la **Ang II** y las **LDL** en la expresión de **MCP-1**, y su efecto sobre la activación del factor nuclear que lo regula, el **NF- κ B** en dos de los principales tipos celulares implicados en la patogenia de la aterosclerosis, los monocitos y las CML.

III.- MATERIALES Y METODOS

1.- MODELOS EXPERIMENTALES

1.1.- DISEÑO

Los estudios fueron realizados sobre conejos machos New Zealand de 3 a 4 Kg de peso (media $3,4 \pm 0,6$ Kg). Todos los animales fueron manipulados según la normativa de la UE (BOE 223/1988 y 265/1990). Se utilizó un modelo de aterosclerosis acelerada en el que se pretendió simular las lesiones que se desarrollan en humanos, es decir, focales, con cierto grado de estenosis y con una composición mixta fibrocelular. La aterosclerosis fue inducida mediante dieta hiperlipemiente combinada con desecación endotelial de un segmento aislado de arteria femoral (figura 10), según una técnica previamente descrita (Lee Veen et al., 1982).

Para realizar los estudios presentados en esta tesis se desarrollaron dos modelos experimentales:

Modelo A: donde se utilizó un inhibidor del enzima de conversión de la angiotensina (Quinapril).

Modelo B: donde se administró un inhibidor de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A reductasa (Atorvastatina).

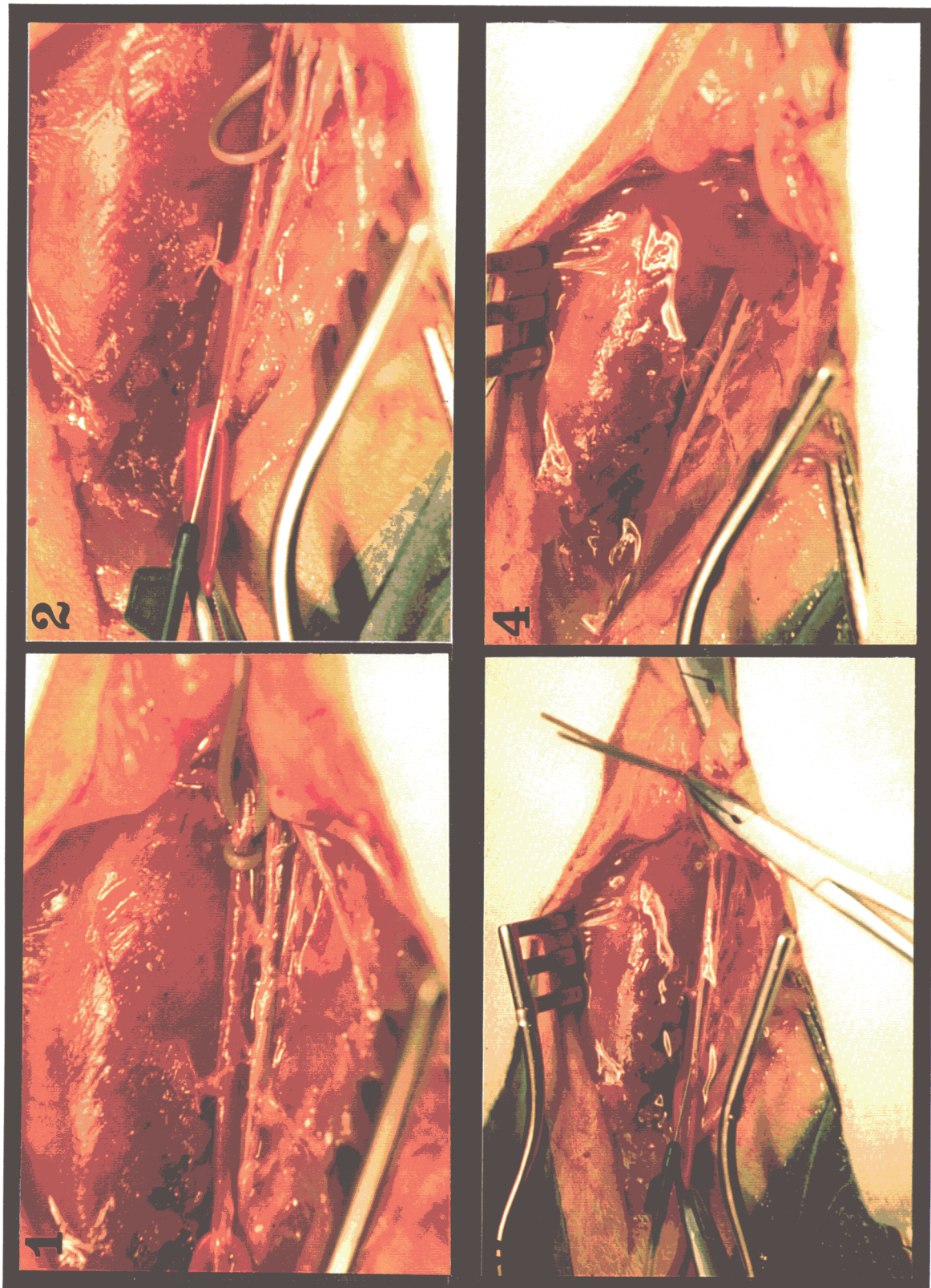


Figura 10. *Inducción de daño endotelial en la arteria femoral.* (1) Aislamiento de la arteria femoral, (2) la zona distal se canula y se infunde suero salino, (3) pase de N_2 durante 8 min. a 80 ml/min, (4) liberación de ligaduras.

1.1.1.- Modelo A

Con el fin de estudiar los procesos críticos que están implicados en la formación y progresión de la lesión aterosclerótica, se desarrolló un modelo experimental de acuerdo con el esquema que se muestra en la figura 11. Dicho modelo consta de los siguientes pasos:

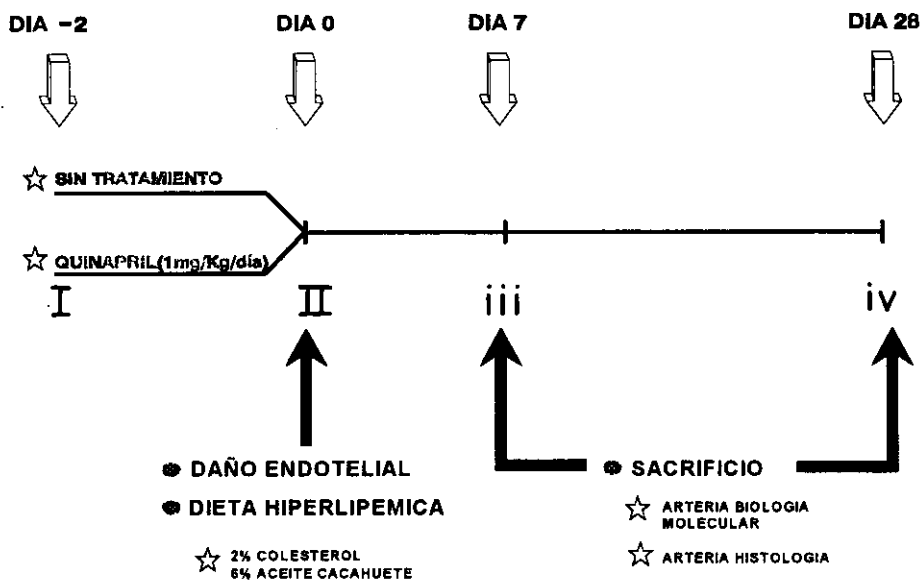


Figura 11. Esquema del modelo.

I.- Inicio del modelo

Se emplearon un total de 35 animales que fueron distribuidos al azar, dos días antes de la inducción del daño endotelial, en dos grupos:

- Grupo de tratamiento (Quinapril)
- Grupo sin tratamiento.

La distribución de los animales según los estudios realizados se muestra en la tabla V.

Tabla V. Distribución de los animales según los distintos estudios**Estudios de expresión génica e inmunohistoquímica (n=40)**

n=16 -----> Sin tratamiento

n=16 -----> Tratados

n=8 -----> Sanos a los que no se les indujo daño ni recibieron dieta aterogénica

Determinación de la actividad del factor nuclear κ B (n=18)

n=6 -----> Sin tratamiento

n=6 -----> Con tratamiento

n=6 -----> Sanos

Determinación de la actividad de la ECA vascular (n=18)

n=10 -----> Estos animales fueron sacrificados tras 2 días de tratamiento y sin haber sufrido intervención quirúrgica

n=8 -----> Sanos

II.- Inducción de la aterosclerosis

En las 24 h previas, a los animales en ayunas y antes de la inducción del daño vascular se les extrajo sangre de la vena marginal de la oreja para determinar los niveles plasmáticos de lípidos y ECA.

La aterosclerosis fue inducida por desecación endotelial según un método descrito por Lee Veen (figura 10). Los animales se anestesiaron con 5mg/Kg de xylazina (Rompún, Bayer AG, Leverkusen, Alemania) y 35 mg/Kg de Ketamina (Ketolar, Parke-Davis) por vía intramuscular. Además se realizó anestesia local mediante inyección subcutánea de Lidocaína al 2% (Braun, Barcelona, España). Treinta min. antes del abordaje quirúrgico, realizado en condiciones de esterilidad, se administraron 125 mg/Kg de cefazolina (Laboratorios Llorente, Madrid) por vía intramuscular como medida de profilaxis antibiótica.

A continuación se determinó la tensión arterial en la arteria femoral con un esfigmomanómetro. Finalmente, se preparó el campo estéril y se realizó el daño vascular. Mediante disección se expuso una arteria femoral y se aisló un segmento de unos 2 cm de longitud mediante ligaduras. En la parte proximal de dicho segmento se realizó una punción

de escape y la zona distal se canuló con una aguja de 27-G, por la que se infundió suero salino y, seguidamente, 80 ml/min de nitrógeno durante 8 min. Finalmente, se lavó de nuevo con suero salino, se quitaron las ligaduras, se hizo hemostasia por compresión, se marcó la zona lesionada mediante clips de titanio (Ethicon, Somerville, NJ, EEUU) y se suturó la herida. A continuación se repitió el procedimiento en la arteria femoral contralateral.

Tras el procedimiento quirúrgico se suministró a los animales una dieta aterogénica de 2% de colesterol y 6% de aceite de cacahuete (Letica, Barcelona) "*ad libitum*".

III y IV.- *Sacrificio*

Un primer grupo de animales fue sacrificado a los 7 días y otro a las 4 semanas de haberse inducido el daño.

Los conejos fueron anestesiados como en los procedimientos anteriores, y se expusieron las arterias femorales y la aorta abdominal. Se canuló este vaso, se cortó el flujo por encima con una ligadura para infundir suero salino y se realizó una punción de escape. Durante la infusión, se ligó y se extrajo el segmento dañado de una arteria femoral, destinada para estudios de biología molecular. Seguidamente se le quitó la capa adventicial, y se congeló en nitrógeno líquido (cuando fue necesario también se extrajo la aorta). A continuación, se sacrificó a los animales por sobredosis intracardiaca de pentotal sódico (Abbot, Madrid) y se infundieron desde aorta 100 ml de formaldehído al 4% en PBS a una presión de 100 mm Hg. Finalmente se ligó y extrajo el segmento lesionado de la arteria femoral para análisis histológico. Se alternó la arteria femoral escogida para cada procedimiento de manera que, al final, hubiera el mismo número de arterias de cada lado para histología y para biología molecular.

1.1.2.- Modelo B

En este modelo, evaluamos el efecto de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa sobre las lesiones ateroscleróticas ya formadas (figura 12). Este diseño tenía como fin simular la secuencia de acontecimientos que tienen lugar en el tratamiento de la aterosclerosis en el ser humano. Así, el tratamiento hipolipemiante suele comenzarse frecuentemente una vez que el paciente ha sido diagnosticado de enfermedad coronaria y tiene lesiones ateroscleróticas establecidas.

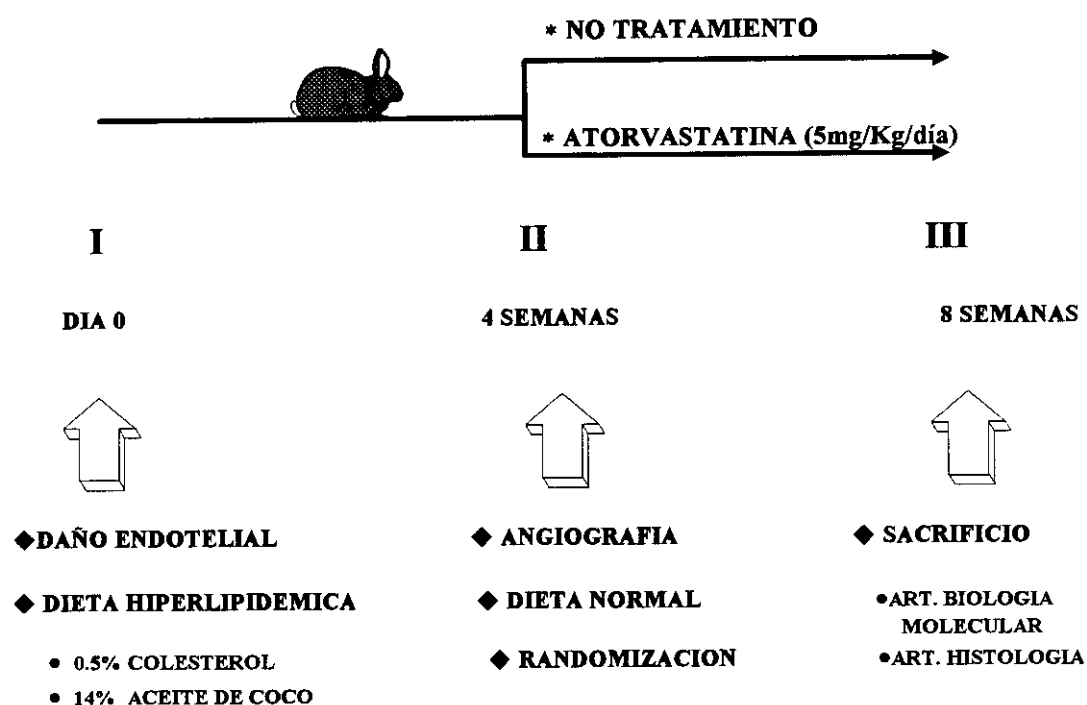


Figura 12. *Modelo B.*

I.- Inducción de la aterosclerosis

El daño endotelial se realizó mediante el protocolo descrito anteriormente sobre un total de 27 animales, igualmente, antes del procedimiento se les extrajo 10 ml de sangre para determinación de lípidos plasmáticos. A continuación se les suministró una dieta aterogénica con 0.5 % colesterol y 14 % aceite de coco (Mucedola, Italia) durante 4 semanas, manteniéndoles en jaulas individuales.

II.- Control Angiográfico

Al cabo de 4 semanas se realizó una angiografía control con el fin de excluir del estudio a los animales que presentaran oclusión total de la arteria. Este caso se presentó en un total de 4 conejos.

Los animales se anestesiaron por vía intramuscular y se realizó profilaxis antibiótica de manera similar al procedimiento de daño endotelial.

Tras realizar laparotomía media, se separó el paquete intestinal y, por disección roma, se expuso la aorta abdominal. Después de colocar una ligadura para controlar el sangrado en dicho vaso, se canuló por debajo y se infundieron 250 μ g de nitroglicerina para evitar el espasmo. Un minuto después, y bajo radioscopia, se inyectaron 2 ml de contraste (Ioxaglato de sodio, Hexabris 320; ROVI S.A, Madrid) diluidos en 2 ml de suero salino al 0.9%. Las imágenes se grabaron en vídeo VHS. Finalmente, tras infundir 10 ml de suero salino, se retiró la cánula y la ligadura, se hizo hemostasia por compresión y se suturó por planos.

Después de realizar el control angiográfico, a los animales se les retiró la dieta aterogénica, se les suministró una dieta estándar y se distribuyeron al azar en dos grupos :

- Sin tratamiento (n=9)

- Tratados con fármaco (n=7)

Además se consideró un grupo control de animales sanos no intervenidos (n=7)

III.- Sacrificio

Al cabo de 8 semanas los animales fueron sacrificados, siguiendo el procedimiento descrito en el modelo anterior.

1.2.- TRATAMIENTO FARMACOLOGICO

Modelo A

Son muchos los estudios que implican al sistema renina-angiotensina en el desarrollo de la enfermedad coronaria y el infarto de miocardio (Lonn et al., 1994). Con el propósito de profundizar en estos aspectos decidimos emplear, en este modelo, el inhibidor del Enzima de Conversión de la Angiotensina (iECA) **Quinapril** que fue donado por Parke Davis en forma de hidrocloreuro en polvo. El quinapril fue disuelto en el agua de bebida a una dosis de 1 mg/Kg/día, calculada en función del consumo diario; también se controló el peso de los animales para que recibiesen una dosis adecuada del fármaco.

Modelo B

El interés en el desarrollo de fármacos que reduzcan el riesgo de enfermedad cardiovascular, como consecuencia del descenso de las concentraciones plasmáticas de colesterol, ha ido aumentando en los últimos años. Por este motivo, en esta parte del estudio empleamos como tratamiento un fármaco hipolipemiente, más concretamente, un inhibidor de la HMG-CoA reductasa (enzima limitante en la ruta de síntesis del colesterol), llamado **Atorvastatina** (CI-981, donada por Parke Davis). Atorvastatina (Atv) es un potente inhibidor de la HMG-CoA reductasa, que además de bajar los niveles de colesterol también produce un descenso de los niveles de triglicéridos en plasma. El fármaco se suministró a los animales junto con la dieta estándar a una concentración de 5 mg/Kg/día durante 4 semanas. Para asegurar que toda la comida era consumida y de este modo confirmar la correcta administración del fármaco, durante la primera semana los animales recibieron 50 gr de dieta, 100 gr durante la segunda y 150 gr durante las dos últimas semanas.

1.3.- ESTUDIOS LIPIDICOS

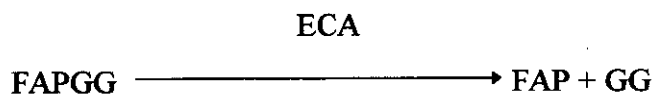
Los lípidos fueron analizados mediante técnicas estándar por medio de un autoanizador (Abbott VP Bichromatic Analyzer) y con métodos enzimáticos estándar (bioMerieux, Lyon, France). El análisis lipídico permitió determinar el colesterol total, colesterol LDL, colesterol HDL y triglicéridos.

1.4.- PRESION SISTOLICA Y ACTIVIDAD DE LA ECA

Debido al empleo de un iECA, los animales experimentaron una bajada de la tensión arterial; ésta fue estimada empleando un esfigmomanómetro en la arteria femoral antes de realizar la intervención quirúrgica. Por otro lado se extrajeron 10 ml de sangre de la vena marginal de la oreja de los animales, previo ayuno, para medir la actividad sérica de la ECA.

1.4.1.- Medida de la actividad sérica y tisular de la ECA

Las determinaciones de la actividad de la ECA fueron hechas en suero y en muestras de arteria aorta congelada. En ambos casos la actividad fue definida por un método espectrofotométrico (Sigma) basado en la reacción enzimática catalizada por la ECA, donde el furilacilfenilanglicilglicina (FAPGG) es hidrolizado a furacilfenilalanina (FAP). La hidrólisis del FAPGG produce una disminución de la absorbancia a 340 nm que es directamente proporcional a la actividad de la ECA en la muestra.



En el caso de la actividad de la ECA tisular, las muestras fueron homogeneizadas en 0.05 mol/L NaCl y 0.05% de Tritón X100, pH 7.5 y centrifugadas a 12000 xg durante 10 min. a 4°C. El sobrenadante resultante fue usado para el análisis.

2.- ESTUDIOS HISTOPATOLOGICOS

2.1.- ANALISIS MORFOMETRICOS

Después de fijar las arterias con formaldehído al 4% en PBS, se cortaron en piezas de 5 mm y se incluyeron en parafina. Con un microtomo (Micron, Francia) se realizaron cortes de 4 μm de grosor, se tiñeron con orceína y se fotografiaron. El análisis morfométrico se realizó mediante una tableta digitalizadora (Genius 1212, Key Systems Corp, Taiwan) conectada a un ordenador personal y el programa autoCAD 10.0 (Autodesk AG). Las áreas de la luz vascular y las comprendidas por dentro de las láminas elástica interna (LEI) y externa (LEE) se determinaron por planimetría. Las áreas de la lesión y de la media se obtuvieron de la siguiente manera:

$$\text{Area de la lesión (Intima)} = \text{área de LEI} - \text{área de la luz}$$

$$\text{Area de la media (Media)} = \text{área de LEE} - \text{área de LEI}$$

Finalmente, se valoró el cociente íntima/media y el porcentaje de estenosis vascular ($\text{Intima/LEI} \times 100$), seleccionando en cada arteria de cada animal, el corte que mostraba mayor severidad de estenosis.

2.2.- INMUNOHISTOQUIMICA

2.2.1.- Desarrollo

Los cortes de las arterias incluidos en parafina fueron en primer lugar desparafinados y posteriormente rehidratados. La actividad de la peroxidasa endógena se anuló incubando los cortes en peróxido de hidrógeno al 3%: metanol (1:1) durante 30 min. Se utilizaron los siguientes anticuerpos:

- Anticuerpo monoclonal para macrófagos de conejo (RAM11, DAKO, Carpintería, California, EEUU) (Tsukada T et al., 1986). Para poder utilizar el anticuerpo fue necesario una digestión enzimática previa con tripsina (Sigma España) durante 1 h. Con el fin de bloquear la unión inespecífica se incubó el tejido con tampón bloqueante consistente en suero de caballo al 6% y albúmina de suero bovino (BSA) al 4% en PBS a pH 7 (1h). El anticuerpo se diluyó a una concentración final de proteína de 84 µg/ml en suero de caballo al 1% y BSA al 4% en PBS, aplicándose durante otra h.. El anticuerpo secundario, anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa (HRPO, Seralab, Sussex, Inglaterra), se diluyó a 1:100 en BSA al 4% y se incubó durante 30 min.

- Anticuerpo monoclonal para células musculares de conejo (HHF35, ENZO Diagnostics, New York, EEUU) (Gown AM et al., 1985). Los tejidos se incubaron durante 1 h. con tripsina (Sigma) para facilitar la exposición de los antígenos. Se utilizó como tampón bloqueante suero de cabra al 6% y 4% de BSA en PBS (1.30 h). El anticuerpo primario se incubó directamente y al transcurrir 1 h. se aplicó el anticuerpo secundario arriba indicado.

- Anticuerpo policlonal para MCP-1 humano (Immugenex Corp., Los Angeles, California, EEUU). Este anticuerpo pudo utilizarse al presentar reacción cruzada con conejo. La unión no específica fue bloqueada incubando el tejido 1 h. en tampón bloqueante (6% de suero de caballo y 4% de BSA en PBS). Transcurrido este tiempo se añadió el anticuerpo a una concentración de 70 µg/ml diluido en 1% de suero de caballo y 4% de BSA en PBS durante toda la noche a 4°C. El segundo anticuerpo, anti IgG de cabra producido en burro y conjugado con peroxidasa (The Binding Site, Birmingham, Reino Unido) se diluyó 1:100 en 4% de BSA en PBS y se incubó durante 30 min.

- Anticuerpo policlonal para colágeno I (Southern Biotechnology, Associates, INC. Birmingham, EEUU). Se realizó una digestión enzimática, del tejido con tripsina 20 min., previa a la incubación con el tampón de bloqueo (2% suero de caballo, 1% BSA en PBS) durante 10 min. Finalizado este tiempo se añadió el anticuerpo primario a una dilución 1:20 durante toda la noche a 4°C. Las secciones se incubaron con el mismo anticuerpo secundario utilizado para el MCP-1 durante 1 h.

En todos estos casos, las preparaciones fueron reveladas durante 10 min. a temperatura ambiente con 0.05% 3,3'-diaminobenzidina (Dako) y 0.01% de peróxido de hidrógeno en PBS (solución sustrato para peroxidasa que desarrolla una coloración marrón). Finalmente, las muestras se tiñeron con hematoxilina, se deshidrataron y se montaron en Pertex (Medite, Alemania).

- Anticuerpo monoclonal anti IL-8 humana (IMMUGENEX Corp. Los Angeles, Ca, EEUU). Los tejidos se incubaron durante 1 h. con tampón de bloqueo (6% suero de cabra y 4% BSA en TBS). Transcurrido este tiempo se añadió el anticuerpo primario a una concentración de 50 µgr/ml diluido en tampón de bloqueo (1% suero de cabra y 4% BSA en TBS), durante toda la noche. El anticuerpo secundario, un anti IgG de ratón producido en cabra y conjugado con biotina, se incubó durante 1 h., al cabo de la cual se añadió el complejo Estreptavidina-biotina/fosfatasa alcalina (StreptABComplex/AP, DAKO A/S Denmark) durante 30 min. para poder amplificar la señal. A continuación se aplicó solución de sustrato para fosfatasa alcalina (Fast Red Substrate System, DAKO Corp. Carpinteria, CA, USA) (10 min), que desarrolló una coloración roja. Para terminar, las muestras se contrastaron con hematoxilina y se montaron en glicerol.

Para descartar que existiera tinción no específica, en cada ensayo se incluyó un control negativo sin el anticuerpo primario o con un suero no específico.

2.2.2.- Doble inmunohistoquímica

Desarrollamos esta técnica con el propósito de comprobar la localización de los macrófagos y las células de músculo liso en la lesión. Se utilizaron los anticuerpos descritos arriba (anti-RAM11 y anti-HHF35) pero en este caso se empleó un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa para las CML y otro conjugado con fosfatasa alcalina para los macrófagos, de esta forma aparece una coloración marrón y roja respectivamente, que permite distinguir dichas células.

2.3.- HIBRIDACION *IN SITU*

Secciones de 4µm de tejido incluido en parafina, se montaron sobre portaobjetos pretratados (APES al 2% en acetona), se desparafinaron en xilol, se rehidrataron y se fijaron con 1.5% paraformaldehído-1.5% glutaraldehído (10 min.). A continuación las muestras se trataron con levamisol 5 mM (30 min., t.a) y se digirieron con HCl 0.2 N (20 min.) y proteinasa K 0.1 M Tris pH 7.8, 0.005 M EDTA, 0.5% SDS (v/v). Después, los tejidos se refijaron, deshidrataron y se secaron. Las muestras se hibridaron a 42 °C en cámara húmeda durante toda la noche en una solución de hibridación (2x SSC, 1x Denhardt, 0.1 M fosfato sódico pH 6.5, sulfato de dextrano 10%, formamida desionizada 40%, complejo de ribonucleasa Vanadyl 24 mM y tRNA de levadura 0.5 mg/ml) en presencia de 0.4 ng/µl de ribosonda desnaturalizada marcada con digoxigenina. El exceso de sonda se lavó con 2x SSC (5 min.) y 0.2x SSC (3 min.). Finalmente el experimento se reveló con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina, y posterior incubación con NBT (0.4%)/X-fosfato (0.75 ml de 5-bromo-4-cloro-3-indol-fosfato, sal de toluidina, 50 mg/ml en dimetilformamida) (0.32%) (v/v) (10-30 min.). La reacción se detuvo lavando con 10 mM Tris pH 8 y 1 mM EDTA. Como control negativo se realizaron experimentos en presencia de la ribosonda sentido marcada con digoxigenina.

2.3.1.- Ribosondas empleadas. Marcaje

Se utilizó una ribosonda para PDGF-B (462 pb) de rata, que se preparó mediante RT-PCR usando los siguientes cebadores:

(5') : 5'-CTG AGG GGG ATC CCA TTC-3' (3') : 5'-CCT CCA GGG TCA CTG TGG-3'

La RT-PCR se realizó con extractos de RNA de hígado de rata que sirvieron como moldes. Tras la transcripción reversa, la PCR se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: desnaturalización (94 °C, 1 min.), unión (57 °C, 1 min.), y elongación (72 °C, 2 min.) durante 40 ciclos. El producto de RT-PCR se ligó al vector PCRTM 3 (Invitrogen, U.S.A). Las ribosondas del PDGF-B, sentido y antisentido, se sintetizaron a partir del vector linearizado, mediante las polimerasas SP6 y T7 respectivamente en presencia de digoxigenina-11-UTP, (DIG RNA labeling kit, Boehringer-Mannheim, Alemania).

2.4.- CUANTIFICACION

En cada animal se eligieron las secciones que presentaban la máxima estenosis. Se llevó a cabo un análisis morfométrico computerizado, con el sistema de análisis de imagen semiautomático Cue-2 (Olympus). Las preparaciones arteriales teñidas con los anticuerpos se digitalizaron con un microscopio Olympus (BH-2) conectado a una vídeo cámara CCD y al sistema de análisis de imagen Cue-2. Tras la adquisición de la imagen, un rango de valores de grises de 0 a 255 fue asignado a cada pixel. Las áreas marcadas en la íntima y la media se delimitaron; de esta forma el análisis automático se llevó a cabo estableciendo en primer lugar un nivel umbral, seguido de una mejora en la imagen (convirtiendo los pixels próximos al blanco a blanco, los próximos al negro a negro y extendiendo los restantes pixels uniformemente sobre los rangos de valores de los niveles de grises) y finalmente se realizó una segmentación (transformando la imagen a otra imagen binaria). De esta forma se obtuvo una valoración en μm^2 .

La cuantificación de la hibridación *in situ* (PDGF) y de la inmunohistoquímica de los anticuerpos IL-8 y Col I no se pudo realizar mediante el analizador de imagen arriba descrito, por lo que se llevó a cabo una valoración arbitraria por dos observadores distintos, sin conocimiento del grupo al que pertenecían los animales estudiados. Se asignó un valor arbitrario de 0 a 3 según la intensidad de la tinción que mostraba cada preparación y se calculó el valor medio para cada animal.

3.- CULTIVOS CELULARES

3.1.- CELULAS MUSCULARES LISAS (CML)

Las CML fueron aisladas de aorta torácica de rata y cultivadas según el método de Owens modificado (Owens GK et al., 1986). Brevemente, la grasa adherida y el tejido conectivo de la aorta torácica fueron cuidadosamente retirados, los vasos fueron abiertos longitudinalmente y preincubados en DMEM (Whitaker, Walkersville, MD), conteniendo 1 mg/ml de colagenasa (tipo II, 290 U/mg), penicilina (10 U/ml) y estreptomycin (100 µg/ml) (Sigma) durante 15-20 min a 37°C en 95% de aire y 5% de CO₂. Las aortas se cortaron en piezas de 1 mm de longitud, y se incubaron 1.5-2 h más con colagenasa. Tras lavar dos veces con PBS para separar las células, éstas se contaron y se sembraron en DMEM con suero de ternera fetal (STF) al 10% en frascos de plásticos de cultivo (Costar, Cambridge, MA) a una concentración de 10⁴ células/cm². Los pases se hicieron a intervalos de 2 semanas y se usaron las células entre los pases 2° y 10°.

3.2.- LINEA CELULAR U937

Las células U937 (línea celular monocítica humana) se obtuvieron de la ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, Maryland) (1593-CRL) y se cultivaron en medio de cultivo RPMI (BioWhitaker) suplementado con 2 mM de glutamina, 50 U/ml de penicilina, 50 µg/ml de estreptomycin y con STF al 10%.

4.- AISLAMIENTO DE LDL

Las LDL humanas se aislaron del plasma de sujetos normolipémicos mediante ultracentrifugación secuencial en el intervalo de densidad de 1.019 a 1.063 Kg/L. Tras su aislamiento, las lipoproteínas se dializaron en PBS con 10 µmol/L de EDTA, se pasaron a través de un filtro de 0.45 µm, se diluyeron a 1 mg/ml y se almacenaron a 4°C en atmósfera de N₂, para evitar su oxidación durante un máximo de 2 días antes de ser usadas. La presencia de endotoxinas en las preparaciones se descartó mediante el ensayo *Limulus* (Whittaker Bioproducts).

5.- ESTUDIOS DE BIOLOGIA MOLECULAR

5.1.- EXTRACCION DE RNA

Las arterias, previamente congeladas en nitrógeno líquido, fueron pulverizadas en una cámara metálica congelada. En el caso de las células, su crecimiento se detuvo por incubación en medio con STF al 0.5% durante 48 h. y posteriormente se incubaron con los correspondientes estímulos. En ambos casos el RNA total se obtuvo utilizando la técnica del isotiocianato de guanidinio-fenol-cloroformo en medio ácido (Chomezynski et al., 1987). Tejido y células se lisaron por tratamiento con 0.8 ml de solución de lisis de RNA (isotiocianato de guanidina 4 M, citrato sódico 25 mM pH 7, N-laurilsarcosina 0.5% (p/v) y β -mercaptoetanol 0.1 M) añadiéndose secuencialmente, 0.8 ml de fenol (equilibrado en tampón Tris 10mM con EDTA 1 mM pH 7.6), 80 μ l de acetato sódico 2 M a pH 4.0 y 160 μ l de una mezcla cloroformo/isoamílico (relación 49:1) (v/v). Con esta extracción se consiguió eliminar el DNA y las proteínas de la fracción celular inicial, quedándonos con el RNA contenido en la fase superior acuosa. El RNA se precipitó a -20 °C con isopropanol durante un mínimo de una h. Se centrifugó durante 30 min y el precipitado resultante se resuspendió en 0.3 ml de la solución de lisis de RNA, se volvió a precipitar a -20 °C con un volumen equivalente de isopropanol, se lavó con etanol al 70% y, una vez seco, se resuspendió en H₂O tratada con dietil pirocarbonato.

La concentración y pureza del RNA se determinó por espectrofotometría a 260 y 280 nm. La absorbancia a 260 nm nos indica la concentración del RNA (1 unidad de absorbancia corresponde a 40 μ g/ml), mientras que la relación 260/280 nos indica su pureza (una relación cercana a 2 corresponde a un RNA sin contaminación proteica).

5.2.- NORTHERN BLOT

En los estudios *in vivo*, ante la insuficiente cantidad de RNA obtenido de cada animal para poder hacer un Northern blot, se decidió emplear 5 µg de RNA de cada animal del mismo grupo para hacer una mezcla, cogiendo 20 µg de ésta. Para los estudios *in vitro* se utilizaron 30 µg de RNA de las células. Las muestras (20-30 µg de RNA/pocillo) se desnaturalizaron en formamida 50%, formaldehído 6%, MOPS 1x (MOPS 0.1 M pH 7,0, acetato sódico 40 mM, EDTA 5 mM) y 2 µl de bromuro de etídio (0.5 mg/ml) durante 15 min. a 55 °C y se enfriaron rápidamente en hielo (para evitar su renaturalización). Se añadieron 3µl de tampón de carga (glicerol 30% (v/v), azul de bromofenol 0.25% (p/v) y xilen cianol 0.25% (p/v)) y se cargaron en un gel de agarosa al 1% (Promega, Madison, WI, EEUU) en condiciones desnaturalizantes (6% de formaldehído y MOPS 1x) (v/v) en presencia del tampón TAE (Tris-HCL 12 mM pH 7,0, acetato sódico 6 mM, EDTA 0,3 mM).

El análisis electroforético se llevó a cabo en una cubeta horizontal (BioRad), con tampón de desarrollo TAE 1x y empleando un voltaje constante de 80 voltios durante 5 h. aproximadamente. Transcurrida la electroforesis, se comprobó la calidad del RNA en un transiluminador de luz ultravioleta (International Biotechnology, Inc. New Haven, EEUU) que permite observar el bromuro de etídio intercalado entre las bases del RNA (preferentemente a los RNA ribosómicos, que son los más abundantes).

Se procedió entonces a la transferencia del RNA desde el gel de agarosa a una membrana de nylon (Genescreen, New England Nuclear, Boston, MA), por capilaridad, en tampón fosfato 0.025M. El RNA transferido se fijó a las membranas mediante exposición durante 3 min. a la luz ultravioleta producida por una lámpara de 245 nm y posterior calentamiento a 80 °C durante 90 min.

5.3.- PREHIBRIDACION E HIBRIDACION

Las membranas se prehibridaron durante 6-8 h. a 42 °C en una solución compuesta por: tampón fosfato 50 mM a pH 6.5, 50% de formamida desionizada (v/v), 1% SDS (p/v), 5x SSC (SSC1x es citrato sódico 15 mM (pH 7.0) NaCl 150 mM), 1x de solución de Denhardt (1% Ficoll (p/v), 1% BSA (p/v) y 1% polivinilpirrolidina (p/v)) y 0.1 mg/ml de DNA de espermatozoos de arenque desnaturalizado.

La hibridación se llevó a cabo en la misma solución suplementada con 20% de sulfato de dextrano y aproximadamente 7×10^6 cpm de la sonda marcada (como se describe abajo), previamente desnaturalizada. Después de 24 h. de incubación a 42 °C, el exceso de sonda radiactiva se eliminó de las membranas mediante los siguientes lavados:

- 1.- 0.1% SDS, 2% SSC 30 min. temperatura ambiente
- 2.- 0.1% SDS, 1% SSC 30 min. 55°C
- 3.- 0.1% SDS, 0.1% SSC 15 min. 55°C dos veces

Las membranas se expusieron a películas del tipo X-Omat S (Easmant Kodak, Madrid) en pantallas de intensificación durante 3-6 días a -70 °C.

Después de lavar las membranas para retirar la sonda marcada unida (3 min. en H₂O a 95 °C), se rehibridaron con la sonda de la Gliceraldehído-3'-fosfato deshidrogenasa (G3PDH), que al ser un gen constitutivo se empleó como control interno y de este modo asegurar que se había cargado la misma cantidad de RNA en cada pocillo.

Las autorradiografías se cuantificaron por densitometrado (Image Quant, Molecular Dynamic, Sunnyvale, California, EEUU), corrigiendo los resultados en función de la expresión de la G3PDH y expresándose en unidades densitométricas arbitrarias referidas al basal en cada experimento con células o a los animales control en los experimentos *in vivo*.

5.4.- PREPARACION DE LAS SONDAS

5.4.1.- Sondas utilizadas para estudios *in vitro*

Linea monocítica U937

- MCP-1 humano

(Plásmido suministrado por la ATCC; JE*/pGEM-hJE34).

- G3PDH rata (producto de PCR).

Células musculares lisas

- MCP-1 rata (producto de PCR).

- G3PDH rata (producto de PCR).

5.4.2.- Sondas específicas para estudios in vivo

Las sondas de MCP-1 y colágeno I específicas para conejo fueron obtenidas purificando los productos de PCR (ver PCR preparativa descrita abajo).

5.4.3.- Purificación y marcaje de sondas

DNA plasmídico:

La sonda de cDNA del MCP-1 humano se utilizó en forma de fragmento por lo que fue necesario su aislamiento. Las bacterias que contenían el plásmido se crecieron durante toda la noche en 25 ml de medio Luria Bertani, con 100 µg/ml de ampicilina purificándose posteriormente mediante DNA Wizard™ Midipreps (Promega, Madison, EEUU).

Una vez aislado el plásmido, el inserto se obtuvo mediante la utilización del enzima de restricción XhoI. La sonda se marcó por el método del *random primer* (Boehringer Mannheim, Alemania) con α -[³²P]-dCTP.

Productos de PCR:

Los productos de PCR utilizados como sondas fueron aislados mediante electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (FMC Bioproducts, Rockland EEUU) y se purificaron tratándolos con Wizard PCR Preps (Promega, Madison, EEUU). Su marcaje se realizó con α -[³²P]-dCTP empleando random primers y el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I.

En ambos casos la cuantificación del DNA se realizó por medida de la absorbancia a 260 nm (1 unidad de absorbancia corresponde a 50 µg/ml de DNA bicatenario) y se comprobó que la relación entre las absorbancias a 260 y 280 nm era cercana a 2 para así descartar contaminación proteica.

5.5.- ESTUDIOS POR RT-PCR

Transcripción inversa (RT)

Para los estudios con animales, se mezclaron cantidades iguales (1 µg) de RNA procedentes de cada animal del mismo grupo, (aunque para comprobar la fiabilidad de los resultados obtenidos de este modo, se utilizó esta técnica en el RNA de cada animal por separado). 1 µg de RNA de cada grupo de conejos y de cada experimento con células se transcribió a cDNA mediante incubación con 20 µl de tampón de transcripción (5 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCL pH 8.8, 50 mM KCL, 0.1% Tritón X-100, 1mM mezcla de dNTPs, 50 ng de una mezcla aleatoria de nucleótidos). La mezcla se desnaturalizó a 65 °C durante 15 min. y se enfrió en hielo. A continuación se añadieron 20 unidades (U) de un inhibidor de RNasas (RNasin, Promega) y 15 U de transcriptasa inversa del virus Moloney de las aves (AMV, Promega). Esta mezcla se incubó a 15 °C (10 min.), a 42 °C (30 min.) y finalmente a 95 °C (5 min.) para inactivar la enzima.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Las reacciones de amplificación se realizaron con cebadores específicos descritos en las tablas VIII y IX. Cada PCR se realizó en una mezcla de reacción: 5 µl de la reacción de la transcriptasa inversa, 2 µl de tampón 10x de la Taq polimerasa (Tris-HCl 100 mM pH 8,3, KCl 50 mM, MgCl₂ 25 mM, los primers correspondientes a 0.1 mM, 0.25 U de Taq polimerasa (Promega) y α-[³²P]-dCTP en 25 µl de volumen de reacción. La amplificación del cDNA se realizó durante 25, 30, 35 y 40 ciclos para establecer la linealidad de la reacción.

En el caso de la PCR preparativa se realizó sin incluir nucleótidos marcados, durante 40 ciclos, con el fin de obtener la mayor cantidad posible de fragmento. Los productos obtenidos de las distintas PCRs se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida/urea al 4% en tampón TBE 1x (Tris-HCl 45 mM pH 8.0, ácido bórico 45 mM, EDTA 1mM pH 8,0). Las muestras se desnaturalizaron a 80°C durante 10 min. en una mezcla con formamida 50% y tampón de carga 1%. Los geles se expusieron a películas sensibles a los rayos X y se densitometraron. Los resultados se expresaron como unidades arbitrarias de densitometrado en relación a la expresión de G3PDH.

Tabla VI. Cebadores empleados para la PCR.

GEN	* cebador sentido * cebador antisentido	Tamaño inserto (pb)	Fuente
MCP-1	5'-TGTGCTTGCCAGCCAGATG-3' 5'-GTGTCTGCATTTTCTTGCC-3'	230	Akahoshi, 1993
IL-8	5'-AACCTTCTGCTGTCTCTGA-3' 5'-TCTGCACCCACTTTTCCTTG-3'	226	Akahoshi, 1993
IL-1 β	5'-TACATGAAGAGCTGCTTCCAGGACC-3' 5'-GGGAAGTGGGCAGACTCAAATCCA-3'	607	Cannon, 1989
TNF- α	5'-AAACCCGCAAGTGGAGGG-3' 5'-AAGTAGACCTGCCCGGAC-3'	398	Shakhov, 1990
COL I(α 2)	5'-AAAAAGACAAATGAATGGGGA-3' 5'-TCTTACAAAGGTTGACATTC-3'	423	Wiggings, 1993
G3PDH	5'-AATGCATCCTGCACCACCAA-3' 5'-ATACTGTTACTTATACCGATG-3'	515	Kaneto, 1993

Tabla VII. Condiciones de amplificación

Gen	Desnaturalización	Unión	Extensión
MCP-1	45'' 94°C	45'' 54°C	1' 72°C
IL-8	45'' 94°C	45'' 54°C	1' 72°C
IL-1 β	45'' 94°C	45'' 62°C	1' 72°C
TNF- α	45'' 94°C	45'' 58°C	1' 72°C
COL I(α 2)	45'' 94°C	45'' 50°C	1' 72°C
G3PDH	45'' 94°C	45'' 54°C	1' 72°C

6.- ANALISIS DE LA ACTIVACION DEL FACTOR NUCLEAR κ B (NF- κ B)

6.1.- EXTRACCION DE PROTEINAS

6.1.1.- Proteínas celulares (de tejido)

Para la extracción de proteínas de tejido se utilizó, con modificaciones, un método previamente descrito (Negoro et al., 1995). Las piezas arteriales congeladas fueron pulverizadas en una cámara metálica y resuspendidas en 1 ml de tampón de extracción frío (Hepes-NaOH 20 mM pH 7.6, 20% glicerol (v/v), 0.35 M NaCl 5 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 1 µg/ml pepstatina A). El homogeneizado se agitó vigorosamente durante 30 min., los materiales insolubles se precipitaron por centrifugación a 40.000 xg (30 min. a 4 °C) y el sobrenadante se dializó toda la noche en un tampón de diálisis (20 mM Hepes-NaOH pH 7.8, 50 mM KCl, 20% glicerol (v/v), 1 mM PMSF, 1 mM DTT y 0.1 mM EDTA). El dializado se centrifugó a 10.000 xg (15 min. a 4 °C) y se almacenó a -80 °C hasta su estudio. La concentración de proteína fue determinada por el método BCA (Pierce, Rockford, IL).

6.1.2.- Proteínas nucleares (de células)

Las células se hicieron quiescentes en STF al 0.5% durante 48 h. y se incubaron con los diferentes estímulos durante distintos periodos de tiempo. Entonces, se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en tampón-A (10 mM Hepes-NaOH pH 7.8, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF). Tras mantenerlas 10 min. en hielo las células fueron centrifugadas, resuspendidas en 2 ml de tampón A y homogeneizadas. Los núcleos se separaron de la fracción citosólica mediante centrifugación a 1000 xg (10 min.). El precipitado se resuspendió en tampón A. Se añadió KCl 3M gota a gota hasta una molaridad final de 0.39. Las muestras se incubaron durante 1 h. a 4 °C, se centrifugaron a 100.000 xg (30 min.). Los sobrenadantes, con los extractos nucleares, se dializaron en tampón C (50 mM Hepes pH 7.8, 50 mM KCl, 0.1 mM EDTA, DTT 1 mM, 1 mM PMSF, 10% glicerol (v/v)). Las muestras se almacenaron a -80 °C y la concentración de proteína se determinó según el método arriba indicado.

6.2.- MARCAJE DEL OLIGONUCLEOTIDO CONSENSO

Los oligonucleótidos consenso de NF- κ B (5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') y AP-1 (5'-CGCTTGATGAGTCAGCCGGAA-3') se marcaron con 10 μ Ci de γ -[32 P]-ATP (3000 Ci/mmol) (Amersham, Buckinghamshire, Reino Unido) mediante 10 U de T4 polinucleótido quinasa (Promega, Madison, EEUU) durante 10 min., en una reacción que contenía 70 mmol/L de Tris-HCl, 10 mmol/L MgCl₂ y 5 mmol/L DTT. La reacción se paró añadiendo EDTA 0.5 M hasta una concentración final de 0.05 mol/L.

6.3.- ENSAYO DE RETARDO DE MOVILIDAD ELECTROFORETICA

6.3.1.- Ensayo de unión

Se equilibraron 5 μ g de proteína nuclear o 10 μ g celular durante 10 min. en un tampón de unión (Tris-HCl 1mM pH 7.5, 50 mM NaCl, 1mM MgCl₂, 4% glicerol (v/v), 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT) en presencia de 50 μ g/ml de poli (dI-dC); a continuación las muestras se incubaron durante 20 min. con 0.035 pmoles del oligonucleótido marcado en el mismo tampón. La reacción se paró añadiendo tampón de carga (250 mM Tris-HCl pH 8.3, 0.2 % azul de bromofenol (p/v), 0.2% xileno cianol (p/v), 2% glicerol (v/v)). Los complejos proteína-DNA fueron separados del exceso de sonda no unida, en un gel no desnaturalizante de poliacrilamida al 4% en 0.25% TBE a 150 V. Una vez terminada la electroforesis los geles fueron secados y expuestos para autorradiografía.

6.3.2.- Controles

Ensayos de competición.

Las muestras se incubaron en tampón C durante 10 min. en presencia de un exceso de 100 veces molar de sonda fría. Posteriormente, se añadió la sonda marcada, continuándose el experimento en las mismas condiciones.

Control negativo.

Se desarrolló en las mismas condiciones comentadas arriba, excepto que en este caso se omitió el extracto nuclear.

Control positivo.

La sonda marcada se añadió a 2µl de extracto nuclear Hela en las condiciones anteriormente descritas.

6.4.- ENSAYOS DE SUPERRETARDO

Con el fin de poder determinar las subunidades implicadas en la actividad NF-κB observada en nuestros sistemas, se utilizaron anticuerpos frente a las subunidades p50 (anti-p50, Chemikon, Temecula, CA, EEUU), p65 y c-Rel (anti-p65 y anti c-Rel, Santa Cruz Biotechnology Inc. Santa Cruz, CA, EEUU). Para ello se añadió e incubó 1 µg de anticuerpo durante 1 h., antes de parar la reacción y cargarlo en el gel.

6.5.- DETECCION DE NF-κB IN SITU (SOUTH-WESTERN)

Según una técnica previamente descrita (Wang et al., 1992), desarrollamos un método que permite determinar la distribución y la actividad de unión al DNA de factores de transcripción en el propio tejido a través de una sonda específica de DNA marcada con digoxigenina, que contiene la secuencia consenso del factor de transcripción nuclear a determinar.

6.5.1.- Preparación de oligonucleótidos

Se diseñaron oligonucleótidos (GENOSYS, Londres, UK) que contenían la secuencia consenso de DNA a la que se une el NF-κB cuando se encuentra activado (Tabla VIII). También se diseñó una secuencia mutada para descartar uniones inespecíficas.

La dimerización de los oligonucleótidos sentido y antisentido, mediante la mezcla de cantidades equimolares a 80 °C durante 2 min. y enfriamiento lento, permitió la obtención de la sonda. A continuación, ésta se marcó con digoxigenina (DIG Oligonucleotide 3'-End Labeling Boehringer Mannheim, Alemania).

Tabla VIII. *Secuencias consenso y mutadas de los factores nucleares empleados*

Factor nuclear	secuencia
NF-κB	
sentido	5'-AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3'
antisentido	5'-GCCTGGGAAAGTCCCCTCAACT-3'
sentido (mutado)	5'-AGTTGAGGCTCCTTTCCCAGGC-3'
antisentido (mutado)	5'-GCCTGGGAAAGGAGCCTCAACT-3'

6.5.2.- Detección

Secciones de 6-7 μ m de tejido se desparafinaron y se rehidrataron en concentraciones decrecientes de etanol. Las muestras se trataron con Levamisol (30 min.) para inhibir la fosfatasa alcalina endógena. Posteriormente las muestras se fijaron con paraformaldehído al 0.2% (p/v) (30 min. a 25 °C) y a continuación se trataron con pepsina 0.5% en HCl 1N pH 1.5 (30 min. a 37°C) (p/v). Transcurrido este tiempo las secciones se lavaron con **tampón HEPES 1** (10 mM Hepes, 40 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM EDTA, 0.25% BSA (p/v) a pH 7.4) y se incubaron con DNAsa I (0.1 mg/ml, 30 min. a 30 °C) disuelta en HEPES 1. Las preparaciones se lavaron 2 veces con **tampón HEPES 2** (10 mM Hepes, 40 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 mM EDTA, 0.25% BSA (p/v) a pH 7.4), se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol y se incubaron con el oligonucleótido marcado (consenso o mutado) durante toda la noche a 37 °C en cámara húmeda.

Posteriormente las muestras se lavaron en tampón HEPES 1, **tampón de lavado** (0.3% Tween 20 en tampón 1: 0.1 M ácido maleico y 0.15 M NaCl pH 7.5) y **tampón 2** (Solución de bloqueo: 0.1x SSC , 0.1% SDS (p/v) diluida 1:10 en tampón de lavado) durante 1 h.

A continuación las preparaciones se incubaron con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Boehringer Mannheim, Alemania) durante toda la noche a 4 °C. Las preparaciones se lavaron en **tampón 3** (100 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 50 mM

MgCl₂ pH 9.5) y en tampón de lavado dos veces durante 10 min. cada vez y se incubaron (1-2 h.) con NBT (0.4%)/x-fosfato (0.32%).

La reacción se detuvo lavando con 10 mM Tris pH 8 y 1 mM EDTA y se procedió al montaje de las muestras con glicerol. Como control negativo se realizaron experimentos sin la presencia de oligos marcados con digoxigenina.

La cantidad de núcleos teñidos en el tejido fue valorada por dos observadores distintos, sin conocimiento del grupo al que pertenecían los animales estudiados asignándose una valoración arbitraria de 0 a 6 según la intensidad de la tinción que mostraba cada preparación y se calculó el valor medio para cada animal.

Detección simultánea de NF- κ B y macrófagos o CML

Una vez detectado el NF- κ B, las secciones se lavaron en PBS, desarrollándose a continuación las técnicas inmunohistoquímicas para la localización de macrófagos o CML descritas en la sección de inmunohistoquímica.

7.- ANALISIS ESTADISTICO

Para los estudios estadísticos se utilizó el programa informático de estadística GraphPAD InStat (GraphPAD Software, San Diego, CA, EEUU).

Los datos se expresaron como media \pm desviación estándar. Los valores de los lípidos y el análisis morfométrico se compararon mediante la U de Mann-Whitney. La incidencia de infiltración de macrófagos se expresó como porcentaje y las comparaciones se hicieron mediante la prueba exacta de Fisher. El resto de los datos obtenidos en la cuantificación inmunohistoquímica y los datos de biología molecular se compararon mediante la t de Student. Los resultados se consideraron significativos cuando la $p < 0.05$ (dos colas).

IV.- RESULTADOS

PARTE I: ESTUDIOS *IN VIVO*

1.- EFECTO DE LA INHIBICION DE LA ECA

Los iECAs han demostrado ser eficaces en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, como la disfunción sistólica ventricular izquierda (DSVI) (The CONSENSUS Trial study group, 1987) y la disfunción endotelial (Mancini et al., 1996). Experimentalmente, los iECAs disminuyen la extensión de lesiones ateroscleróticas (Chobanian et al., 1990), así como la proliferación de CML y la formación de neointima tras daño vascular (Rakugi et al., 1994). Sin embargo, poco se sabe sobre el efecto que tienen en los distintos mecanismos que desencadenan el avance de la lesión aterosclerótica.

Hemos pretendido estudiar el efecto de un inhibidor de la ECA, con alta fijación tisular (Quinapril, 1 mg/Kg/día), sobre la progresión de una lesión inducida en conejos. Con el fin de obtener una lesión lo suficientemente importante como para poder analizarla en sus distintos aspectos utilizamos una dieta hipercolesterolémica (2% colesterol y 6% aceite cacahuete). Este modelo se divide en dos submodelos:

- Modelo de 7 días: donde nos propusimos estudiar sobre una lesión temprana una serie de factores iniciales implicados en el desarrollo de la lesión.
- Modelo de 28 días: en el que aparece una lesión mucho más madura y hemos pretendido abordar el efecto del tratamiento del quinapril sobre la evolución clínica y morfológica de la lesión.

1.1.- EVOLUCION CLINICA EN RESPUESTA AL TRATAMIENTO

1.1.1.- Evolución del peso

Los animales fueron pesados desde el comienzo del estudio y posteriormente de manera semanal hasta el momento de su sacrificio. En general, los animales experimentaron una pérdida de peso hasta la segunda semana y luego recobraron un peso similar al inicial hasta el final del estudio (Tabla IX). Esta pérdida de peso fue máxima durante la primera semana y fue mayor en los animales que recibieron quinapril ($p < 0.05$).

TABLA IX. Evolución del peso a los 7 y 28 días (kg)

7 DIAS			
	Inicial	7 Días	
Sin tratamiento (n= 9)	3617 ± 223	3364 ± 384 (N.S)	
Quinapril (n= 9)	3627 ± 302	3299 ± 307 (p< 0.05)	
28 DIAS			
	Inicial	15 Días	28 Días
Sin tratamiento (n= 15)	3690 ± 256	3516 ± 380	3631 ± 382 (N.S)
Quinapril (n= 9)	3932 ± 415	3740 ± 366	3922 ± 380 (N.S)

N.S: No significativo

1.1.2.- Presión arterial

La presión arterial, analizada en los dos grupos conjuntamente, se determinó en el momento de la inducción del daño en la arteria femoral mediante un esfigmomanómetro (figura 13). Los conejos tratados dos días antes con quinapril a una dosis de 1mg/Kg/día presentaron unos valores de tensión arterial inferiores (61 ± 16 mm Hg; n=22) a los de los animales sin tratamiento (83 ± 12 mm Hg; n=22; $p < 0.0001$). En el momento del sacrificio no fue posible determinar la presión arterial debido a la estenosis que presentaban las arterias femorales en la mayoría de los animales.

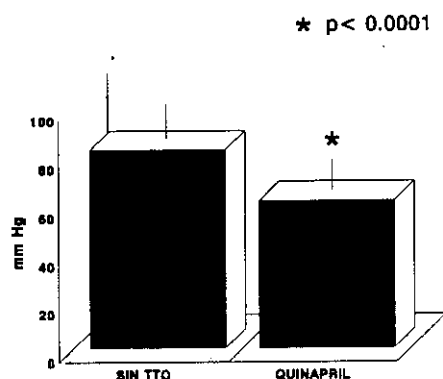


Figura 13. Presion arterial. Determinada mediante esfigmomanómetro en la arteria femoral en el momento de la inducción del daño. Las barras representan la media \pm EEM de un total de 22 conejos.

1.1.3.- Parámetros bioquímicos

La extracción de 10 ml de sangre de la vena marginal de la oreja de los conejos (puestos a ayunar 24 horas) y la separación del suero por centrifugación nos permitió determinar el colesterol total. Esto se llevó a cabo mediante un autoanalizador y métodos estándar.

Modelo de 7 días: El colesterol total aumentó 10 veces sobre los niveles basales de los mismos animales antes de comenzar la dieta (643 ± 343 vs 60 ± 24 mg/dl) (tabla XII).

Modelo de 28 días: El colesterol total aumentó 35 veces sobre los niveles iniciales al cabo de las 4 semanas (tabla X). El quinapril no indujo ningún cambio en los niveles de colesterol respecto a los animales sin tratamiento.

TABLA X. Niveles de colesterol sérico (mg/dl)

7 DIAS			
	Inicial	7 Días	Incremento (veces)
Sin tratamiento (n= 5)	60 ± 24	643 ± 343	10
Quinapril (n= 4)	42 ± 8	414 ± 244	10
28 DIAS			
	Inicial	28 Días	Incremento (veces)
Sin tratamiento (n= 10)	41 ± 10	1446 ± 425	35
Quinapril (n= 7)	49 ± 11	1756 ± 549	35

1.2.- ACTIVIDAD DE LA ENZIMA DE CONVERSION DE LA ANGIOTENSINA

1.2.1.- Actividad en suero

La actividad sérica se determinó en el momento del daño (día 0) apreciándose una disminución significativa de la actividad (70%) en el suero de los animales que recibieron tratamiento con quinapril respecto a los animales sin tratamiento $[(2.54 \pm 0.9) \times 10^{-2} \text{ U/ml vs } (8.5 \pm 3) \times 10^{-2} \text{ U/ml}; p < 0.008]$. La actividad de la ECA sérica en el momento del sacrificio (7 y 28 días) no se pudo cuantificar debido a la turbidez causada por la hiperlipidemia (Figura 14).

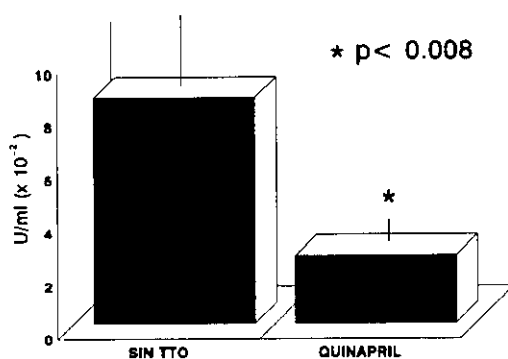


Figura 14. Actividad sérica en el momento de la inducción del daño. Las barras representan la media \pm EEM

1.2.2.- Actividad tisular

La actividad tisular de la ECA se determinó en aorta. En el momento del daño (día 0) no hubo cambios significativos entre los conejos tratados con quinapril y los no tratados $[(1.2 \pm 0.2) \times 10^{-3} \text{ U/mg, vs } (1.1 \pm 0.4) \times 10^{-3} \text{ U/mg}]$.

En el momento del sacrificio la actividad de la ECA vascular de los animales tratados con quinapril (figura 15) disminuyó respecto a los animales sin tratamiento, en torno a un 40% a los 7 días y un 50% a los 28 días [Día 7: $(2.3 \pm 1.8) \times 10^{-3}$ U/mg, n=4, vs $(4.8 \pm 5) \times 10^{-3}$ U/mg, n=6, p=N.S.; Día 28: $(2.14 \pm 2) \times 10^{-3}$ U/mg, n=7, vs $(4.8 \pm 1.6) \times 10^{-3}$ U/mg, n=9; p=0.023].

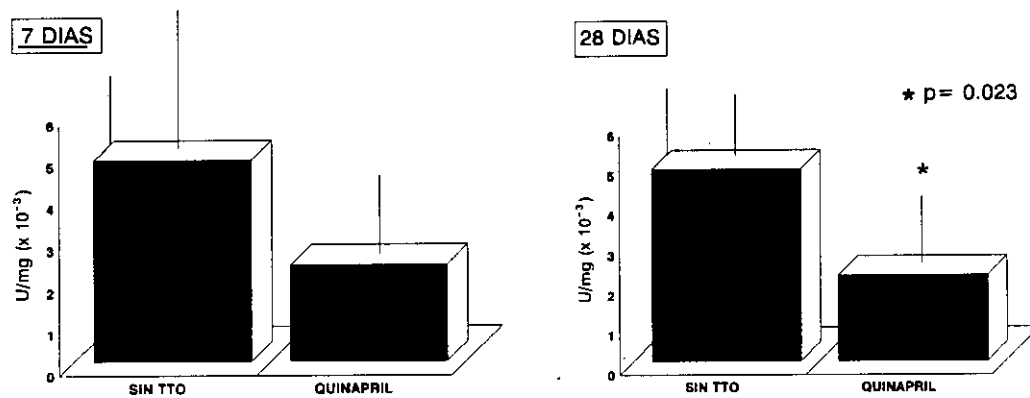


Figura 15. Actividad de la ECA tisular a los 7 y 28 días. Las barras representan la media \pm EEM.

1.3.- ESTUDIOS HISTOPATOLOGICOS

1.3.1.- Análisis de las lesiones vasculares

El análisis morfométrico se realizó de la forma descrita en métodos, sobre cortes histológicos teñidos con orceína, que presentaban la máxima estenosis en cada animal.

Modelo de 7 días:

En el momento del sacrificio todos los animales presentaban un aumento neointimal. Como se muestra en las figuras 16 y 17 la evaluación morfométrica reveló que no había diferencias significativas en la formación de la neointima, estimada como la relación íntima/media (0.125 ± 0.024 vs 0.165 ± 0.03 ; $p=0.3$) o lesión máxima ($28770 \pm 47.46 \mu\text{m}^2$ vs $45859 \pm 9372 \mu\text{m}^2$; $p=0.15$) aunque sí se encontró una tendencia hacia una lesión más atenuada en los animales tratados con quinapril.

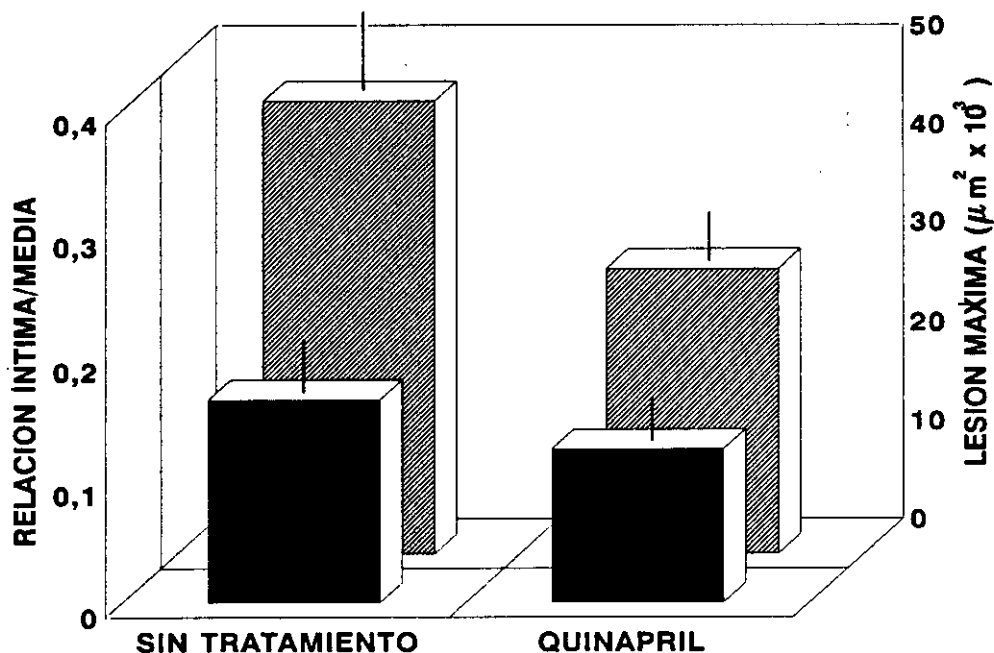


Figura 16. Cuantificación morfométrica de la lesión en el modelo de 7 días. Las barras en negro representan la relación íntima/media y las barras rayadas la lesión máxima. Los datos son la media \pm EEM de 6 conejos tratados frente a 7 sin tratar.

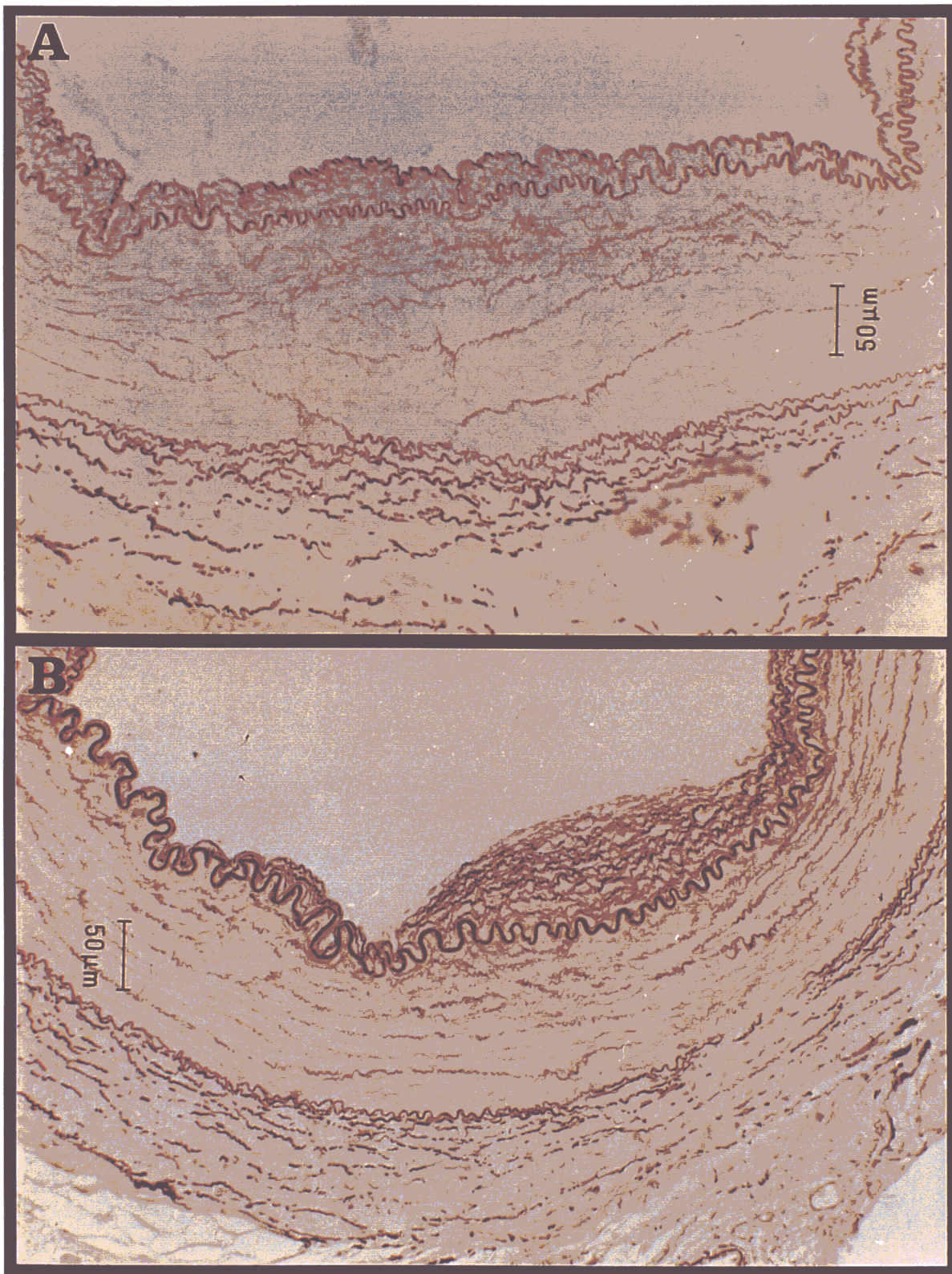


Figura 17. *Análisis de las lesiones vasculares a los 7 días.* Microfotografías de secciones representativas de arterias femorales teñidas con orceína. Se observa una ligera disminución de la neointima en el animal tratado con quinapril (A) respecto al no tratado (B) (Magnificación x400).

Modelo 28 días:

Las medidas de las lesiones al cabo de 28 días tampoco presentaron diferencias significativas entre los dos grupos estudiados, aunque al igual que en el modelo de 7 días se aprecia una tendencia hacia la normalización en los conejos tratados. En la figura 18 se muestran los valores expresados como relación íntima/media (0.39 ± 0.4 vs 1.008 ± 0.8 ; $p=0.13$) o lesión máxima ($101547 \pm 109977 \mu\text{m}^2$ vs $328691 \pm 263104 \mu\text{m}^2$; $p=0.069$) y en la figura 19 se muestran dos microfotografías correspondientes a una lesión de un animal tratado y otro animal sin tratar.

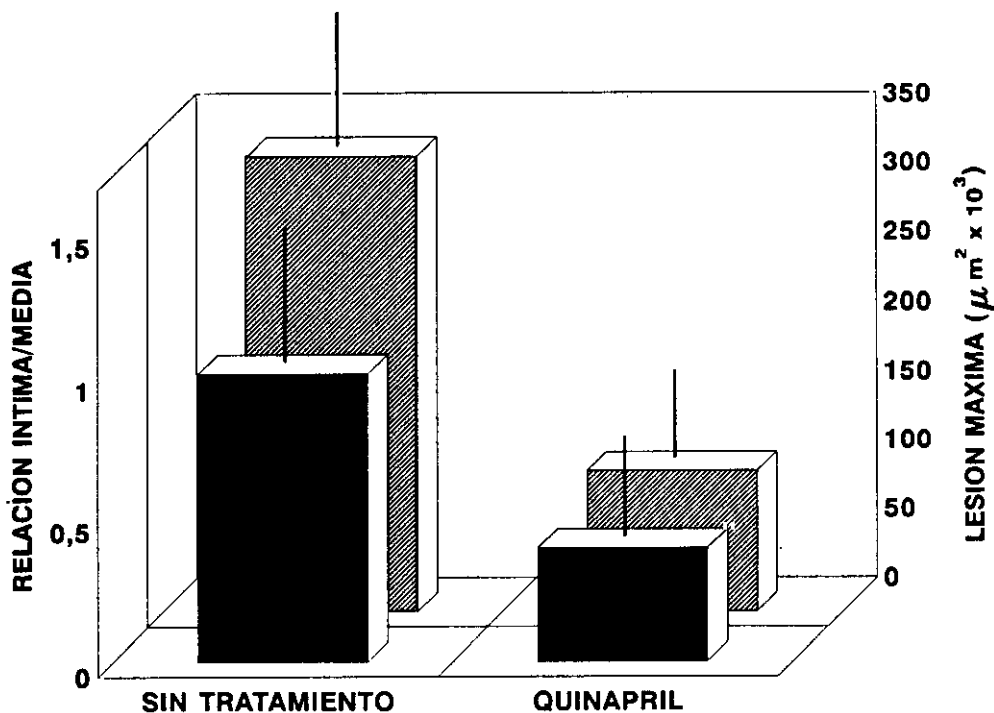


Figura 18. *Cuantificación morfométrica de la lesión en el modelo de 28 días.* Las barras en negro indican la relación íntima/media, mientras que las rayadas representan la lesión máxima formada. Los datos son la media de 6 conejos tratados frente a 9 conejos sin tratamiento y representan la media \pm EEM.

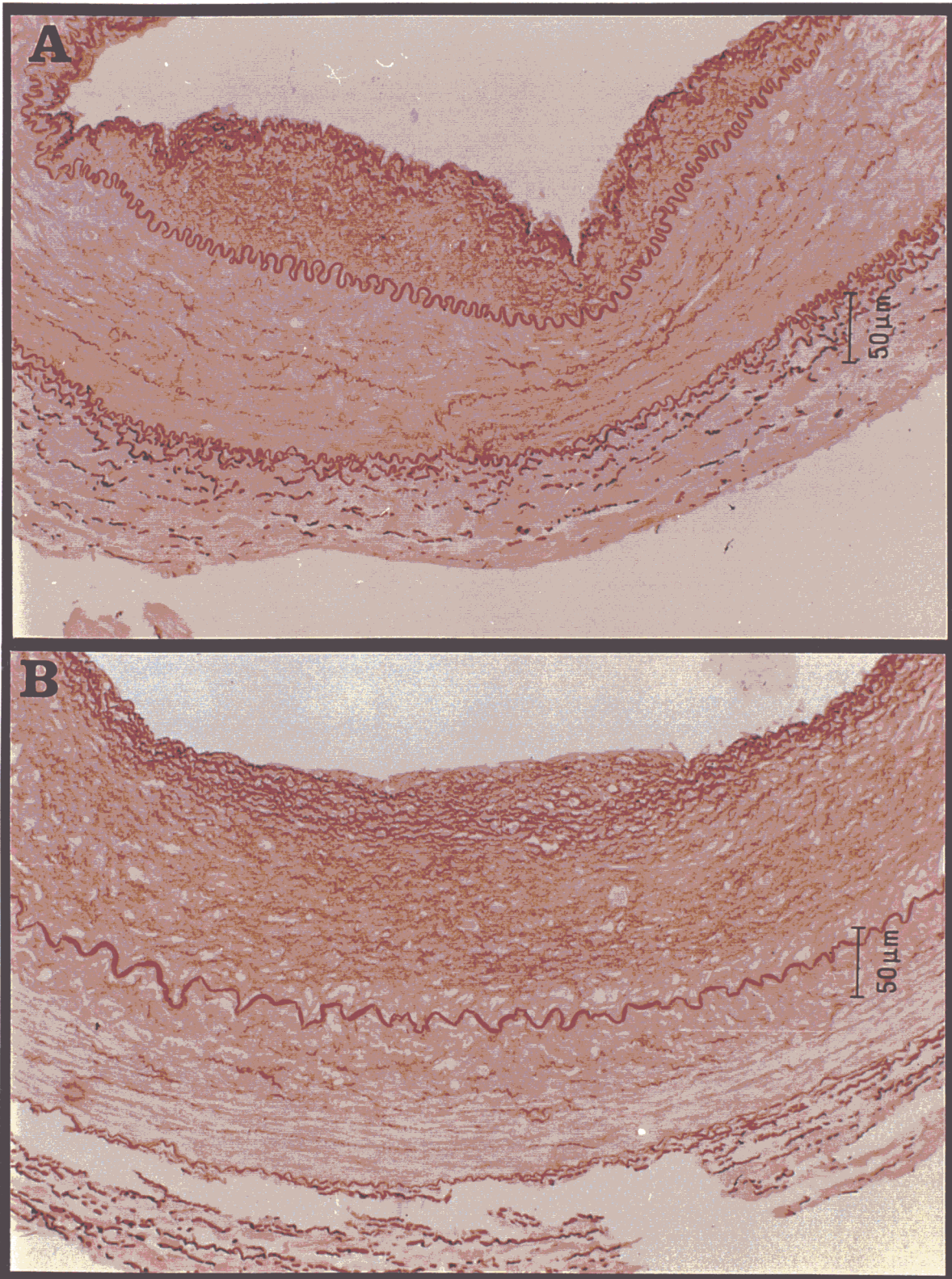


Figura 19. *Análisis de las lesiones vasculares a los 28 días.* Las microfotografías muestran secciones representativas de arterias femorales que han sido teñidas con orceína. La neointima del animal tratado (A) muestra una ligera disminución frente a la observada en el no tratado (B). (Magnificación x400).

1.3.2.- Evaluación de la presencia de macrófagos y MCP-1

Modelo de 7 días:

Las arterias fueron desparafinadas y secciones seriadas se trataron con anticuerpos para macrófagos y MCP-1. En la figura 20A se observa, tanto a nivel de la íntima como de la capa media, que los animales sanos no mostraron infiltrado de macrófagos ni producción de MCP-1 (panel inferior). A nivel neointimal, los conejos que no recibieron tratamiento mostraron una fuerte tinción para MCP-1 que coincidió con un gran infiltrado de macrófagos (panel superior). Por el contrario, el tratamiento con quinapril (panel central) se asoció con una disminución significativa de infiltración de macrófagos ($17 \pm 16 \mu\text{m}^2$ vs $4897 \pm 2998 \mu\text{m}^2$; $p < 0.03$) y de la producción de MCP-1 ($3378 \pm 693 \mu\text{m}^2$ vs $8809 \pm 2585 \mu\text{m}^2$; $p < 0.02$) (figura 20B).

En la **capa media** el tratamiento indujo un ligero descenso (10%) de la producción de MCP-1 respecto a los animales no tratados. Sin embargo, existió una gran reducción del infiltrado de macrófagos (0 vs $695 \pm 1388 \mu\text{m}^2$; $p < 0.05$).

Modelo de 28 días:

Como se muestra en la figura 21A, a nivel **neointimal**, los conejos que no recibieron tratamiento exhibieron una intensa tinción para MCP-1, coincidiendo con un gran infiltrado de macrófagos (panel superior). El tratamiento con quinapril (panel inferior) produjo una disminución significativa del infiltrado de macrófagos ($20213 \pm 52925 \mu\text{m}^2$, $n=7$ vs $105729 \pm 196696 \mu\text{m}^2$, $n=11$; $p < 0.04$) y de la producción de MCP-1 ($45582 \pm 68963 \mu\text{m}^2$, $n=8$ vs $185642 \pm 169784 \mu\text{m}^2$, $n=8$; $p < 0.05$) (figura 21B).

A nivel de la **capa media** también se observó una disminución del infiltrado de macrófagos y de la expresión proteica de MCP-1 en este grupo de animales (51% y 20% respectivamente).

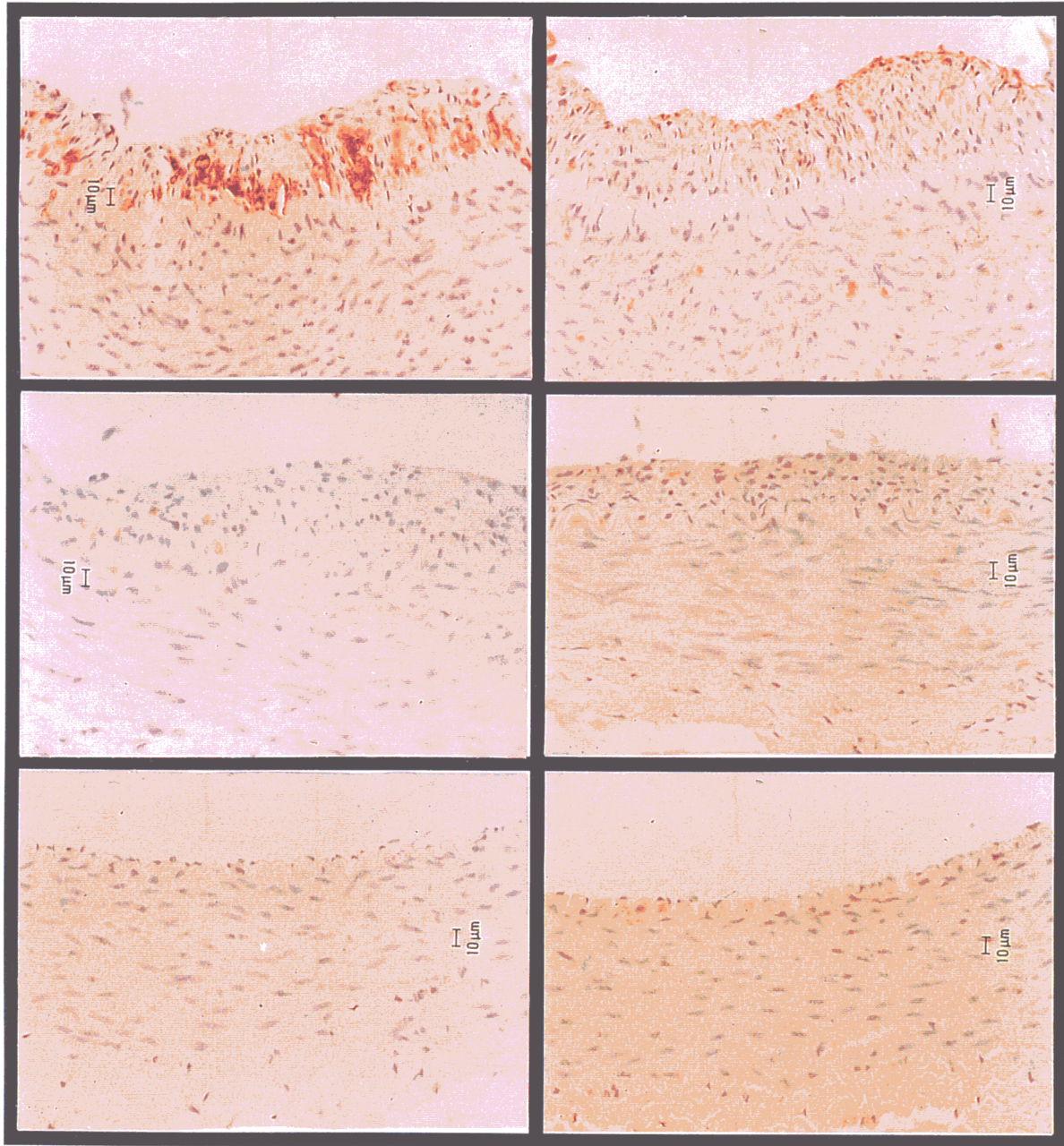


Figura 20A. *Inmunohistoquímica de macrófagos y MCP-1 a los 7 días.* Las microfotografías muestran una inmunohistoquímica representativa de secciones seriadas de arteria femoral de conejo que han sido teñidas con el anticuerpo antimacrófago RAM-11 (izquierda) y anti MCP-1 (derecha). Animal sin tratamiento (panel superior), animal tratado con quinapril (panel medio) y animal control (panel inferior). En cada experimento se incluyeron controles negativos que no mostraron tinción (no mostrado). (Magnificación x400)

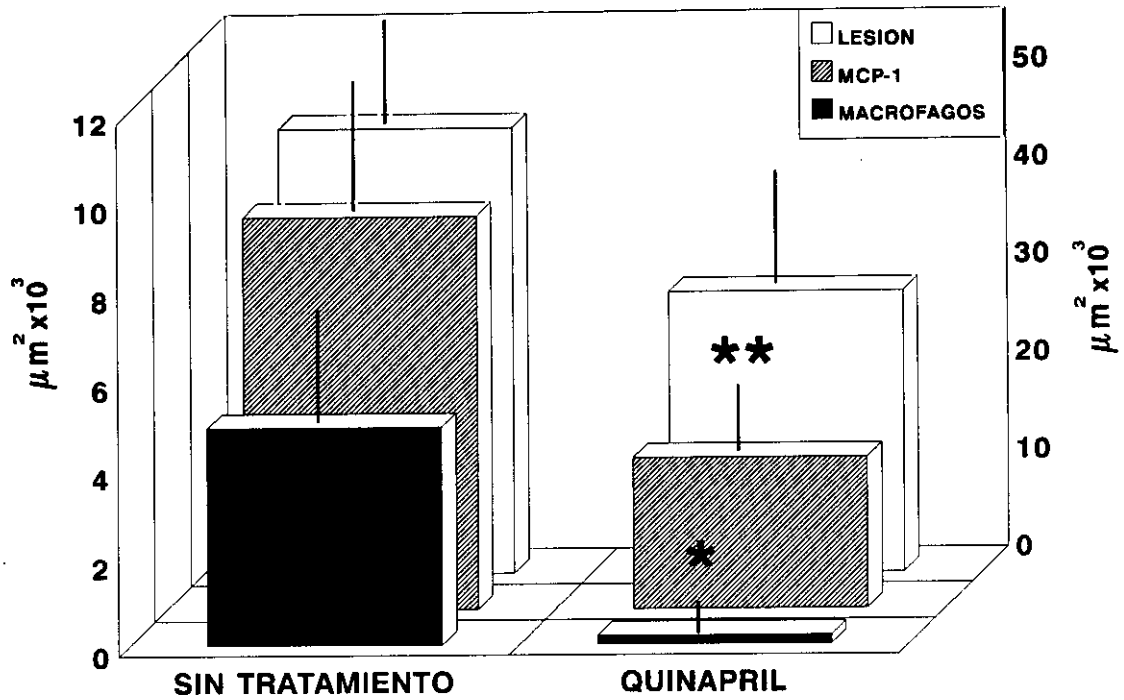


Figura 20B. Análisis comparativo de la morfometría e inmunohistoquímica de macrófagos y MCP-1 en el modelo de 7 días. La gráfica de barras muestra el área de máxima lesión (blanco, eje derecho), área positiva para MCP-1 (rayado, eje izquierdo) y el área positiva para macrófagos (negro, eje izquierdo). Los datos representan la media \pm EEM (μm^2). (* $p < 0.03$ y ** $p < 0.02$ animales tratados con quinapril vs sin tratamiento).

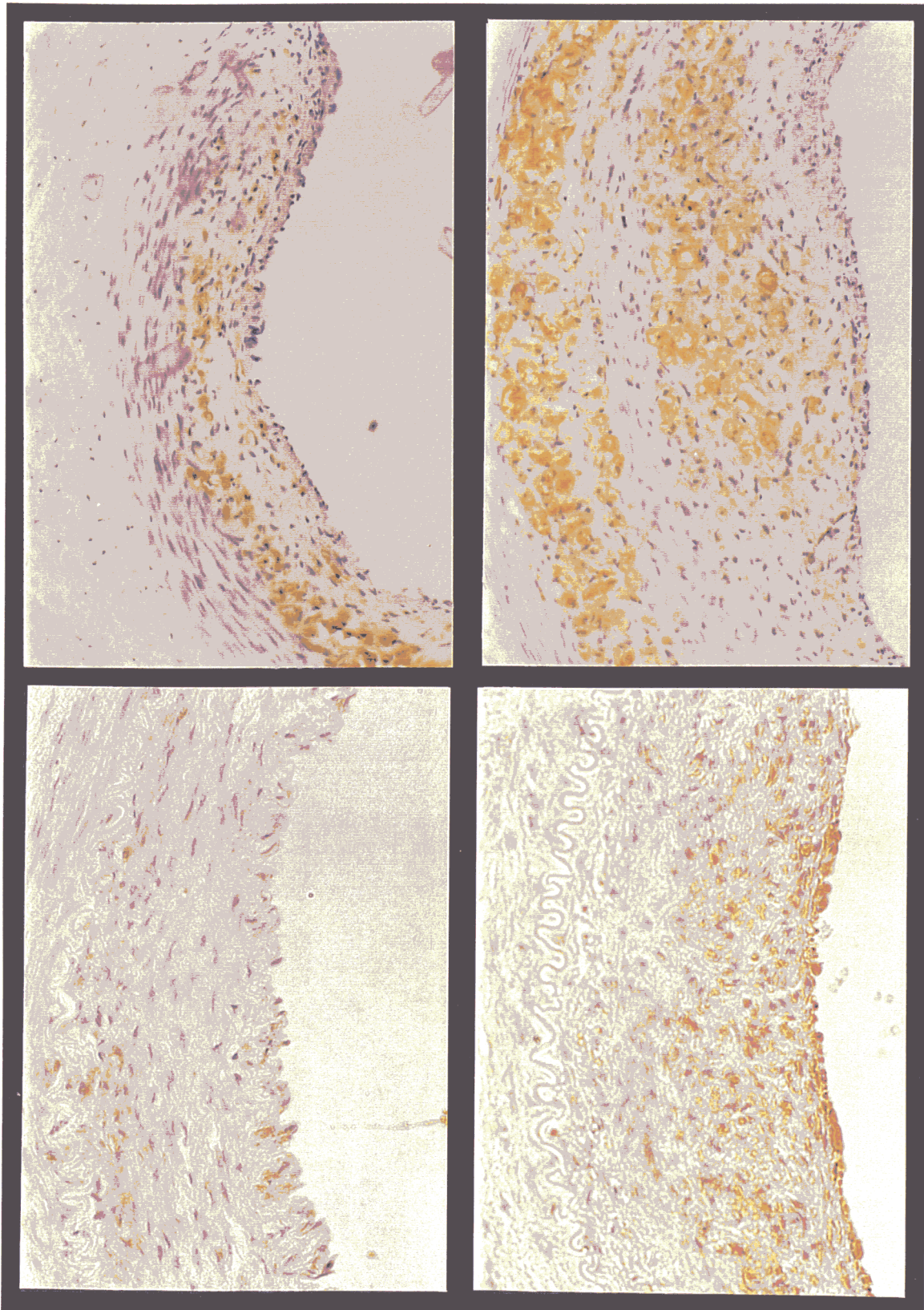


Figura 21A. *Inmunohistoquímica de macrófagos y MCP-1 a los 28 días.* Las microfotografías muestran secciones de arteria femoral de conejo teñidas con el anticuerpo antimacrófago RAM-11 (izquierda) y anti MCP-1 (derecha). Animal sin tratamiento (panel superior), animal tratado con quinapril (panel inferior). (Magnificación x400).

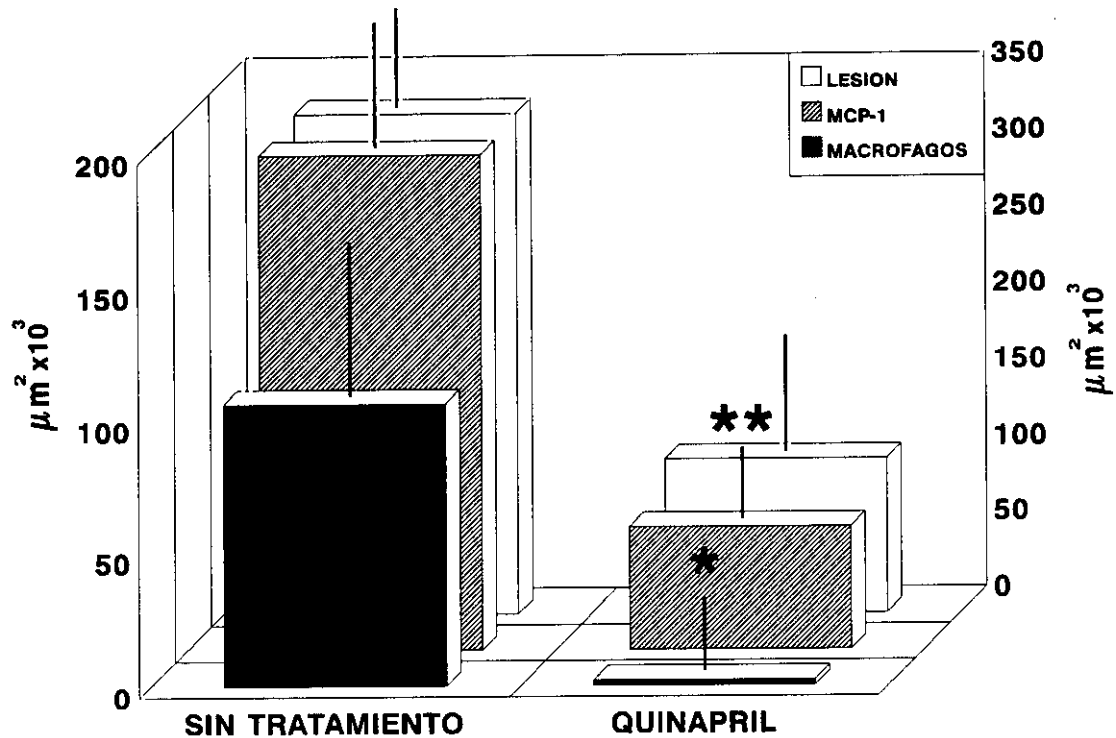


Figura 21B. *Análisis comparativo de la morfometría e inmunohistoquímica de macrófagos y MCP-1 en el modelo de 28 días.* La gráfica de barras muestra el área de máxima lesión (blanco, eje derecho), área positiva para MCP-1 (rayado, eje izquierdo) y el área positiva para macrófagos (negro, eje izquierdo). Los datos representan la media \pm EEM (μm^2). (* $p < 0.03$ y ** $p < 0.02$ animales tratados con quinapril vs sin tratamiento).

1.4.- CITOQUINAS EN ARTERIAS FEMORALES DAÑADAS

Las citoquinas son mediadores multipotenciales de la inflamación y de la inmunidad que pueden afectar a las funciones claves de las células de la pared vascular influyendo en la iniciación de la lesión, progresión o complicación (Libby et al., 1995).

Por esta razón, nos planteamos en primer lugar determinar si en los conejos sin tratamiento estaba aumentada la expresión génica de estos factores en las arterias femorales dañadas, estudiando en concreto citoquinas quimiotácticas (quimioquinas) como el MCP-1 e IL-8 y otras citoquinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α . En segundo lugar, con el propósito de elucidar los mecanismos del efecto beneficioso de la inhibición de la ECA, determinamos si el tratamiento con el iECA quinapril modula la expresión de algunos de estos factores.

1.4.1.- Expresión de MCP-1

La expresión del mRNA para el MCP-1 se estudió en cada arteria individualmente mediante un método semicuantitativo de RT-PCR. La amplificación del fragmento de MCP-1, se realizó en las mismas condiciones que el fragmento del gen de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (G3PDH) utilizado como control interno, según se describe en métodos. El densitometrado de las bandas muestra que la amplificación fue lineal hasta los 35 ciclos tanto para MCP-1 como para la G3PDH. Los datos obtenidos a los 35 ciclos se utilizaron para los cálculos.

Modelo de 7 días:

Como se muestra en la figura 22 los animales control no mostraron expresión para MCP-1, mientras que éste aumentó de forma significativa en los animales sin tratamiento (6.3 ± 1.2 U.D; n=6). Los conejos tratados con quinapril mostraron una disminución significativa de la expresión arterial del MCP-1 (3.4 ± 1.4 U.D; n=7; p<0.04 vs animales sin tratamiento). En la figura mencionada se muestra una PCR representativa obtenida tras hacer una mezcla con 1 μ g de RNA de todos los animales de cada grupo de estudio.

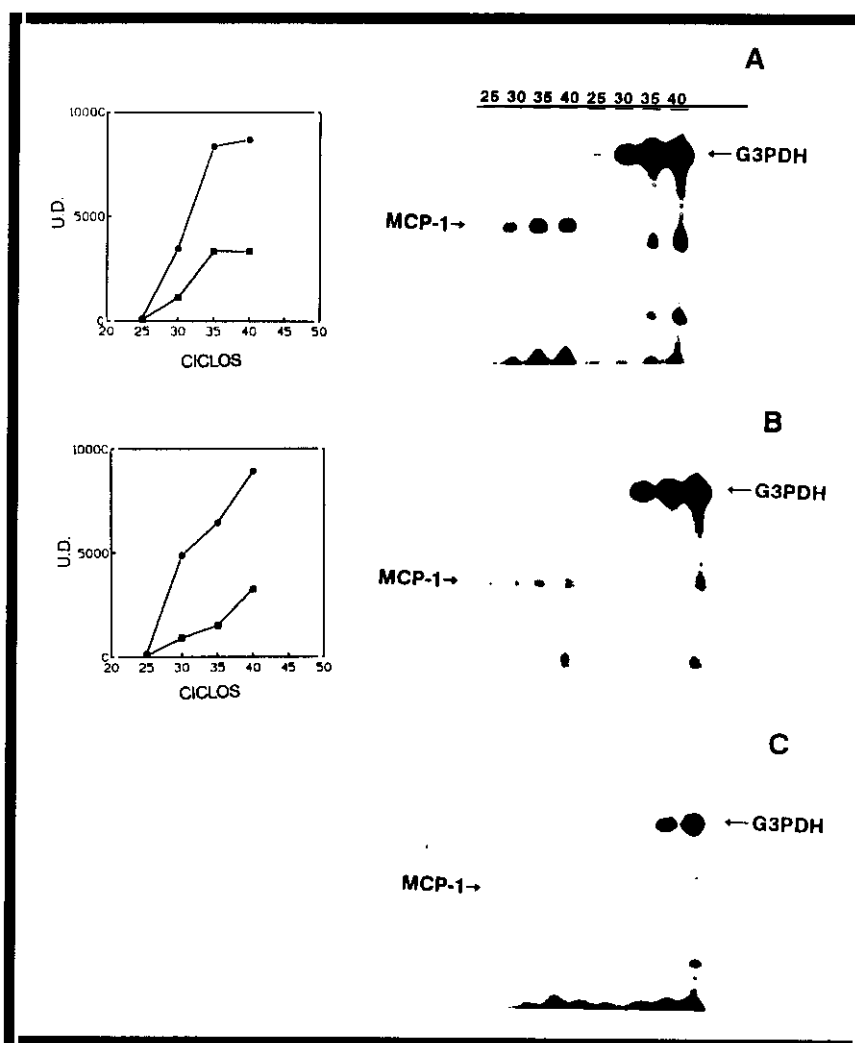


Figura 22. *Expresión de MCP-1 en arterias femorales por RT-PCR a los 7 días.* Productos de RT-PCR obtenidos de la mezcla de mRNA de los animales sin tratamiento (A), tratados con quinapril (B), y control (C). Se llevaron a cabo amplificaciones a 25, 30, 35 y 40 ciclos. El análisis densitométrico de los productos de PCR se muestra en la parte izquierda. Los datos están en unidades arbitrarias de densitometría (U.D); ● indica G3PDH, ■ MCP-1. A la derecha se muestra una autorradiografía de los geles.

Resultados similares ($\approx 50\%$ de reducción de la expresión del mRNA en el grupo tratado con quinapril) se obtuvieron cuando la mezcla de RNA de cada grupo experimental se sometió a análisis por northern blot (figura 23).

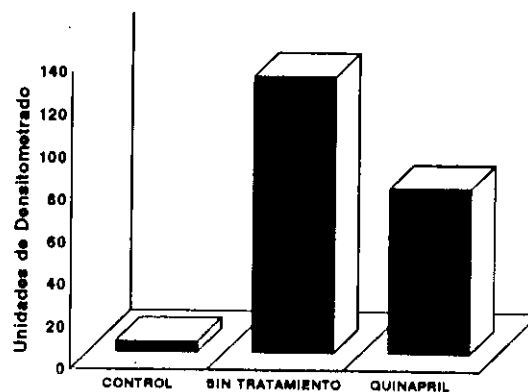
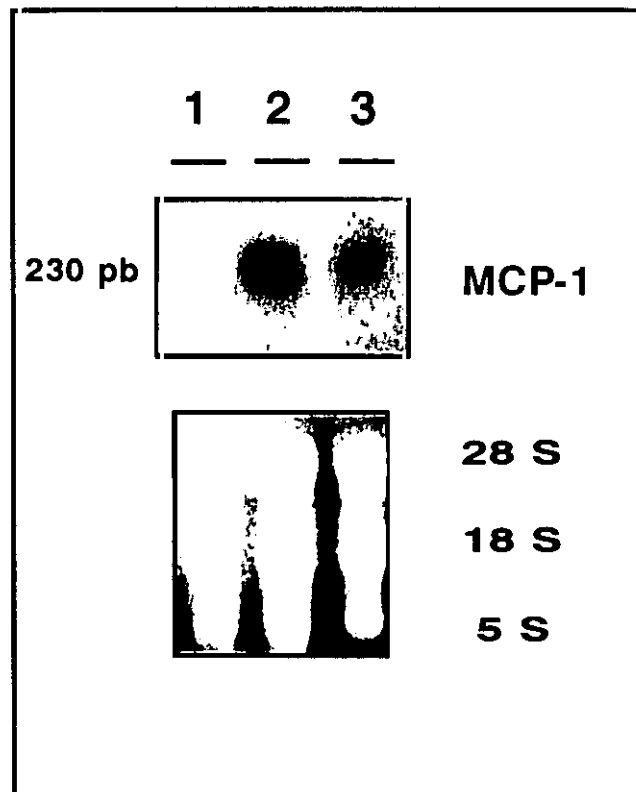


Figura 23. Análisis por northern blot de la expresión del mRNA del MCP-1 en las arterias femorales. El RNA de los animales del mismo grupo se mezcló, y el northern blot se llevó a cabo con una sonda para MCP-1 de conejo, marcada con ^{32}P , obtenida por PCR ("Ver métodos"). En la parte superior se muestra un gel con bromuro de etidio y en la parte inferior, el análisis densitométrico. (1) Conejos control, (2) sin tratamiento, y (3) tratados con quinapril.

Modelo de 28 días:

En el momento del sacrificio los conejos que no habían recibido tratamiento presentaron un gran incremento en la expresión génica del MCP-1 (4.8 ± 2 ; $n=7$) respecto a los animales control que no lo expresaron (figura 24). El tratamiento con quinapril disminuyó de forma significativa la expresión de este gen (2.4 ± 1.4 , $n=6$; $p<0.03$ vs animales sin tratamiento)

Por northern blot observamos un descenso de un 40% en la expresión del MCP-1 en los conejos tratados con quinapril (no mostrado).

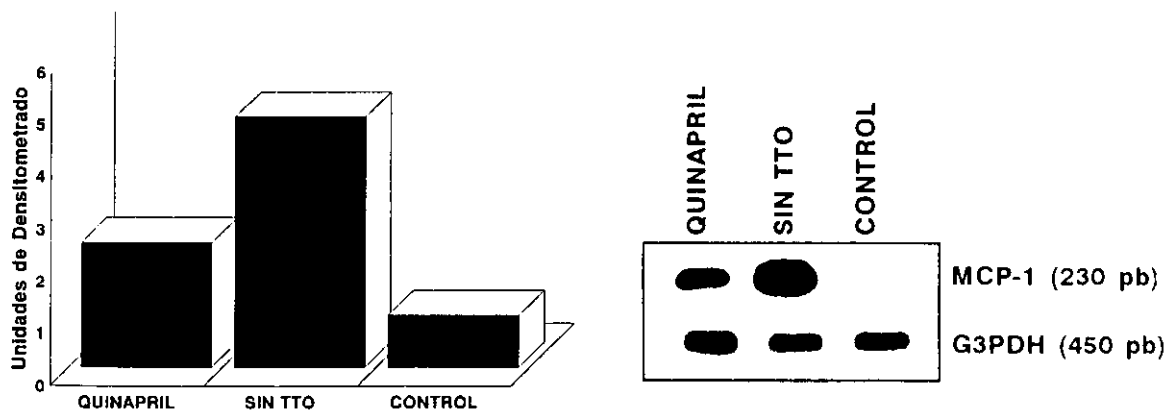


Figura 24. *Expresión de MCP-1 en arterias femorales por RT-PCR a los 28 días.* El mRNA del MCP-1 y de la G3PDH (control interno) se determinó por RT-PCR utilizando los cebadores específicos en cada caso. El análisis densitométrico de los productos de PCR se llevó a cabo a los 35 ciclos de amplificación.

1.4.2.- Expresión e inmunolocalización de IL-8

IL-8 es un péptido quimiotáctico, perteneciente a la subfamilia de las α -quimioquinas, producido principalmente por macrófagos y que se ha implicado en el reclutamiento de células inflamatorias en la placa aterosclerótica (Apostopoulos et al., 1996). Por esta razón decidimos estudiar esta quimioquina mediante análisis por RT-PCR en las femorales dañadas de los animales, utilizando la mezcla de los RNA de los animales del mismo grupo.

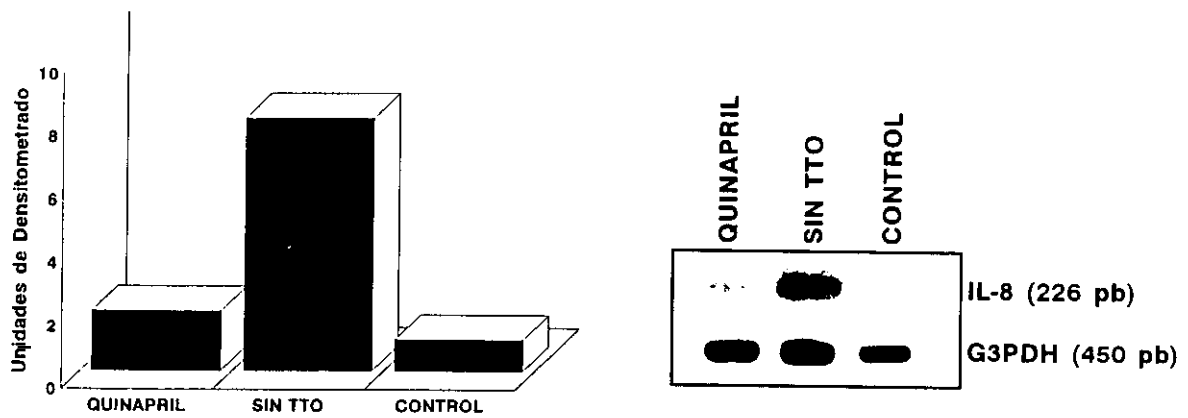
Modelo de 7 días:

En este modelo, estudiamos la expresión de esta quimioquina en las arterias femorales dañadas. Como se muestra en la figura 25 los animales sin tratamiento presentaron un gran incremento de dicha expresión respecto al grupo control (8 veces), que disminuyó marcadamente con quinapril (1.9 veces).

Modelo de 28 días:

Siguiendo el mismo objetivo, analizamos la expresión del mRNA de IL-8 en este modelo, observándose (figura 25) que al cabo de 28 días los animales que no habían recibido tratamiento mostraron un fuerte incremento en la expresión de dicha quimioquina respecto al grupo control (10 veces). Al igual que en el modelo anterior, el tratamiento con quinapril disminuyó de manera notable dicha expresión (4.7 veces).

A



B

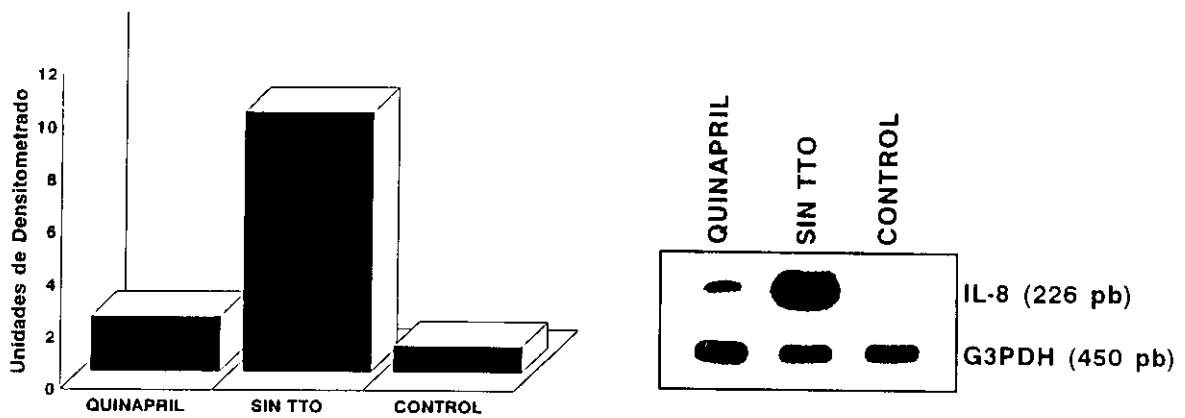


Figura 25. Expresión génica del mRNA de IL-8 en las arterias femorales de conejo. A) Modelo de 7 días, B) modelo de 28 días. El mRNA de IL-8 y de G3PDH se determinó por RT-PCR a 30 ciclos de amplificación, utilizándose las mezclas del RNA de cada grupo. En cada caso se emplearon cebadores específicos. En la parte derecha se muestra una autorradiografía representativa y en la parte izquierda el análisis densitométrico de los valores de densidad óptica obtenidos para IL-8 corregidos por la expresión de G3PDH.

Estudio inmunohistoquímico:

Con el propósito de determinar si este incremento en la expresión del mRNA de IL-8 se correspondía con un aumento de la expresión proteica en la arteria, nos planteamos estudiar, mediante inmunohistoquímica, el patrón de distribución de esta quimioquina a nivel neointimal y de capa media en el modelo de 28 días, donde ya aparece una lesión más madura. Como se muestra en la figura 26 los animales sanos apenas presentaron tinción, mientras que en los animales sin tratamiento se observó un incremento en el acúmulo de IL-8 a nivel neointimal. Por el contrario, el tratamiento con quinapril produjo una disminución significativa de la presencia de esta quimioquina (14 ± 3 , n=9; vs 9 ± 3 , n=5; $p < 0.04$; valoración semicuantitativa).

A nivel de la capa media, el tratamiento también indujo una reducción de la expresión proteica de IL-8, aunque en este caso no se alcanzó la significación estadística (11 ± 4 , n=9; vs 8 ± 5 , n=5).

Estos resultados confirman así los obtenidos mediante el análisis de la expresión del mRNA comprobando el importante efecto que ejerce el tratamiento con quinapril sobre esta quimioquina.

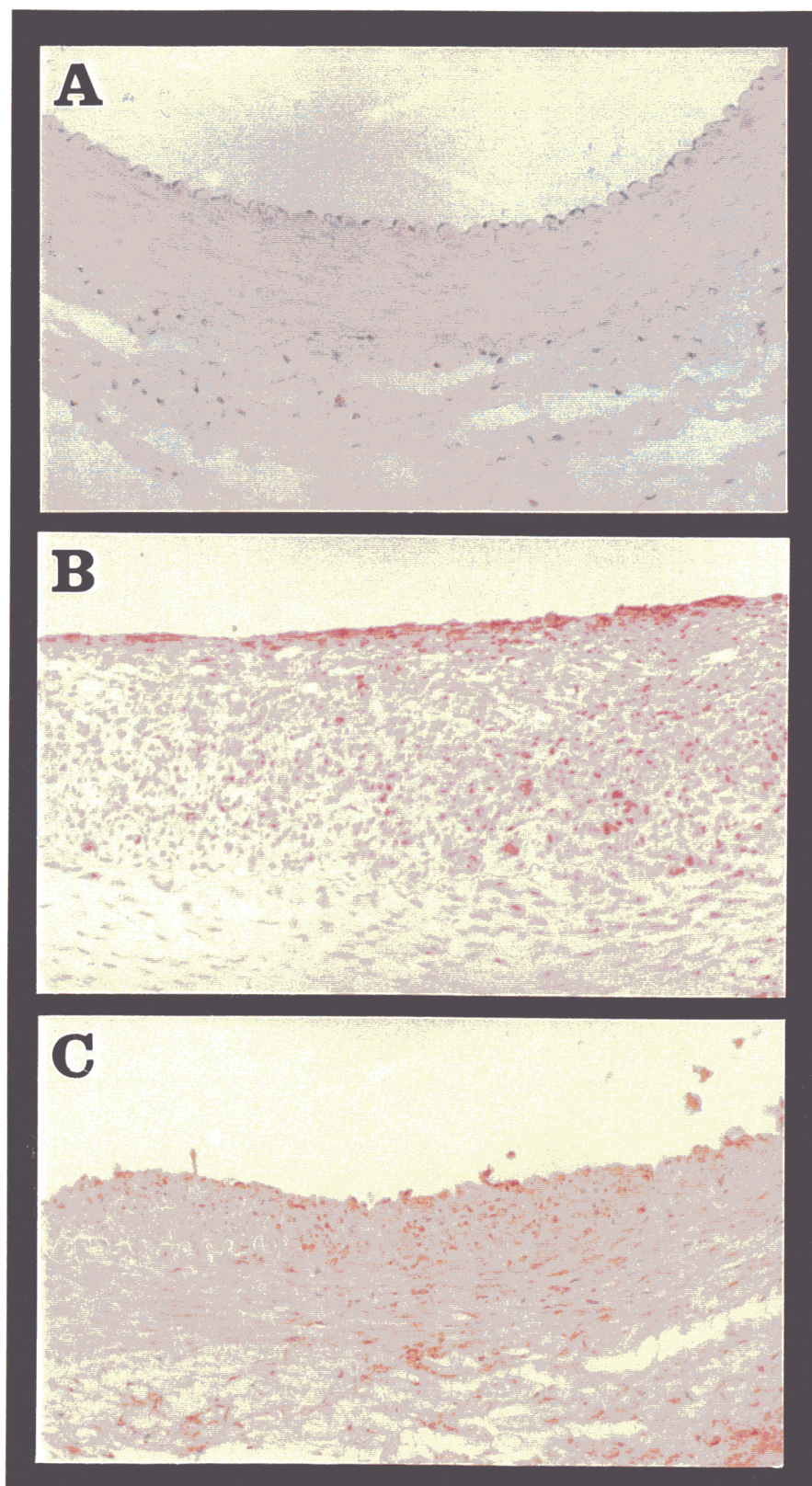


Figura 26. *Detección inmunohistoquímica de IL-8 en las arterias femorales.* Microfotografías de secciones de arteria femoral teñidas con un anticuerpo monoclonal para IL-8 humana empleándose un anticuerpo secundario unido a fosfatasa alcalina. **A)** Animal sano, **B)** animal no tratado que presenta acúmulo de IL-8 a nivel neointimal, **C)** animal tratado con quinapril donde se observa una disminución de la tinción en la íntima. (Magnificación x400).

1.4.3.- Expresión de IL-1 β

Tras la disrupción de la superficie endotelial, los monocitos y plaquetas localizados a nivel subintimal parecen expresar en su superficie una actividad IL-1 β que probablemente contribuye a los eventos tempranos que van a originar la lesión aterosclerótica (Wang et al., 1995). Estudios recientes han venido a demostrar que en la lesión ateromatosa la citoquina IL-1 β producida tanto por células espumosas como por el endotelio, induce la expresión de las quimioquinas IL-8 y MCP-1 facilitando así la activación y la trans migración endotelial de las células inflamatorias (Dinarello, 1996).

El análisis del mRNA de IL-1 β se realizó mediante RT-PCR a 30 ciclos de amplificación, utilizando la mezcla de los RNA de los animales del mismo grupo.

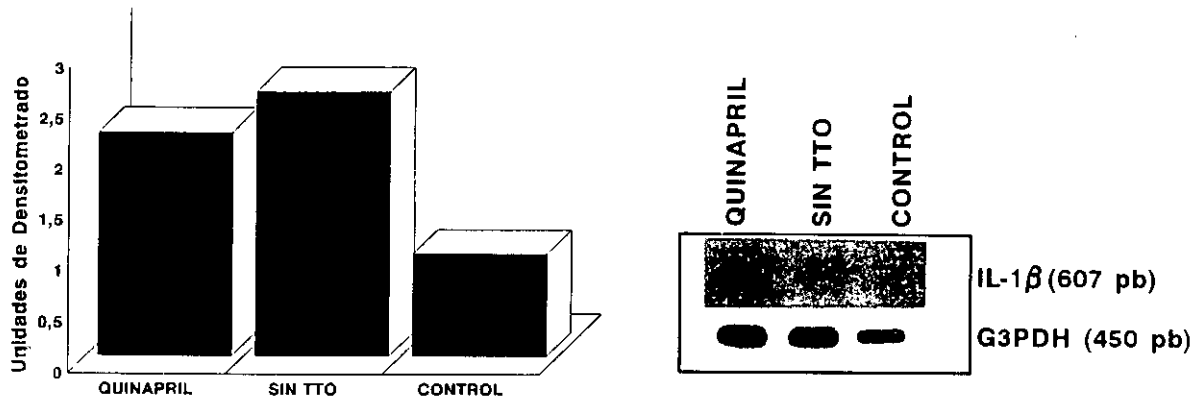
Modelo de 7 días:

Como se muestra en la figura 27, el grupo de animales no tratados presentó, respecto al grupo control, un incremento de la expresión de IL-1 β de 2.6 veces. El tratamiento con quinapril no modificó este incremento.

Modelo de 28 días:

Los animales sin tratamiento tras 28 días de dieta hipercolesterolémica mostraron un gran aumento en la expresión de esta citoquina respecto al grupo de animales sanos (5 veces). En la figura 27 se aprecia que el tratamiento con quinapril disminuyó de forma significativa la expresión de IL-1 β .

A



B

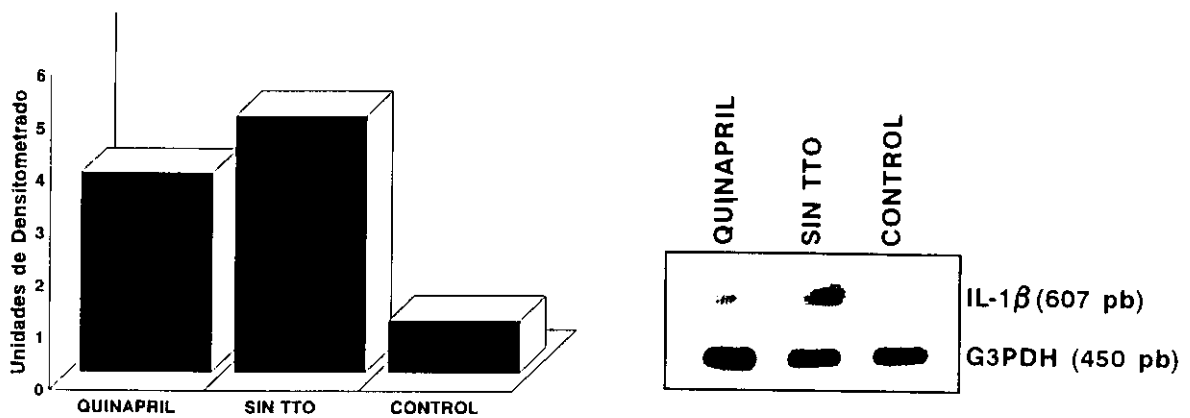


Figura 27. Expresión génica del mRNA de IL-1 β en las arterias femorales de conejo. A) Modelo de 7 días, **B)** modelo de 28 días. El mRNA de IL-1 β y del G3PDH (control interno) se determinó mediante RT-PCR a 30 ciclos de amplificación, utilizándose mezclas del RNA de cada grupo y empleándose cebadores específicos en cada caso. En la parte derecha se muestra una autorradiografía representativa y en la parte izquierda el análisis densitométrico de los valores de densidad óptica obtenidos para IL-1 β corregidos por la expresión del G3PDH.

1.4.4.- Expresión de TNF- α

El TNF- α es otra citoquina proinflamatoria que juega un importante papel en el desarrollo de la lesión aterosclerótica. Se ha demostrado que junto con IL-1 β y TGF- β puede inhibir la proliferación endotelial y además puede inducir la expresión de genes de forma indirecta, como el PDGF, al actuar sobre macrófagos, CML y CE (Ross et al., 1996). Además también parece estar implicada en la regulación de algunas metaloproteinasas.

Mediante RT-PCR determinamos la expresión del mRNA del TNF- α en las femorales dañadas a los 7 y 28 días.

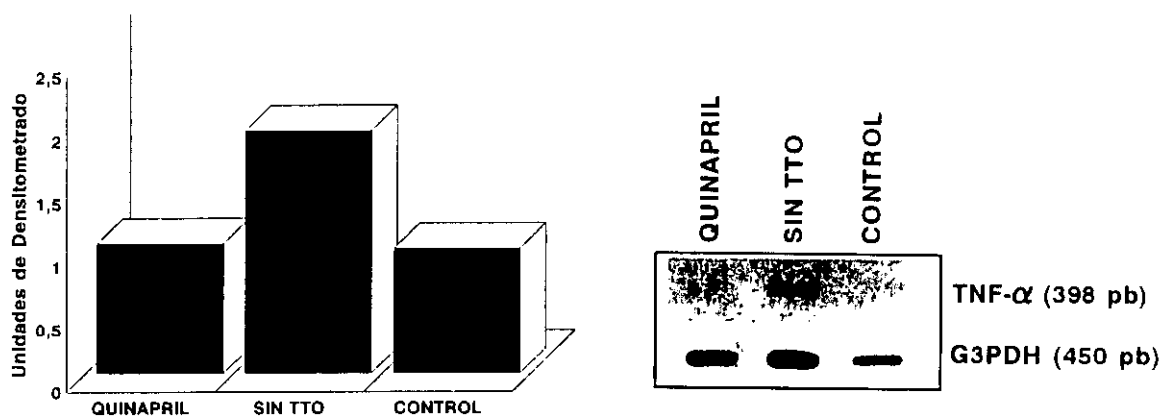
Modelo de 7 días:

Como se muestra en la figura 28, los animales que no fueron tratados presentaron un ligero aumento en los niveles del mRNA (1.6 veces) respecto al grupo de animales sanos. Estos niveles se normalizaron en el grupo al que se suministró quinapril.

Modelo de 28 días:

Los animales sin tratamiento mostraron un gran incremento en la expresión del TNF- α (6 veces). Sin embargo, dicha expresión apenas se vió modificada por el tratamiento (figura 28).

A



B

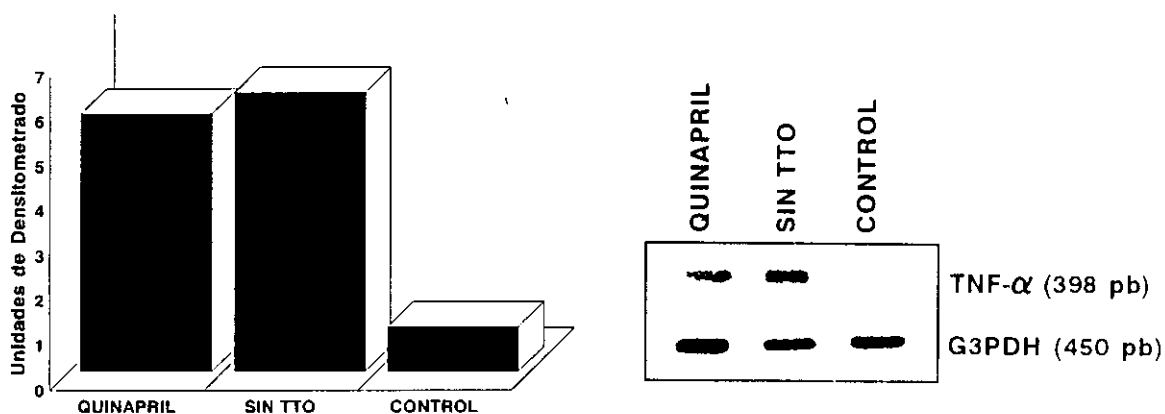


Figura 28. Expresión génica del mRNA del TNF- α en las arterias femorales de conejo .

A) Modelo de 7 días, B) modelo de 28 días. El mRNA del TNF- α y de G3PDH (control interno) se determinó por RT-PCR a 30 ciclos de amplificación, utilizándose mezclas del RNA de cada grupo y empleándose cebadores específicos en cada caso. En la parte derecha se muestra una autorradiografía representativa y en la parte izquierda el análisis densitométrico del TNF- α corregido mediante G3PDH.

1.5.- FACTORES DE CRECIMIENTO Y PROTEINAS DE MATRIZ

La producción de factores de crecimiento por CE, macrófagos, CML y linfocitos T, junto con una síntesis incrementada de proteínas de matriz conduce a la progresión de la lesión aterosclerótica hacia una placa fibrosa (Ross R, 1993). Entre estos factores de crecimiento decidimos estudiar, en las arterias femorales dañadas de los conejos, la expresión del PDGF-B mediante hibridación *in situ*. Centrándonos en el análisis del colágeno I como principal proteína de matriz implicada en el proceso aterogénico. Su análisis se llevó a cabo mediante northern blot.

1.5.1.- Expresión de PDGF-B

El PDGF-B además de ser un importante factor de crecimiento implicado en la acumulación de CML en las lesiones ateroscleróticas (Uchida et al., 1996), es un potente factor quimiotáctico de monocitos, sobre los que induce la expresión del factor tisular, principal iniciador de la cascada de coagulación (Ernofsson et al., 1996).

Mediante hibridación *in situ*, estudiamos la distribución celular del mRNA del PDGF-B en las arterias femorales dañadas de los animales del modelo de 28 días, al presentar éstos una lesión mucho más desarrollada.

Como se muestra en la figura 29, los conejos sanos apenas mostraron expresión, mientras que los que no recibieron tratamiento presentaron un gran incremento de la expresión génica del PDGF-B a nivel de la neointima y de la capa media ($10,2 \pm 4$ y $10,6 \pm 3$ respectivamente vs animales sanos; valoración semicuantitativa). Esta expresión coincidió con aquellas áreas que eran positivas para macrófagos. Por el contrario, los animales tratados con quinapril presentaron una marcada reducción de la expresión de este factor tanto en la **íntima** (5.5 ± 5 , n=7; p=0.059) como en la **media** (4.8 ± 5.5 , n=7; p<0.03), alcanzando en ésta la significación estadística.

Los controles negativos realizados con la sonda sentido no mostraron hibridación, demostrando así la especificidad de la técnica.

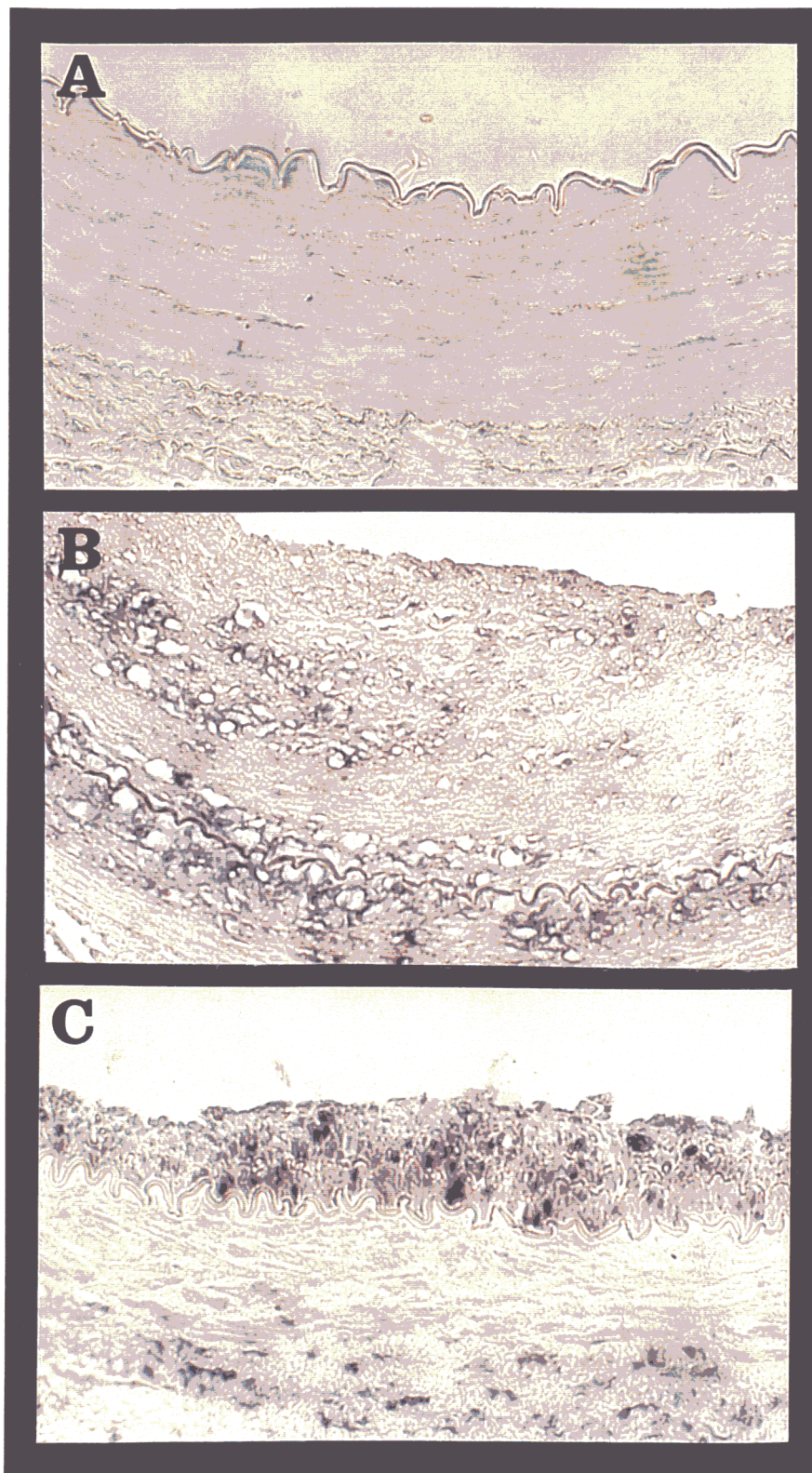


Figura 29. Localización de la expresión de PDGF-B por hibridación *in situ*. La sonda antisentido del PDGF-B marcada con digoxigenina fue hibridada con secciones de arteria femoral procedentes del modelo de 28 días. (A) Conejo sano, (B) sin tratamiento y (C) tratado con quinapril. (Magnificación x400).

1.5.2.- Expresión e inmunolocalización de colágeno I

Los colágenos vasculares son componentes decisivos de la integridad de la pared vascular, siendo el colágeno tipo I junto con el III los de mayor predominancia.

Modelo de 7 días:

Con el propósito de estudiar si el colágeno I estaba modificado al cabo de los 7 días de haberse producido el daño, analizamos su expresión mediante northern blot. Como se muestra en la figura 30, los animales sanos presentaron una expresión basal. Sin embargo, tanto los animales sin tratamiento como los tratados, mostraron un incremento similar en la expresión respecto a los animales sanos, siendo éste ligeramente mayor en el grupo al que se le administró el quinapril (1.65 y 1.92 veces respectivamente).

Modelo de 28 días:

También quisimos analizar la expresión de esta proteína de matriz en las arterias femorales dañadas al cabo de 28 días de dieta hiperlipémica. Los resultados revelaron un gran incremento en la expresión del mRNA respecto a los animales sanos (figura 30), que curiosamente fue similar tanto en el grupo no tratado (3.7 veces) como en el que se le administró el fármaco (3.5 veces).

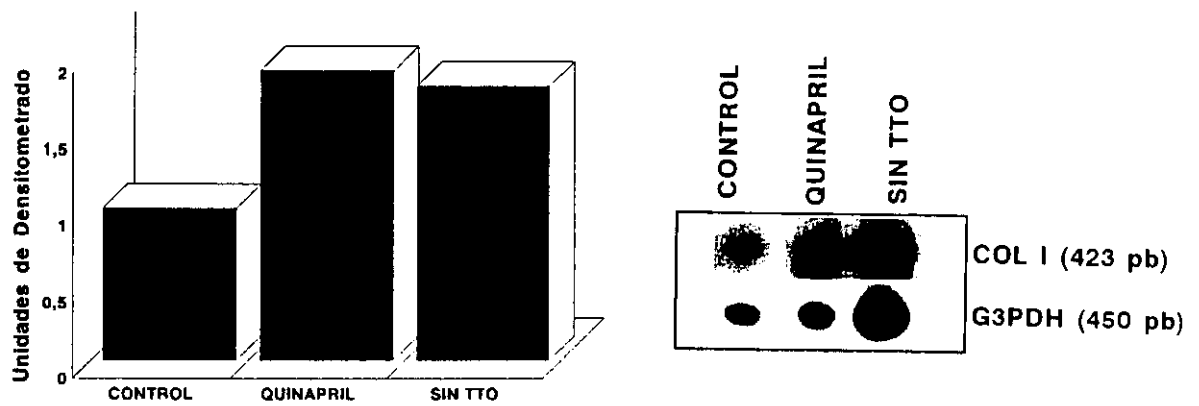
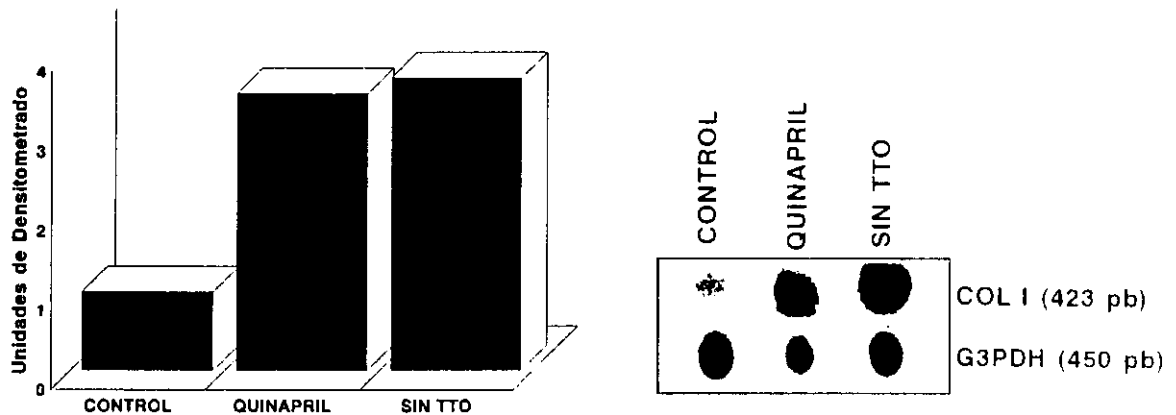
A**B**

Figura 30. *Expresión génica del mRNA del colágeno I en las arterias femorales de conejo.* En la parte derecha se muestra una autorradiografía representativa del análisis por northern blot de una mezcla de RNA total de los animales de cada grupo. En la parte izquierda aparece el análisis densitométrico. Los datos fueron corregidos mediante los valores obtenidos de G3PDH. **A)** Modelo de 7 días, **B)** modelo de 28 días.

Estudio inmunohistoquímico:

Una vez que constatamos que la expresión del mRNA de colágeno I no variaba con la administración de quinapril, nos propusimos confirmar mediante inmunohistoquímica, que esto ocurría también a nivel de proteína. Con este fin decidimos realizar el estudio en el modelo de 28 días, por presentar éste unas lesiones más acusadas.

En la figura 31A se puede observar que los animales sanos presentaron un ligera tinción a nivel de la capa media. Esta tinción apareció fuertemente incrementada en la **media** de las arterias dañadas en comparación a las sanas (figura 31B), pero no hubo diferencias entre los animales tratados y sin tratar (figura 31C) (10 ± 7 vs 8.2 ± 4.8 ; valoración semicuantitativa). La **neointima** también presentó una intensa tinción para colágeno I en ambos grupos, en este caso también hubo un patrón similar (11.8 ± 7 vs 10.5 ± 5).

Todos estos resultados confirman la existencia de una correlación entre la expresión génica y proteica del colágeno I en ambos modelos.

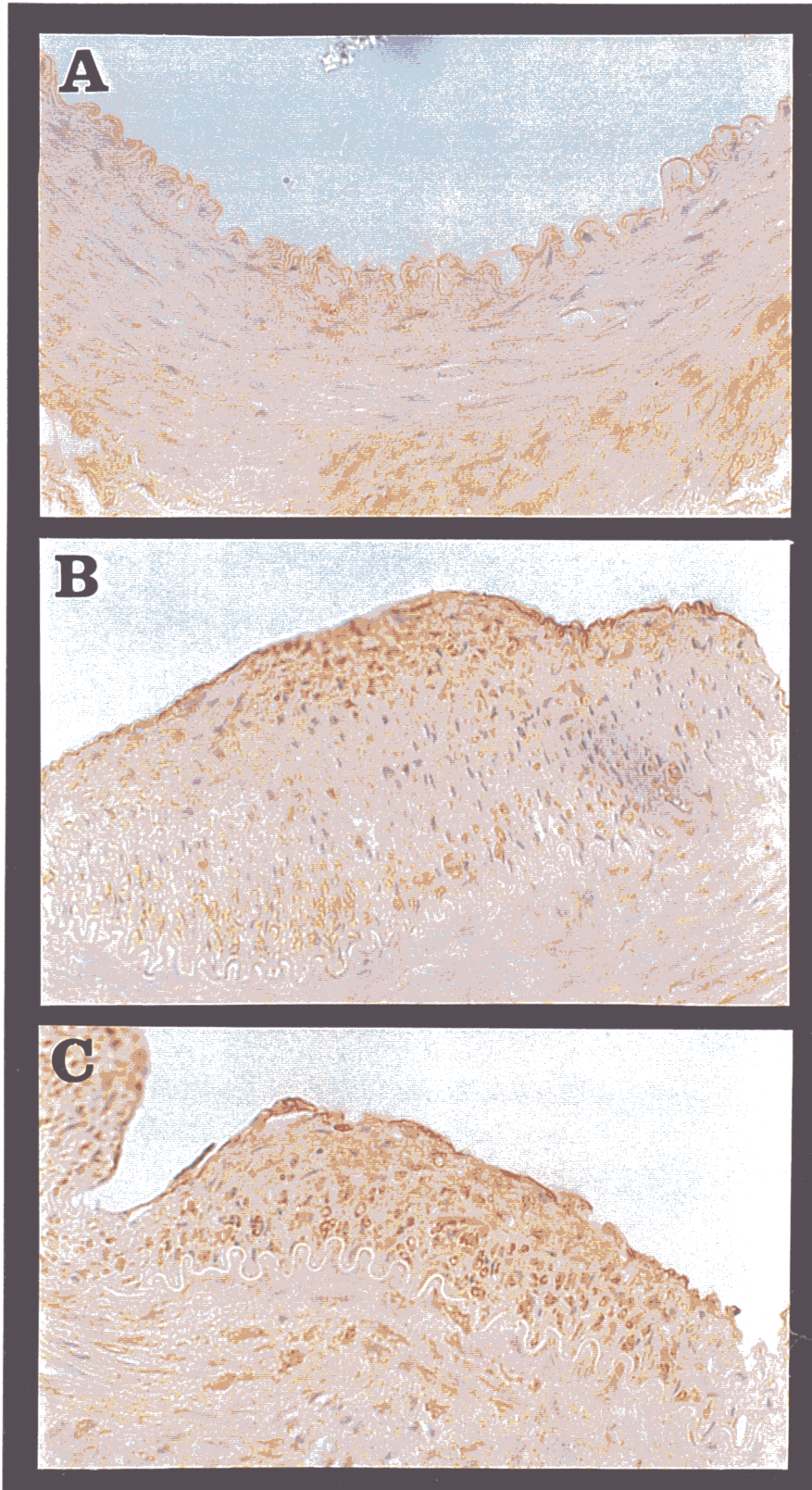


Figura 31. *Detección inmunohistoquímica del colágeno I en las arterias femorales a los 28 días.* Las microfotografías muestran una inmunohistoquímica representativa de secciones de arteria femoral de conejo que han sido teñidas con un anticuerpo policlonal para colágeno I humano. (A) Animal sano, (B) animal no tratado, (C) animal tratado con quinapril. (Magnificación x400).

1.6.- ACTIVIDAD NF- κ B EN LAS ARTERIAS DE CONEJO

Para medir la actividad NF- κ B se extrajeron las arterias femorales dañadas y las aortas abdominales de tres animales distintos de cada grupo (control, sin tratamiento y tratado con quinapril). Una vez aisladas se obtuvieron los extractos celulares, como se describe en métodos y se mezclaron.

La actividad se cuantificó usando 10 μ g de proteína total de cada mezcla, y los experimentos se hicieron por duplicado. Los controles negativos sin extracto celular y los ensayos de competición con un exceso de 50 veces de los oligonucleóticos NF- κ B y AP-1 se realizaron para establecer la especificidad de la reacción.

No se encontró ninguna señal en las reacciones sin los extractos celulares y la especificidad fue demostrada por el efecto de competición con NF- κ B frío mediante la disminución de la señal de las bandas de retardo (no mostrado).

Modelo de 7 días:

- Actividad NF- κ B en arteria femoral:

Con respecto a los controles, las arterias dañadas de los animales sin tratamiento mostraron un incremento en la actividad NF- κ B de 7 veces, que disminuyó a un incremento de 4 veces en los animales tratados con quinapril (Figura 32, líneas 1 y 2). Además, para caracterizar la actividad NF- κ B encontrada en las arterias dañadas, hicimos ensayos de superretardo con los extractos celulares de los animales no tratados. Para ello utilizamos anticuerpos para las dos subunidades de NF- κ B, p50 y p65.

Tanto el anticuerpo anti-p65 como el anti-p50 redujeron la intensidad de la banda principal. Aunque sólo en presencia del anticuerpo anti-p50 apareció un complejo de superretardo (Figura 32, línea 5). Por lo tanto, p65 y p50 parecen ser componentes del complejo NF- κ B encontrado en la pared arterial.

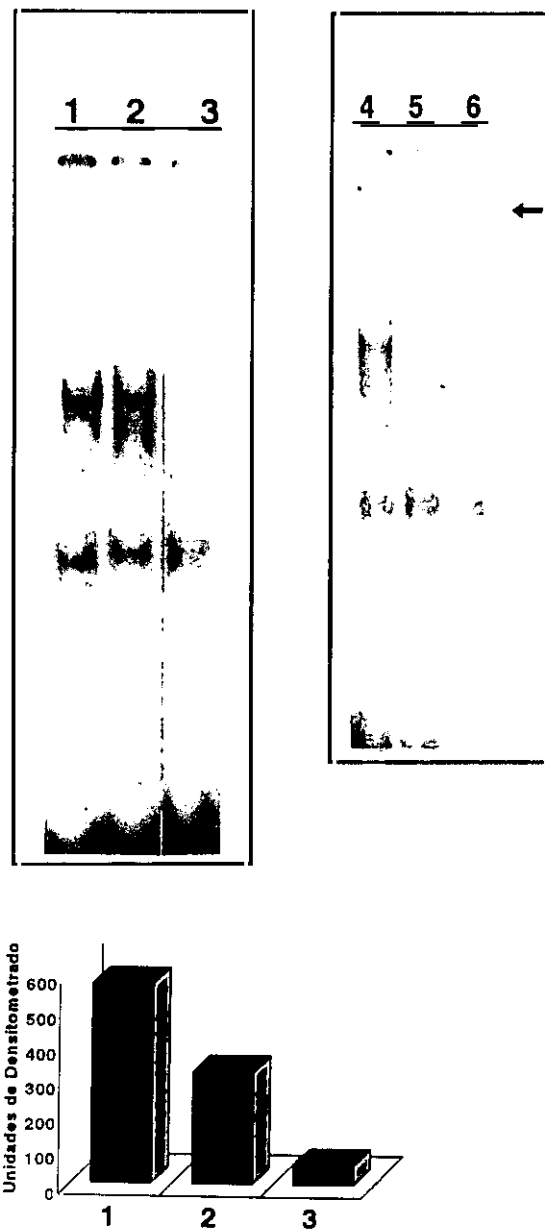


Figura 32. *Actividad NF- κ B en arterias femorales.* En la parte izquierda, los extractos celulares de 3 conejos diferentes de cada grupo se aislaron y se mezclaron. A continuación, mediante una sonda de NF- κ B se procedió al ensayo de movilidad electroforética. (1) Conejos sin tratamiento, (2) tratados con quinapril, y (3) conejos control. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de las bandas. Los extractos celulares de los conejos no tratados también se incubaron en ausencia (4) o presencia de los anticuerpos contra las subunidades de NF- κ B p50 (5) y p65 (6). La flecha muestra la presencia de una banda de superretardo.

- *Actividad NF- κ B en aorta:*

Puesto que el colesterol total sérico al cabo de los siete días presentaba un aumento de 10 veces respecto a los niveles basales (643 ± 343 vs 60 ± 24 mg/dl), nos propusimos determinar el efecto de la dieta hipercolesterolémica en la actividad NF- κ B de un vaso al que no habíamos inducido daño. Con este fin, analizamos los extractos de proteína celular obtenidos de las aortas abdominales. Como se muestra en la figura 33, apareció un incremento de la actividad NF- κ B en las aortas de animales sin tratamiento (4 veces sobre el control) (líneas 1 y 2), el tratamiento con quinapril redujo el incremento de dicha actividad 2 veces sobre el control (línea 3). Sin embargo hay que destacar que la actividad NF- κ B fue mucho mayor en las femorales dañadas que en las aortas no manipuladas.

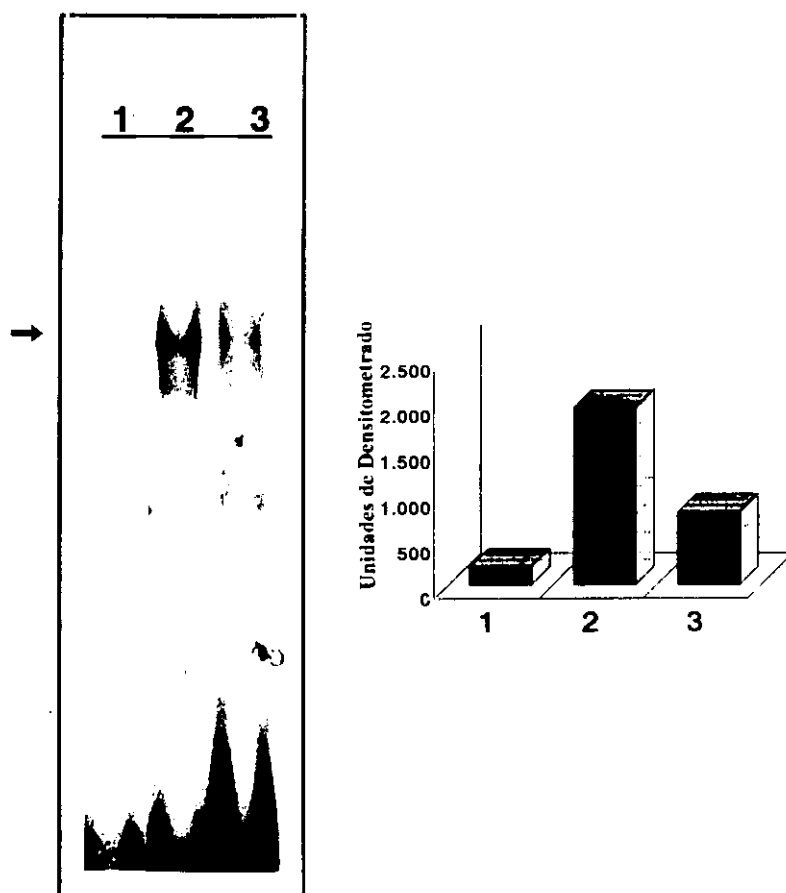


Figura 33. *Actividad NF- κ B en arterias aortas.* (1) Conejos control, (2) sin tratamiento, y (3) tratados con quinapril. En la parte derecha se muestra el análisis densitométrico de las bandas.

*Modelo de 28 días:**- Actividad NF- κ B en la aorta:*

Tras los resultados obtenidos en el modelo de 7 días, decidimos medir la actividad NF- κ B en las aortas para comprobar el efecto directo que ejercen los altos niveles de colesterol alcanzados en este modelo (1446 ± 425 vs 41 ± 10) sobre una arteria no dañada. Con este propósito analizamos los extractos de proteína celular obtenidos de las aortas abdominales.

Como se muestra en la figura 34, las aortas de animales sin tratamiento presentaron un incremento de la actividad NF- κ B (9 veces sobre el control) (línea 1), mientras que el tratamiento con quinapril redujo el incremento de dicha actividad (6 veces sobre el control) (línea 2).

Por otro lado, caracterizamos la actividad NF- κ B encontrada en las aortas de los animales sin tratamiento mediante ensayos de superretardo. Tanto el anticuerpo anti-p65 como el anti-p50 redujeron la intensidad de la banda principal. Además, el anticuerpo anti-p50 indujo la aparición de un complejo de superretardo (Figura 34, línea 5).

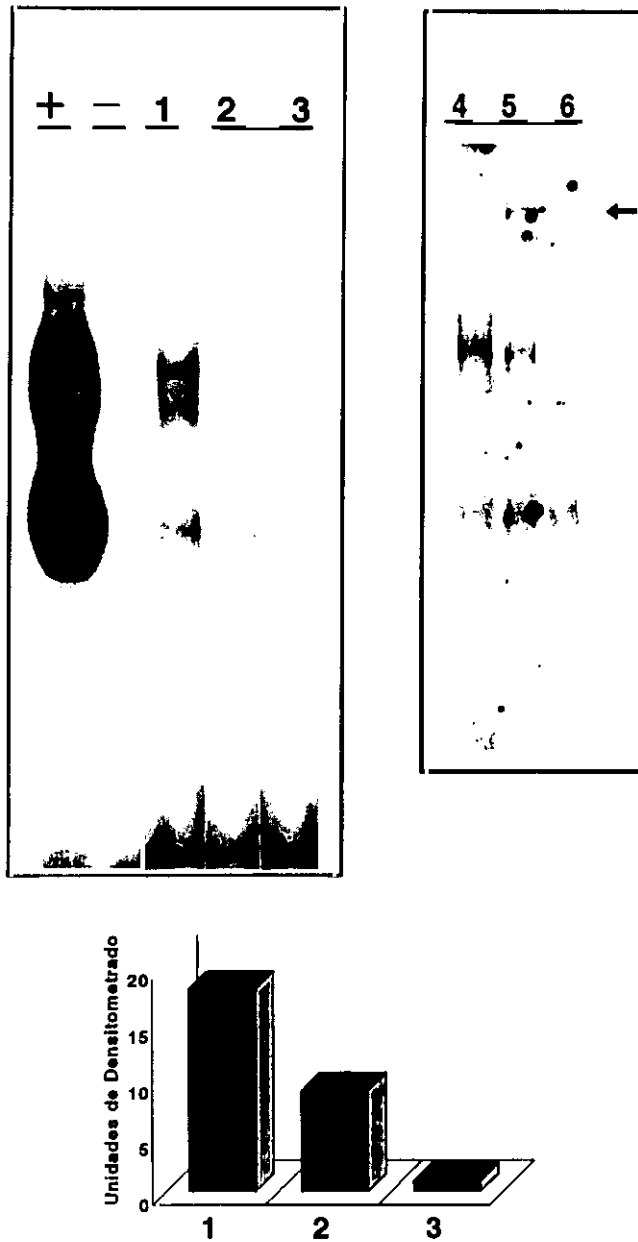


Figura 34. Actividad $NF-\kappa B$ en arterias aortas. (+) Extractos nucleares procedentes de HeLa se incubaron con el oligonucleótido marcado y se utilizaron como control del ensayo, (-) control negativo sin extracto celular, (1) conejos sin tratamiento, (2) tratados con quinapril, y (3) conejos control. En la parte inferior se muestra el análisis densitométrico de las bandas. Los extractos celulares de los conejos no tratados también se incubaron en ausencia (4) o presencia de los anticuerpos contra las subunidades de $NF-\kappa B$ p50 (5) y p65 (6). La flecha muestra la presencia de una banda de superretardo.

- *Detección de la activación de NF- κ B in situ en arterias femorales:*

Con la intención de determinar *in situ* la presencia de NF- κ B activado en las lesiones, utilizamos la nueva técnica de South-Western (“ver métodos”). La cuantificación de núcleos teñidos en el tejido se llevó a cabo según una valoración semicuantitativa, comprendida entre 0 y 6 según la intensidad de la tinción que presentaba cada preparación. De esta manera encontramos que el 80% de los animales sin tratamiento mostraron positividad en la *media* y en la *neoíntima* para NF- κ B, mientras que sólo un 40% de los animales tratados con quinapril mostraron positividad. No se detectó actividad NF- κ B en los animales sanos (figura 35). La incubación de las preparaciones con una secuencia mutada de NF- κ B no mostró tinción, demostrando así la especificidad de la técnica (resultados no mostrados).

Además, con el propósito de estudiar qué tipo de células en la lesión eran positivas para la actividad NF- κ B, realizamos doble tinción con anticuerpos específicos para macrófagos y CML. En la figura 36A se muestra una doble inmunohistoquímica de la lesión de un animal sin tratamiento, en la que aparece en marrón el área ocupado por CML y en un ligero rosa, el área invadida por macrófagos. Ambos tipos celulares presentaron actividad NF- κ B. En la figura 36B se muestra un tinción doble de la zona de la cápsula de la lesión, donde se aprecian los núcleos con actividad NF- κ B en azul oscuro (flecha) y el citoplasma de las CML en marrón. En la figura 36C aparece el área correspondiente a la zona ocupada por los macrófagos, donde se muestran los núcleos en azul oscuro (flecha) y el citoplasma de los macrófagos en marrón.

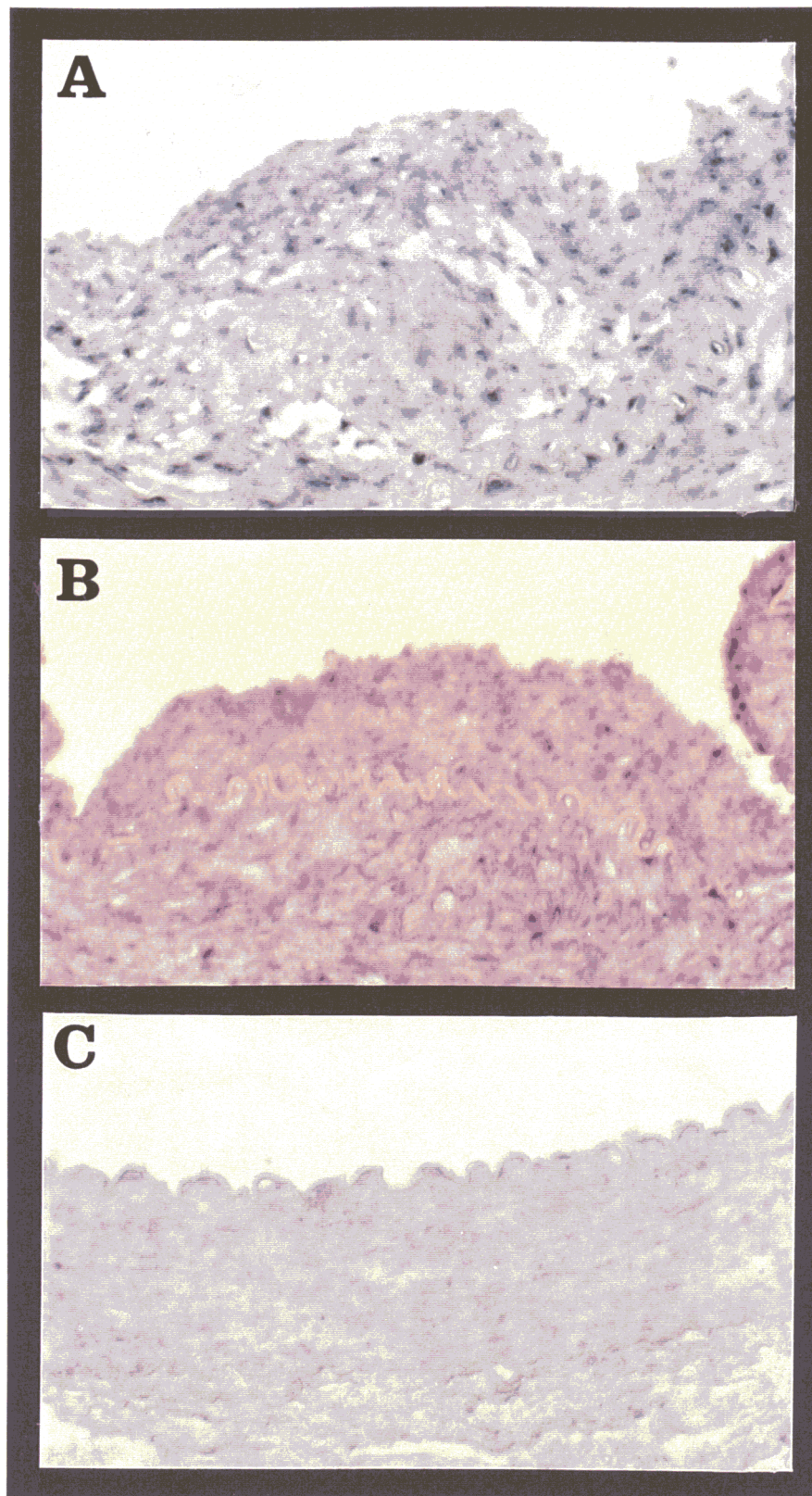


Figura 35. *Actividad NF- κ B en las lesiones del modelo de 28 días.* Microfotografías de secciones representativas de arteria femoral, donde se determinó la actividad NF- κ B mediante south-western en animales (A) sin tratamiento, (B) tratados con quinapril y (C) sanos. Los núcleos activados aparecen en azul oscuro. (Magnificación x400).

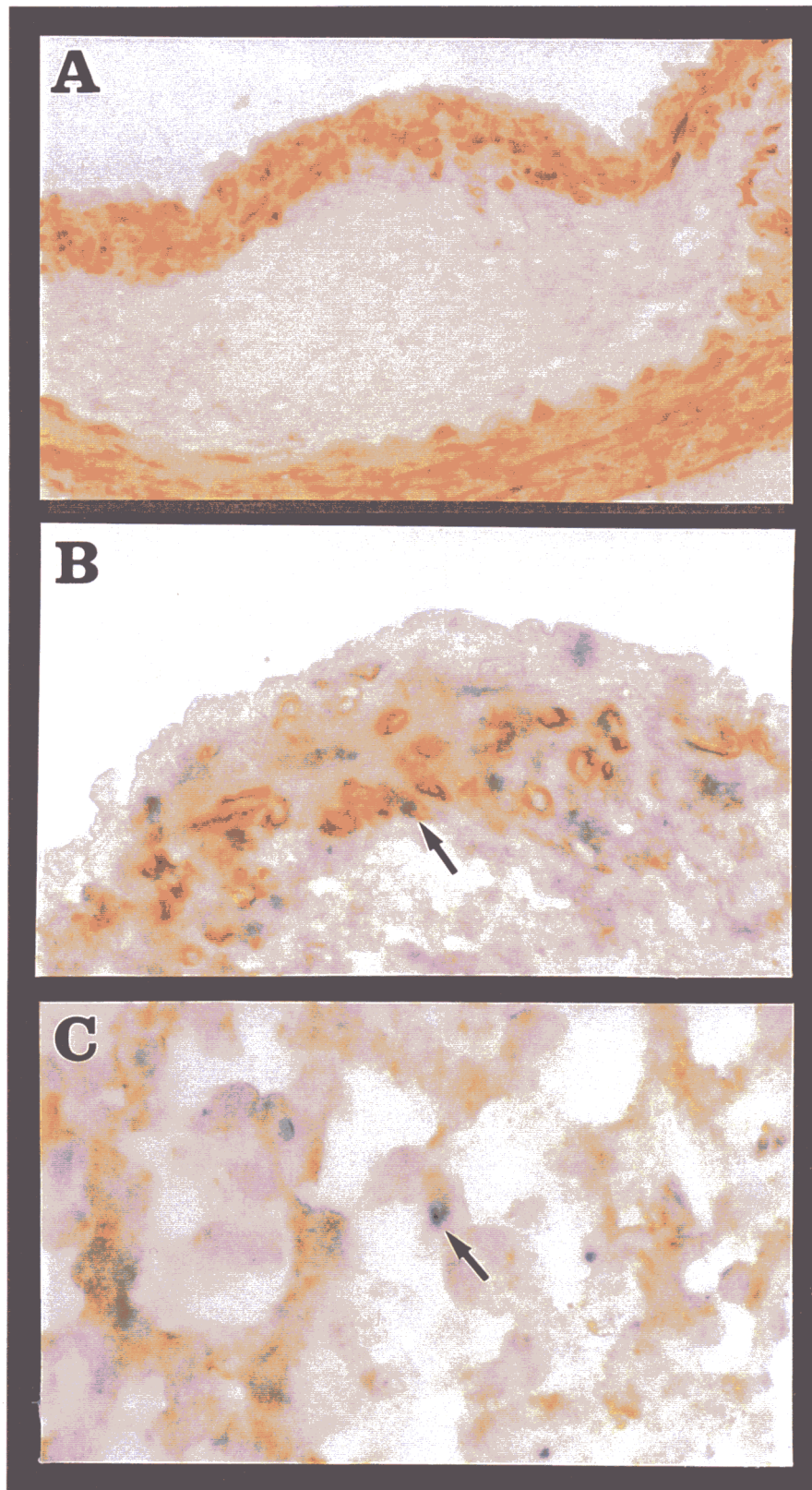


Figura 36. Colocalización de *NF-κB* activado en macrófagos y CML. (A) Doble inmunohistoquímica de CML (marrón) y macrófagos (rosa claro). (Magnificación x400). Mediante doble tinción se muestra un detalle de la micrografía anterior donde las flechas indican la presencia de un núcleo teñido para *NF-κB* (en azul oscuro) rodeado del citoplasma teñido (en marrón) con anticuerpos específicos para CML (B) y para macrófagos (C). (Magnificación x1000).

2.- EFECTO DE LA INHIBICION DE LA HMG-CoA REDUCTASA

Los inhibidores de la HMG-CoA reductasa o estatinas han demostrado ser muy eficaces en reducir la mortalidad total y cardiovascular, tanto en prevención primaria (The 4S investigators, 1994) como en secundaria (Shepherd et al., 1995). Sin embargo, aunque se sabe que las placas ricas en lípidos son más propensas a romperse, los mecanismos por los que los inhibidores de la HMG-CoA reductasa reducen los eventos coronarios no están demasiado claros.

En este sentido, en un modelo experimental de hiperlipidemia mixta (0.5% de colesterol y 14% de aceite de coco), hemos abordado el estudio del efecto del tratamiento con atorvastatina (Atv), una nueva estatina que además de reducir los niveles de colesterol total y LDL disminuye los triglicéridos (Bocan et al., 1994). Concretamente estudiamos su acción sobre la progresión de la placa y el contenido de macrófagos como marcador de su estabilidad.

2.1.- EVOLUCION DEL PESO Y DE LOS LIPIDOS PLASMATICOS

El peso de los animales se controló semanalmente con el fin de ajustar la dosis del medicamento en función de su evolución. Tras la cirugía se observó una ligera disminución del peso medio de los animales (3% tras la inducción del daño endotelial y 14% tras la angiografía control), que se recuperó en los dos casos hasta valores normales al cabo de las cuatro semanas. El tratamiento con Atv no modificó la evolución del peso (sin tratamiento: 3.2 ± 0.7 kg vs Atv: 3.3 ± 0.7 kg).

En la tabla XI observamos que en el momento de la distribución aleatoria, tras 4 semanas de dieta al 0.5% de colesterol y 14% de aceite de coco, el colesterol plasmático y el colesterol LDL estaban elevados unas 20 veces sobre los valores iniciales, los triglicéridos 2 veces y las HDL no se modificaron. Tras el tratamiento, en el momento del sacrificio, el grupo tratado con Atv presentó una disminución significativa del colesterol plasmático (60%; $p < 0.04$), del colesterol LDL (40%; $p < 0.02$) y de los triglicéridos (50%; $p < 0.02$) con respecto al grupo control. El colesterol HDL no se modificó con el tratamiento.

TABLA XI. Valores de los lípidos en el plasma (mg/dl)

	BASAL	DISTRIBUCION ALEATORIA	SACRIFICIO	
			Sin tratamiento	Atorvastatina
Colesterol	54 ± 43	1000 ± 419*	595 ± 404	249 ± 322**
LDL	42 ± 63	907 ± 455*	79 ± 29	49 ± 27 [#]
HDL	25 ± 16	27 ± 12	25 ± 9	25 ± 7
Triglicéridos	63 ± 18	133 ± 78*	96 ± 28	51 ± 33 [#]

*p<0.004 vs valores iniciales; **p<0.04, [#]p<0.02 vs animales sin tratamiento.

2.2.- ANALISIS DE LAS LESIONES VASCULARES

La evaluación de la lesión se realizó sobre cortes histológicos teñidos con orceína. Los datos se obtuvieron evaluando los cortes que presentaban la máxima lesión en cada animal. Como podemos comprobar en las Figuras 37 y 38, la estenosis máxima de las arterias femorales de los animales tratados con Atv fue significativamente menor que aquella del grupo sin tratamiento, estimada como la relación íntima/media (0.129 ± 0.038 vs 0.412 ± 0.322 ; $p=0.001$) o como porcentaje del área de la luz ocupada por la lesión ($10.06 \pm 7.03\%$ vs $21.24 \pm 13.54\%$; $p=0.038$).

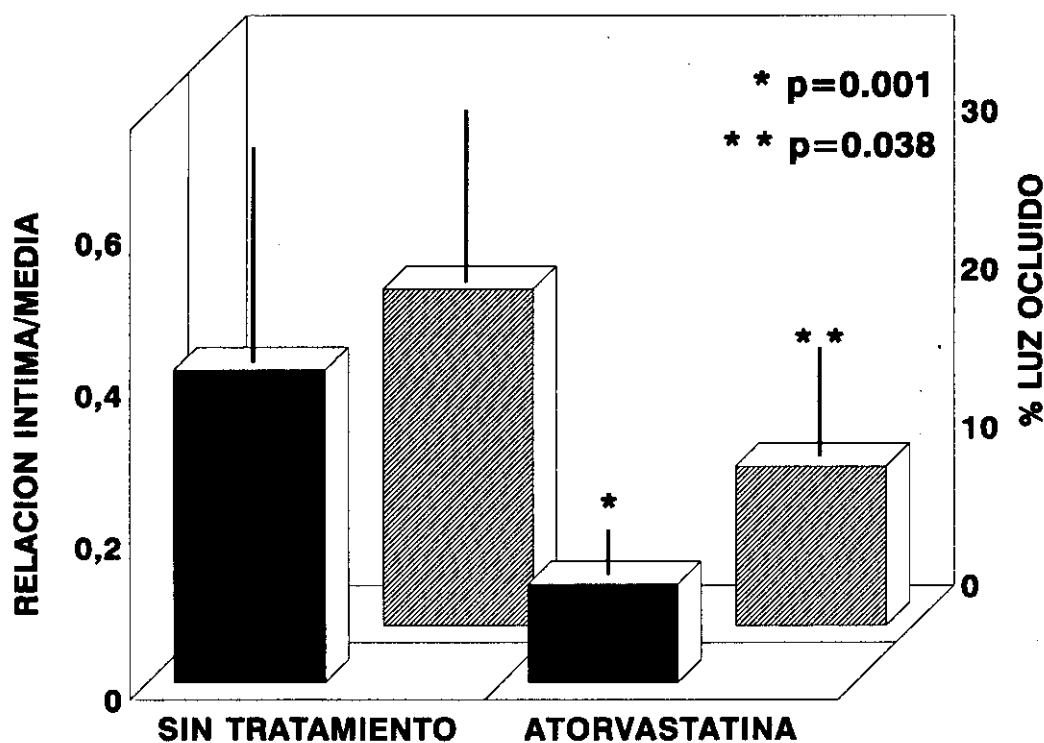


Figura 37. *Análisis morfológico de las lesiones.* Cuantificación morfológica de la lesión. Las barras en negro representan la relación íntima/media y las barras rayadas el porcentaje de luz ocluida. Los datos son la media de 7 conejos tratados frente a 8 sin tratar. * $p=0.001$ vs sin tratamiento; ** $p=0.038$ vs sin tratamiento. Las barras representan la media \pm EEM.

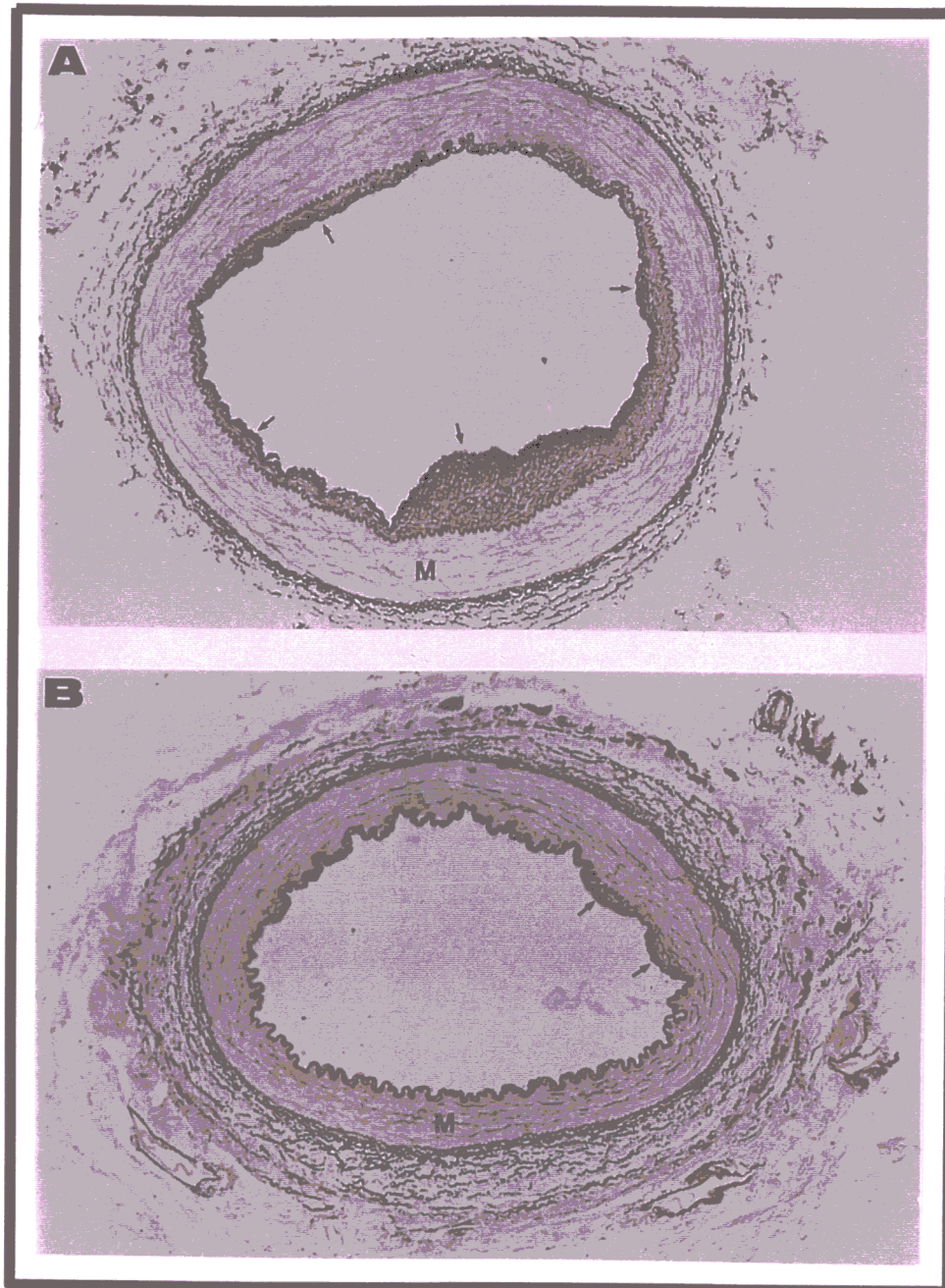


Figura 38. *Análisis de las lesiones vasculares.* Secciones representativas de arterias femorales teñidas con orceína. Se observa una mayor formación de neointima (**flechas**) en el animal no tratado (**A**) que en el perteneciente al grupo de Atv (**B**). **M**: Capa media de la arteria. (Magnificación x 100).

2.3.- EVALUACION DE LA PRESENCIA DE MACROFAGOS EN LAS LESIONES

La presencia de macrófagos se determinó por inmunohistoquímica empleando el anticuerpo monoclonal RAM11 y se evaluó en cada animal la sección que presentaba la máxima lesión. Los macrófagos estaban presentes en la **neointima** de las arterias de 5 de los 9 animales sin tratamiento (56%) y en ninguno (0%) de los 7 animales tratados con Atv ($p=0.034$). El área media neointimal ocupado por los macrófagos fue $1.470 \pm 2.750 \mu\text{m}^2$ en el grupo sin tratamiento. También hubo presencia de macrófagos en la **media** de 3 de 9 animales sin tratamiento (33%), mientras que en el grupo de Atv no se encontró ninguno. En la Figura 39 se muestra una sección representativa de cada grupo.

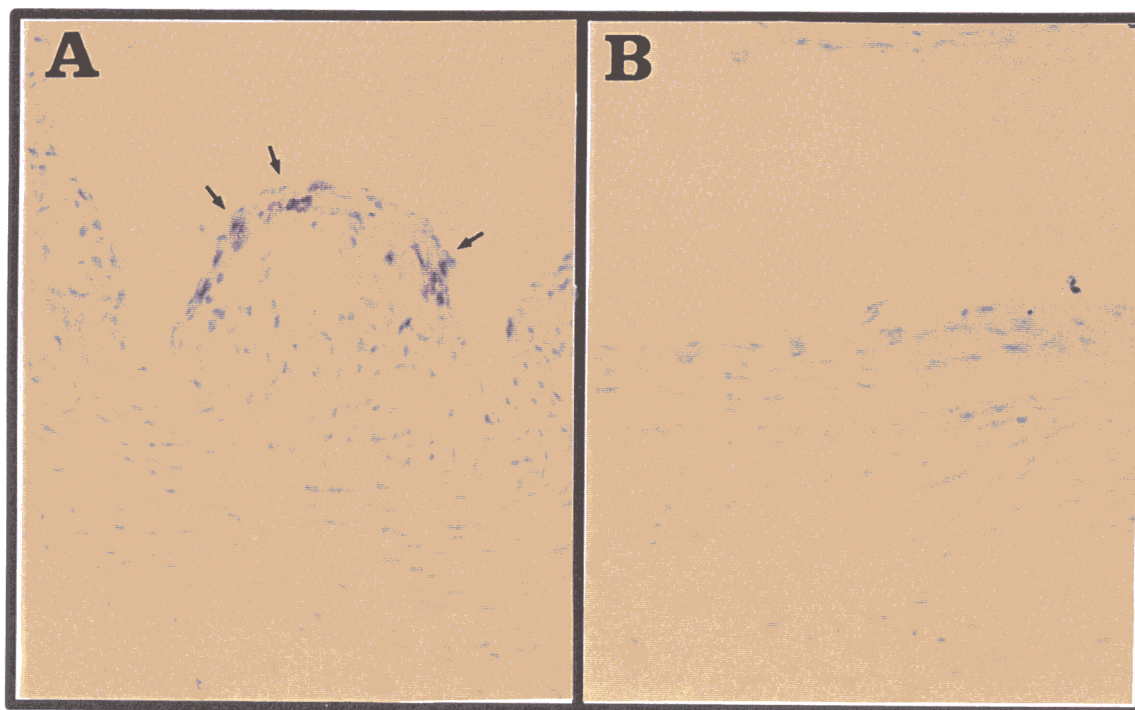


Figura 39. *Detección de macrófagos por inmunohistoquímica en secciones de arteria.* Secciones de arteria femoral teñidas con el anticuerpo RAM-11 anti-macrófagos de conejo. Se muestra un corte representativo de cada grupo de tratamiento. (A) Animal sin tratamiento, (B) animal tratado con Atv. La flecha indica la presencia de macrófagos (en marrón). (Magnificación x 400).

2.4.- EXPRESION DE MCP-1 EN LAS ARTERIAS FEMORALES

La expresión del mRNA de MCP-1 se cuantificó por RT-PCR, y tras comprobar que la amplificación del fragmento era lineal hasta los 35 ciclos, los resultados valorados son los obtenidos tras 30 ciclos de amplificación. Como podemos observar en la Figura 40, la expresión de MCP-1 aumentó 2 veces en el grupo no tratado, con respecto a los controles. Este incremento fue atenuado por el tratamiento con Atv.

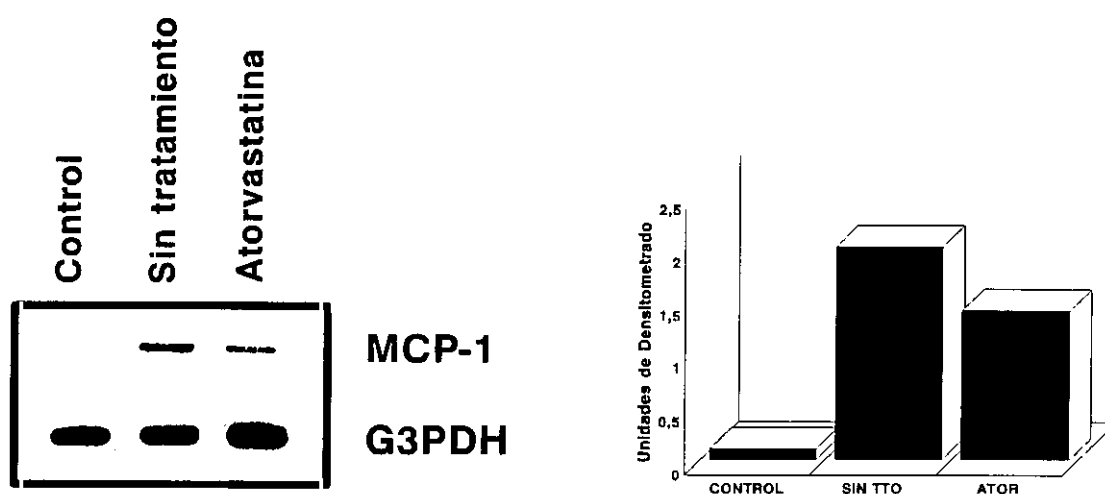


Figura 40. *Expresión de MCP-1 en arteria femoral.* El RNA se obtuvo de las arterias femorales mezclando el procedente de los animales del mismo grupo. Tras someterlo a RT se realizó la PCR durante 25, 30 y 35 ciclos de amplificación, valorando los resultados obtenidos a los 30 ciclos que se muestran en la parte izquierda. En la parte derecha se muestra el análisis densitométrico del MCP-1 corregido por G3PDH.

2.5.- EXPRESION PROTEICA DE MCP-1 EN LAS LESIONES

La presencia de MCP-1 en la neointima y en la media, en las secciones que presentaban la máxima estenosis, se evaluó mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal anti-MCP-1 (Figura 41). Todos los animales del grupo sin tratamiento presentaban tinción para MCP-1 frente a 5 de 7 animales del grupo de Atv. El área de tinción se cuantificó automáticamente, como se describe en los métodos, y fue significativamente más bajo en el grupo de Atv que en el grupo sin tratamiento **en la neointima** ($3881 \pm 3898 \mu\text{m}^2$ vs $41657 \pm 43141 \mu\text{m}^2$; $p < 0.0002$) y **en la media** ($10027 \pm 341 \mu\text{m}^2$ vs $16584 \pm 5401 \mu\text{m}^2$, $p < 0.02$) (Figura 42). Los animales control no mostraron tinción.

La presencia de macrófagos en la neointima coincidió con la expresión de MCP-1. Sin embargo, como se aprecia en la Figura 41, el MCP-1 también parece estar presente en la capa media y en áreas de la neointima donde no hay macrófagos, sugiriendo que las células de músculo liso vascular podrían ser las responsables de su síntesis.

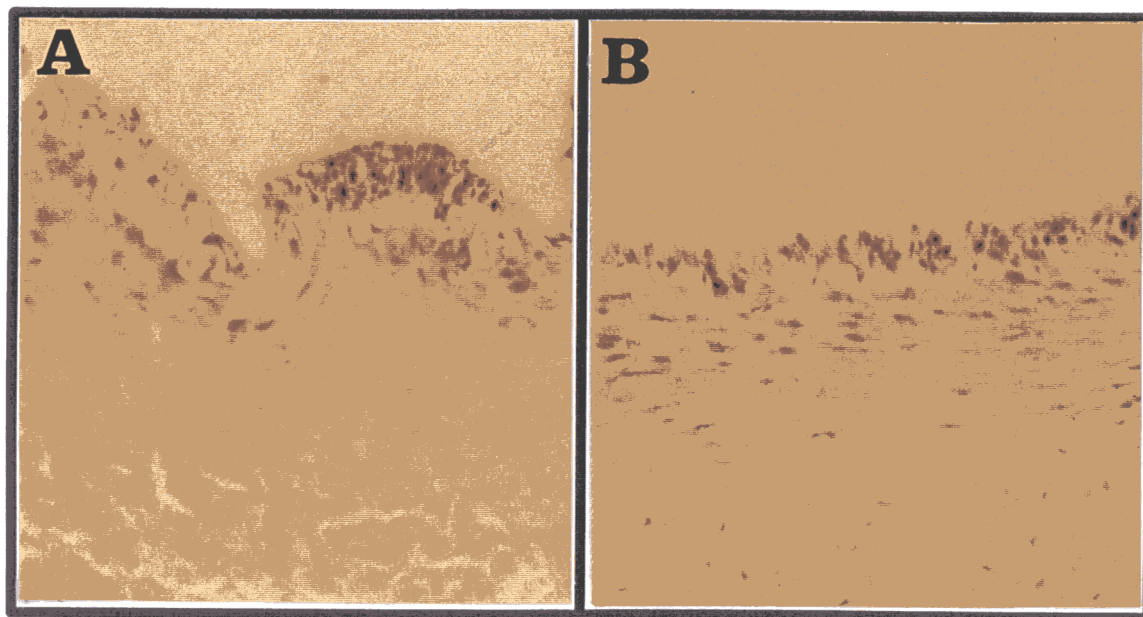


Figura 41. *Detección de MCP-1 por inmunohistoquímica en secciones arteriales.* Secciones de arteria femoral teñidas con el anticuerpo anti-MCP-1. Se muestra una sección representativa de cada grupo. (A) Grupo sin tratamiento. (B) Grupo tratado con atorvastatina. (Magnificación x400).

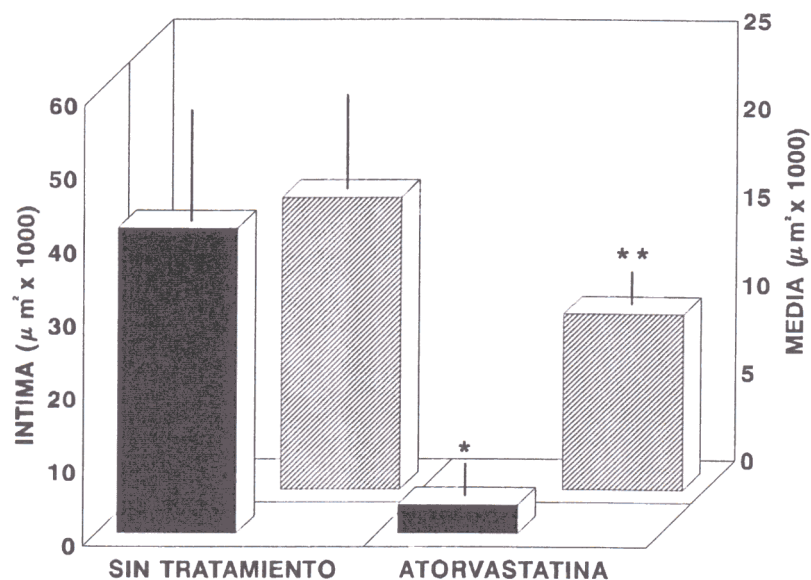


Figura 42. *Análisis morfológico de la presencia de MCP-1 en las arterias.* El área ocupado por MCP-1 se analizó automáticamente como se describe en “métodos”. Las barras en negro representan el área media teñida para MCP-1 en la neointima y las barras rayadas el área media para MCP-1 en la media. Los datos son la media de 7 conejos tratados y 9 sin tratar. * $p < 0.0002$ vs sin tratamiento y ** $p < 0.02$. Los datos representan la media \pm EEM.

2.6.- ACTIVACION NF- κ B EN LA FEMORAL LESIONADA, AORTA E HIGADO

Mediante la técnica del South-Western nos planteamos determinar *in situ* la presencia de NF- κ B activado en las lesiones. La cantidad de núcleos teñidos en el tejido se calculó según una valoración semicuantitativa comprendida entre 0 y 6 según la intensidad de la tinción que presentaba cada preparación. De esta forma, se encontró actividad NF- κ B en la neointima y en la media de 4 de 7 animales estudiados en el grupo que no recibió tratamiento (todos ellos ≥ 2), y en ninguno del grupo de animales sanos. Atv produjo una disminución del 60% y 65% de los valores medios de activación en la íntima y en la media respectivamente. En la Figura 43 se muestra un ejemplo de un animal sin tratamiento (A), tratado con Atv (B) y un animal sano (C). Cuando las preparaciones se incubaron con el oligonucleótido mutante para NF- κ B no se apreció tinción alguna, lo que demuestra la especificidad de la sonda empleada.

Puesto que NF- κ B puede estar presente tanto en macrófagos como en CML, nos propusimos estudiar, mediante la técnica de doble tinción, cuales de estas células eran responsables de la actividad encontrada en las lesiones. Como se puede ver en la Figura 44, la actividad NF- κ B se detectó en los animales no tratados en áreas teñidas para macrófagos y CML. Sin embargo, debido a que hay una mayor cantidad de CML es lógico pensar que una gran parte del NF- κ B activado en el vaso lesionado se deba a estas células.

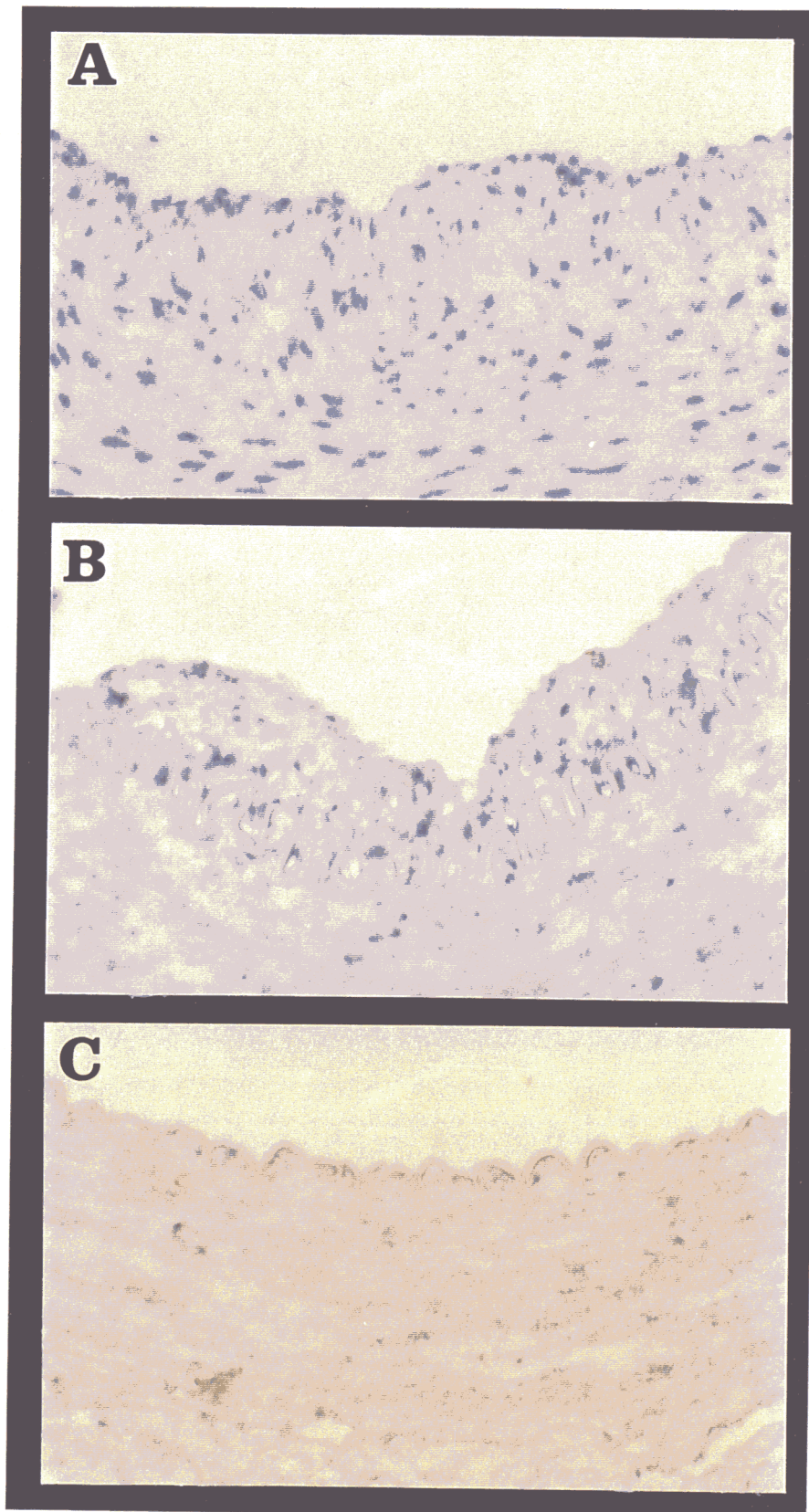


Figura 43. *Actividad NF- κ B en las lesiones.* Microfotografías de secciones representativas de arteria femoral donde se determinó la actividad NF- κ B mediante south-western en animales (A) Sin tratamiento, (B) tratados con Atv, y (C) sanos. Los núcleos teñidos aparecen con una coloración azul. (Magnificación x400).

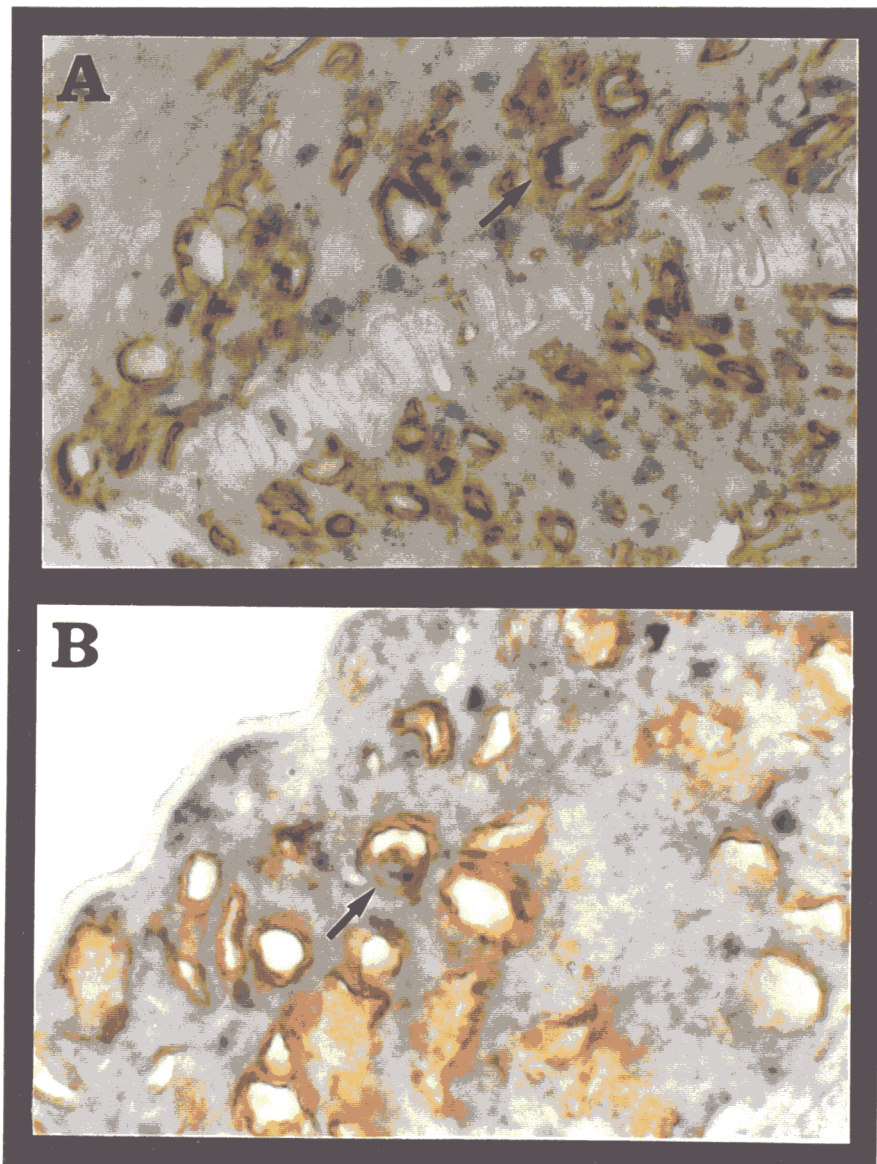


Figura 44. *Colocalización de NF- κ B activado en macrófagos y CML.* Detalle de la localización de la actividad NF- κ B, mediante doble tinción, con un anticuerpo anti-alfa actina (A) y para macrófago (B). (Magnificación x1000). Las flechas indican la presencia de un núcleo teñido para NF- κ B rodeado de un citoplasma teñido con los anticuerpos específicos para CML (A) y para macrófagos (B).

Puesto que se ha demostrado que una dieta aterogénica puede inducir la activación del NF- κ B en el hígado (Liào et al; 1993), nos planteamos estudiar mediante geles de retardo si la activación de este factor en hígado y aorta podía ser modulada por el tratamiento con Atv.

Extractos proteicos de los grupos tratados, sin tratar y sanos se mezclaron en sus distintos grupos utilizándose para los ensayos 10 μ g de proteína total de cada mezcla. Con respecto a los animales sanos, el NF- κ B se encontró activado en el hígado y en la aorta de los conejos sin tratamiento mientras que aquellos tratados con Atv presentaron una marcada reducción de la activación en ambos órganos (Figura 45). Los ensayos de competición se realizaron en presencia de los oligonucleótidos NF- κ B y AP-1 fríos, para establecer la especificidad de la reacción, que fue demostrada para el NF- κ B, mediante la disminución de las bandas de retardo, pero no para el AP-1 (Figura 45).

El AP-1 es un factor de transcripción implicado principalmente en la regulación de los genes de la matriz extracelular y metaloproteinasas y parece tener una importancia secundaria en el control de los genes implicados en la inflamación. Por este motivo nos propusimos determinar la activación de este factor en el hígado y en la aorta de los conejos. Como se muestra en la Figura 45, la actividad AP-1 se incrementó en la aorta e hígado de los conejos sin tratamiento pero no fue modificada por el tratamiento con Atv. Los experimentos de competición con AP-1 frío, pero no NF- κ B, hicieron desaparecer los complejos marcados.

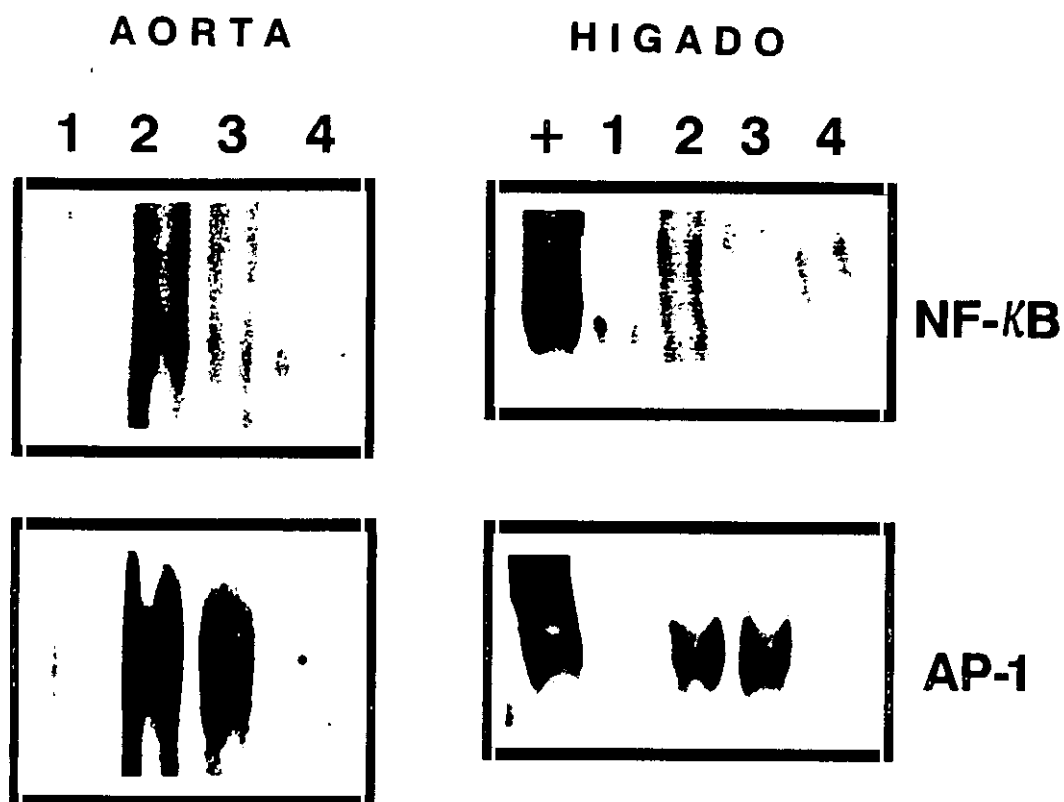


Figura 45. Actividad NF- κ B y AP-1 en la aorta e hígado de los conejos. La activación de NF- κ B (paneles superiores) y AP-1 (paneles inferiores) se determinó en la aorta (paneles izquierdos) e hígado (paneles derechos) de los conejos. Los extractos celulares se mezclaron y a continuación se procedió a la realización del experimento. (1) Conejos control, (2) conejos sin tratamiento, (3) conejos tratados con atorvastatina., (4) ensayos de competición con NF- κ B frío (panel superior) y AP-1 frío (panel inferior). + control positivo con extracto nuclear Hela.

PARTE II: ESTUDIOS *IN VITRO*

1.- EXPRESION DEL GEN MCP-1 EN MONOCITOS Y CML

Los macrófagos son inicialmente los responsables del incremento de MCP-1 en las arterias ateromatosas (Nelken et al., 1991), aunque las CML también pueden sintetizar esta quimioquina. Para mostrar el efecto de la Ang II y las LDL en la expresión del MCP-1, realizamos experimentos en cultivos de la línea monocítica U937 y en CML de rata.

Estudios preliminares llevados a cabo en nuestro laboratorio han demostrado que la máxima expresión de MCP-1 se observa al cabo de 6 horas, tanto en células monocíticas como vasculares (datos no mostrados). Por tanto, los experimentos se realizaron en células en estado de reposo preincubadas durante 24-48 horas en medio al 0.5% de STF y estimuladas con Ang II (10^{-9} mol/l) y con LDL (100 μ g/ml) durante 6 horas.

Expresión en células monocíticas:

La Ang II (10^{-9} mol/l) y la LDL nativa indujeron un incremento en la expresión del mRNA del MCP-1 de 3 y 2 veces respectivamente (Figura 46A y 46B). El TNF- α , empleado como control positivo, produjo un incremento en la expresión de 6 veces.

Para analizar si la movilización de NF- κ B podría estar implicada en la activación del MCP-1 inducida por la Ang II y LDL, preincubamos las células durante 1.5 horas con 200 μ mol/l de pirrolidín-ditiocarbamato (PDTC), una sustancia que inhibe la activación de NF- κ B en algunos tipos celulares (Schreck et al., 1992). En todos los experimentos, la expresión de MCP-1 fue completamente bloqueada por la preincubación con PDTC, sugiriendo que el incremento en la expresión del mRNA de MCP-1 por estos estímulos es mediado por la activación de NF- κ B.

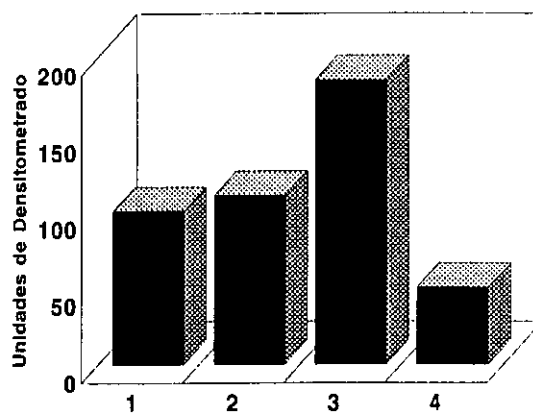
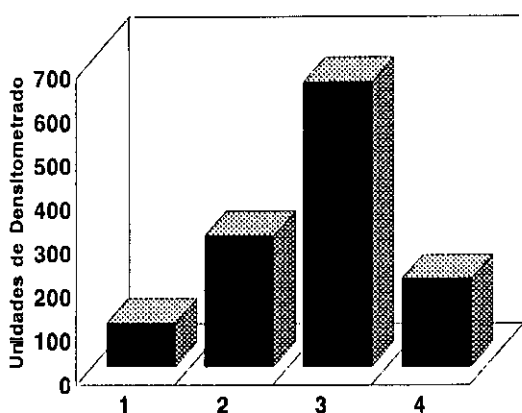
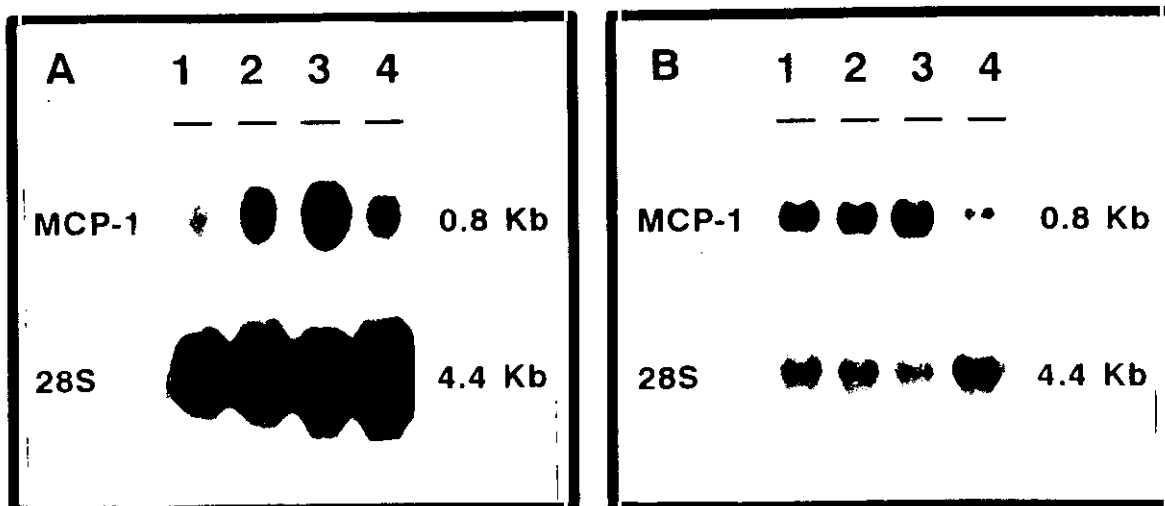


Figura 46. Expresión de MCP-1 en células monocíticas. Las células fueron deplecionadas y estimuladas durante 6 horas con los diferentes estímulos. Como control interno se empleó el RNA ribosomal 28S. **A.** (1) Basal. (2) Ang II (10^{-9} mol/l) (3) TNF- α 100U/ml. (4) Ang II (10^{-9} mol/l) preincubado durante 1.5 h. con 200 μ mol/l de PDTC. **B.** (1) Basal. (2) TNF- α 100U/ml. (3) LDL (100 μ g/ml). (4) LDL(100 μ g/ml) preincubado durante 1.5 h. con 200 μ mol/l de PDTC. En la parte inferior se muestran los análisis densitométricos expresados en unidades arbitrarias de densitometrado.- Los datos constituyen un experimento representativo de 2 realizados.

Células musculares lisas:

La incubación de las CML con Ang II (10^{-9} mol/l) y con LDL (100 μ g/ml) incrementó la expresión del gen de MCP-1 de 3.3 y 2 veces respectivamente. La preincubación de estas células con PDTC disminuyó, en ambos casos, dicha expresión (Figura 47).

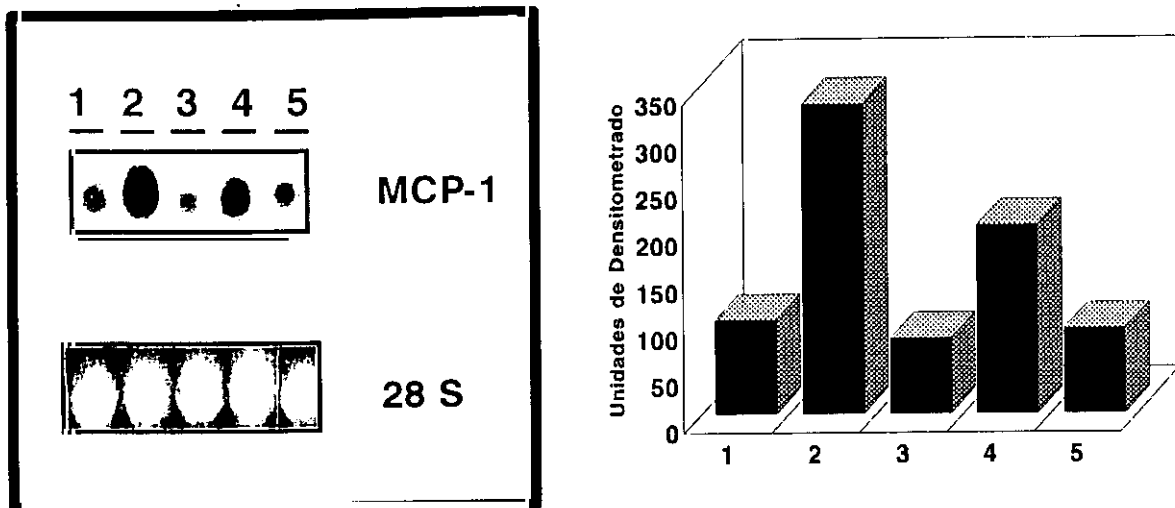


Figura 47. Expresión del MCP-1 en CML. En esta Figura se muestra un experimento representativo de dos realizados. (1) Basal. (2) Ang II (10^{-9} mol/l) (3) Ang II (10^{-9} mol/l) preincubado 1.5 h. con PDTC (200 μ mol/l) (4) LDL (100 μ g/ml) (5) LDL (100 μ g/ml) preincubado durante 1.5 h. con 200 μ mol/l de PDTC. Como control de carga se utilizó el RNA ribosomal 28S teñido con bromuro de etidio. En el margen derecho aparece el análisis densitométrico.

2.- ACTIVIDAD NF- κ B EN MONOCITOS Y CML ESTIMULADAS CON ANG II

Células monocíticas:

Las células U937 se incubaron con Ang II (10^{-7} , 10^{-9} y 10^{-10} mol/l) durante 30, 60 y 120 min. Para estimar la cantidad de NF- κ B activo, los extractos nucleares obtenidos se corrieron en geles de retardo. La inducción óptima se encontró tras 1 h. de estimulación, volviendo casi a los niveles basales a las 2 h. por lo que los experimentos se realizaron a 1 h. La especificidad de la reacción se estableció utilizando los controles descritos anteriormente.

La Ang II aumentó la actividad NF- κ B, siendo máxima a la dosis de 10^{-9} mol/l (3 veces sobre el basal). El LPS, un fuerte inductor de la activación de NF- κ B en macrófagos, se utilizó como control positivo (figura 48). La preincubación de estas células con PDTC anuló la activación de NF- κ B (no mostrado).

La preincubación de los extractos nucleares durante 1 h con 1μ g de anticuerpo anti-p50 o anti-p65 redujo la intensidad de las bandas mientras que el anticuerpo anti-p50 indujo la aparición de un complejo de superretardo (figura 48, línea 9).

Células musculares lisas:

También quisimos saber si la Ang II podía inducir la activación de NF- κ B en CML. Como se muestra en la figura 49, la Ang II aumentó la activación de NF- κ B en los mismos tiempos y dosis ensayados para las células monocíticas. Así, la dosis de 10^{-9} produjo un aumento de 7 veces respecto a los niveles basales. La activación de NF- κ B disminuyó cuando las células se preincubaron con 200μ mol/l de PDTC durante 1.5 h.

En los ensayos de superretardo, la preincubación de las células con el anticuerpo anti-p50 durante 1 h. disminuyó la intensidad de la banda principal, mientras que el anti-p65 casi la hizo desaparecer (figura 49).



Figura 48. Actividad NF- κ B en células monocíticas estimuladas con Ang II. Las células U937 se incubaron con los estímulos durante los periodos de tiempo indicados. En el panel de la izquierda se muestra un experimento representativo de 3 realizados y el análisis densitométrico aparece en el panel inferior. (1) Basal 30 min. (2) Ang II (10^{-9} mol/l) 30 min. (3) Basal 1h. (4) Ang II (10^{-7} mol/l) 1h. (5) Ang II (10^{-9} mol/l) 1h. (6) LPS ($1\mu\text{g/ml}$) 1h. Los extractos nucleares se incubaron con anticuerpos para las subunidades p50 y p65 de NF- κ B (panel derecho): (7) Basal (8) Ang II (10^{-9} mol/l) (9) Ang II (10^{-9} mol/l) con anti-p50 y (10) Ang II (10^{-9} mol/l) con anti-p65.

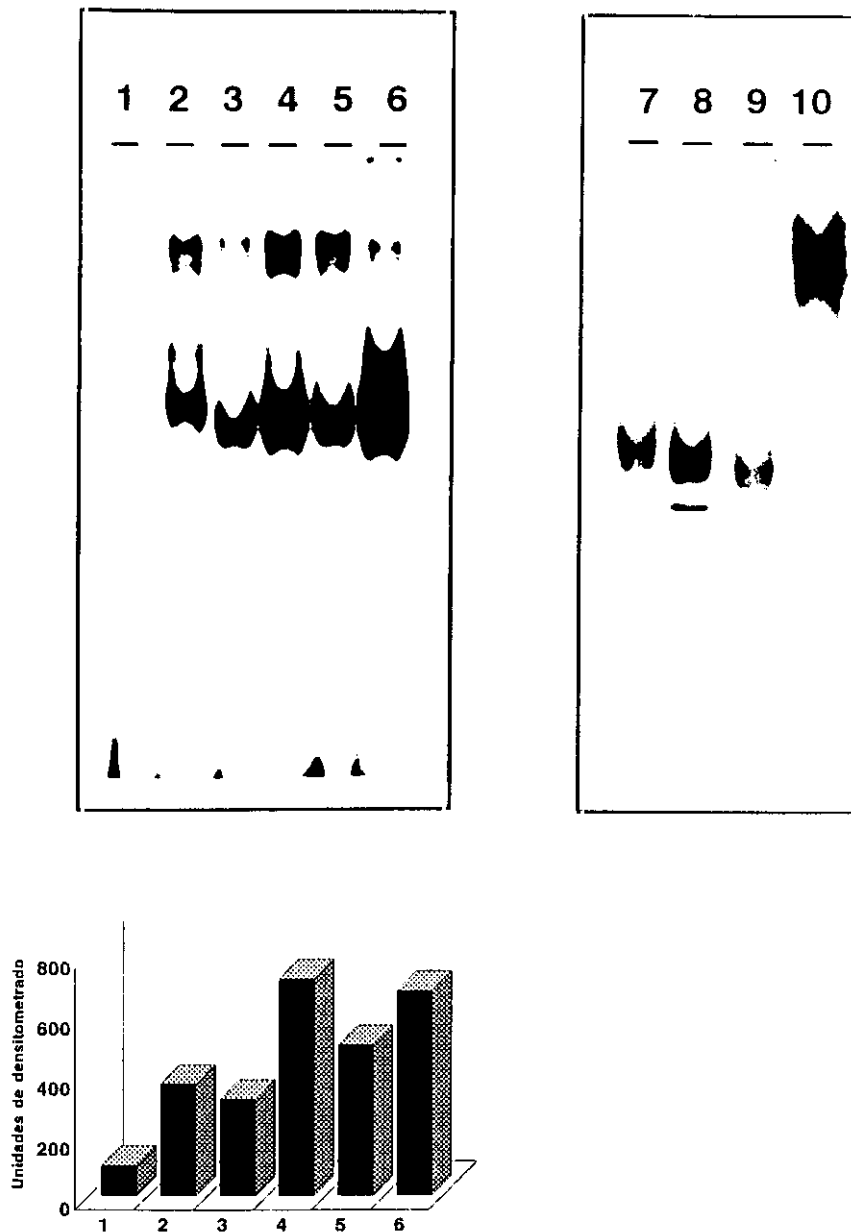


Figura 49. *Actividad NF- κ B en células musculares lisas estimuladas con Ang II.* Las CML se deplecionaron y luego se incubaron durante 1h. con los estímulos. Las preincubaciones con PDTTC se llevaron a cabo durante 1.5 h. a 200 μ mol/l de concentración. En el panel izquierdo se muestra un experimento representativo de 3 realizados y el análisis densitométrico aparece en la parte inferior. (1) Basal. (2) Ang II (10^{-7} mol/l) (3) Ang II (10^{-7} mol/l) + PDTTC (4) Ang II (10^{-9} mol/l) (5) Ang II (10^{-9} mol/l) + PDTTC (6) LPS (1 μ g/ml). En el panel derecho aparecen los extractos nucleares incubados con los anticuerpos para las subunidades de NF- κ B (p50 y p65). (7) Basal. (8) Ang II (10^{-9} mol/l) (9) Ang II (10^{-9} mol/l) con anticuerpo anti p50 y (10) Ang II (10^{-9} mol/l) con anti p65.

3.- ACTIVIDAD NF- κ B EN MONOCITOS Y CML ESTIMULADAS CON LDL

Células monocíticas:

Las células U937 se deplecionaron y se incubaron con LDL (100 μ g/ml) durante 1 y 2 h. Con el propósito de determinar la cantidad de NF- κ B activo se extrajeron los extractos nucleares y se corrieron en geles de retardo. Las LDL produjeron aumento de la activación de NF- κ B de 3 veces respecto a los niveles basales tras 1 h. de incubación (Figura 50A), volviendo casi a los niveles basales a las 2 h. La preincubación de las células con PDTC disminuyó la activación de NF- κ B (no mostrado).

Células musculares lisas:

En estas células también comprobamos la capacidad de las LDL para activar el NF- κ B durante 1 y 2 h, siendo la inducción óptima tras 1 h de incubación. Como se muestra en la Figura 50B, las LDL produjeron un incremento de la activación de 2.5 veces respecto a los niveles basales tras 1 h. de incubación (línea 2). Este incremento fué similar al observado al incubar las células con un fuerte inductor de NF- κ B como es el TNF- α (línea 3). La preincubación de las células con PDTC disminuyó la activación de NF- κ B (no mostrado).

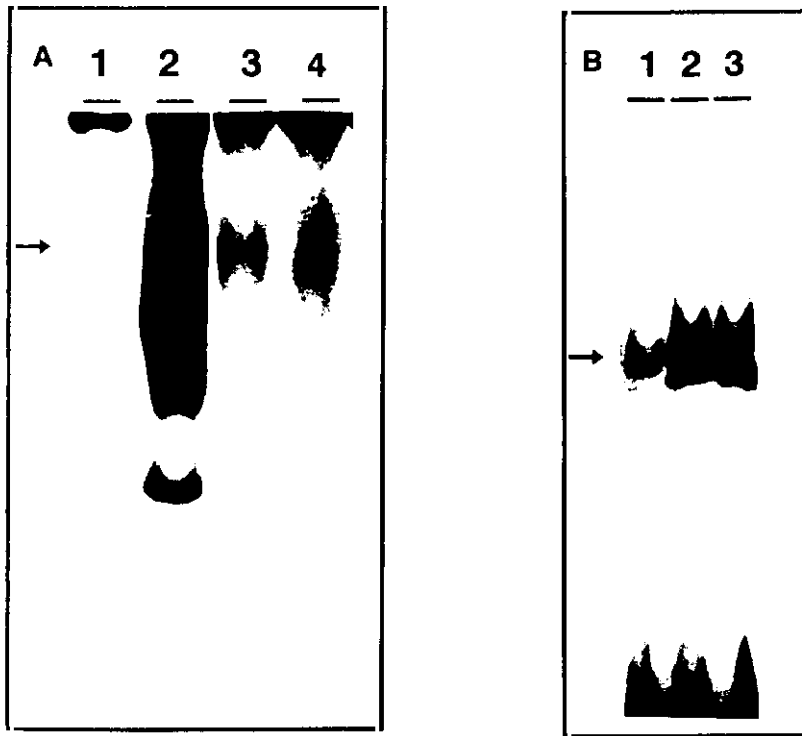


Figura 50. *Actividad NF-κB en U937 y CML estimuladas con LDL.* La actividad NF-κB se determinó en (A) células U937 y (B) CML. En ambos casos las células fueron deplecionadas y se incubaron con LDL (100 µg/ml). (A). (1) Basal 1 h. (2) LDL 1 h. (3) Basal 2 h. (4) LDL 2 h. (B). (1) Basal 1 h. (2) LDL 1h. (3) TNF-α. Las flechas indican la formación de los complejos.

V.- DISCUSSION

El proceso de aterogénesis se produce como consecuencia de las múltiples interacciones entre estímulos dañinos que actúan sobre el endotelio y las respuestas reparativas de la pared arterial. Esto conduce a una acumulación intraarterial de lípidos intra y extracelulares, macrófagos, células T, CML, proteoglicanos, colágeno y fibras necróticas. La existencia de una reacción inflamatoria es la clave en la aterogénesis y, más importante aún, en la rotura y trombosis de las placas ya formadas, que da lugar a los síndromes coronarios agudos. La presencia de células inflamatorias en la placa es favorecida por la liberación de factores quimiotácticos tales como LDLox y quimioquinas. Entre éstas destaca el MCP-1, que es expresado en respuesta a una gran variedad de estímulos tanto *in vitro*, a través de LDL, IL-1 β y TNF- α (Takahashi et al., 1995), como *in vivo* (Yu et al., 1992). La expresión de ésta y otras quimioquinas está controlada por un factor nuclear, el NF- κ B.

La participación de la activación del factor nuclear κ B en la patogénesis de la aterosclerosis es una idea atractiva y novedosa. En esta tesis hemos podido comprobar que la infiltración de macrófagos y la expresión de MCP-1 están aumentadas en las placas ateroscleróticas de manera paralela a la activación de NF- κ B.

Mediante el desarrollo de un modelo experimental de aterosclerosis acelerada hemos estudiado algunos de los mecanismos implicados en el desarrollo y rotura de la placa aterosclerótica. Los resultados obtenidos demuestran que:

- 1.- El sistema renina-angiotensina puede jugar un papel muy importante en la patogénesis de la aterosclerosis, al considerar que la Ang II puede ser responsable, al menos en parte, de la acumulación de macrófagos a nivel neointimal al promover la expresión de MCP-1, probablemente a través de la activación de NF- κ B.
- 2.- La administración de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, enzima clave en la ruta de síntesis del colesterol, reduce la severidad de las lesiones ateroscleróticas, así como la infiltración de macrófagos y la expresión de MCP-1 en la placa, probablemente a través de la inhibición de la activación de NF- κ B. La menor presencia de macrófagos, además de mediar en parte el efecto del enlentecimiento en la progresión de la lesión, podría explicar la acción estabilizadora observada a nivel clínico con estos fármacos.

1.- EFECTO DE LA INHIBICION DE LA ECA EN UN MODELO DE HIPERCOLESTEROLEMIA

1.1- ACTIVIDAD DE LA ECA Y FORMACION NEOINTIMAL

En vasos intactos, la actividad de la ECA es generada principalmente por las CE, mientras que durante el proceso aterosclerótico, las CML de la neointima llegan a ser las responsables del incremento observado en la actividad de la ECA (Rakugi et al., 1994). La Ang II formada en la vasculatura estimula el crecimiento de CML asociado con un incremento en la síntesis de DNA y la expresión de protooncogenes y citoquinas (Dzau, 1993). La infusión exógena de Ang II produce una hipertrofia vacular en vasos no dañados y potencia la formación neointimal en vasos dañados mediante balón (Daemen et al., 1991; Prescott et al., 1991). Todos estos hechos sugieren que la Ang II puede estar directamente implicada en el proceso aterosclerótico.

Muchos grupos han demostrado que los inhibidores de la ECA reducen la proliferación neointimal (Powell et al., 1989), la cual parece estar estrechamente relacionada con la actividad de la ECA tisular pero no con la sérica (Rakugi et al., 1994). Además, la hiperplasia neointimal, es prevenida por antagonistas del receptor tipo 1 de la Ang II (AT1) (Osterrieder et al., 1991). Estos efectos podrían estar relacionados con el aumento en quininas, producidos por los inhibidores de la ECA, lo que permitiría la generación de NO y prostaciclina que inducirían un efecto antineointimal (Linz et al., 1995).

En nuestro modelo, el quinapril administrado desde 2 días antes hasta 7 y 28 días después del daño endotelial a una dosis de 1 mg/Kg/día produjo una inhibición de la actividad de la ECA sérica (día 0) entorno a un 70%. Por el contrario la actividad tisular, en el momento de producirse el daño, no mostró cambios significativos respecto al grupo sin tratamiento. Sin embargo, dicha actividad fue inhibida en un 40 % y 50% tras 7 y 28 días de tratamiento. Por otro lado, no hubo cambios significativos en la reducción de la formación neointimal, tanto a los 7 como a los 28 días, aunque sí se aprecia una cierta tendencia hacia la normalización en aquellos animales tratados con quinapril.

Estos resultados son comparables a los observados por Rakugi y cols., en la neointima vascular tras el daño endotelial mediante balón (Rakugi et al., 1994), quienes también describen una disociación entre la actividad tisular y circulante. Este grupo además muestra una correlación entre el tamaño neointimal y la actividad de ECA tisular, demostrando que sólo a altas dosis de quinapril se alcanza una disminución significativa del tamaño neointimal, debido probablemente a la relativa dificultad de inhibir la actividad de la ECA tisular.

1.2.- LA ANG II PARTICIPA EN EL RECLUTAMIENTO DE MACROFAGOS HACIA LA NEOINTIMA

Según los resultados obtenidos en esta tesis, la Ang II potencia la generación de MCP-1 tanto en células mononucleares como en CML y podría además participar en el reclutamiento de monocitos hacia la lesión aterosclerótica. El MCP-1 es una quimioquina cuya presencia ha sido demostrada en lesiones ateroscleróticas humanas, fundamentalmente en las áreas infiltradas por macrófagos (Nelken et al., 1991) y más frecuentemente en las placas responsables de síndromes coronarios agudos (Weber et al., 1995).

La actividad quimiotáctica de la Ang II y sus productos de degradación sobre las células mononucleares está bien establecida (Goetzl et al., 1980). La Ang II puede inducir la generación en las CE de factores quimiotácticos para neutrófilos (Farber et al., 1990).

Los datos aquí presentados demuestran que la administración de quinapril, un inhibidor de la ECA (iECA) de alta fijación tisular, a animales con daño endotelial y dieta aterogénica disminuye la expresión de MCP-1 y el número de macrófagos que invaden la neointima y la media. Este efecto podría ser debido a la reducción de la Ang II inducida por el quinapril. Esto se apoya en los estudios *in vitro* donde la Ang II directamente aumenta la expresión génica de MCP-1.

Sin embargo, los iECAs también pueden inhibir la degradación de bradiquininas (Hornig et al., 1997) y modificar la generación de NO al disminuir la acumulación de Ang I y su metabolito angiotensina-(1-7) que parece tener propiedades antiproliferativas (Freeman et al., 1996).

En células endoteliales, una disminución en la producción basal de NO puede inducir un incremento de la producción de MCP-1 y de la actividad NF- κ B (Zeiber et al., 1995). La Ang II puede inhibir la expresión de la NO sintasa inducible estimulada por citoquinas (Nakayama et al., 1994). En una situación de daño vascular con niveles incrementados de citoquinas, el bloqueo de la generación de Ang II podría contribuir a la eliminación de su efecto negativo sobre la producción de NO. Esta podría ser otra vía por la que estos fármacos podrían tener un efecto beneficioso en la reducción de la acumulación de células mononucleares.

1.3.- LA ANG II PROMUEVE LA EXPRESION DEL mRNA DEL MCP-1 VIA ACTIVACION DE NF- κ B EN CULTIVOS DE MONOCITOS Y CELULAS MUSCULARES LISAS

Nuestros resultados demuestran que el incremento de la expresión de MCP-1 inducido por la Ang II es mediado por la activación de NF- κ B. El mecanismo por el cual la Ang II promueve la activación de NF- κ B no está completamente dilucidado. Aunque la vía de activación de este factor nuclear es multifactorial, parece estar implicada una proteína-quinasa serina-treonina (Suzuki et al., 1994). En diferentes células tales como CML, la Ang II incrementa la fosforilación de tirosinas de las proteínas y activa algunas proteína-quinazas, incluyendo la C (Ullian et al., 1990). Sin embargo, no hay evidencias directas que muestren que esta quinasa juegue algún papel en la movilización de NF- κ B. La Ang II también fosforila a los factores de transcripción pertenecientes a la familia STAT a través de la activación del receptor AT1 (Marrero et al., 1995). La proteína Stat3, perteneciente a esta familia, es activada por la tirosina quinasa del oncogen Src (Yu et al., 1995), el cual está activado en CML después de haber sido estimuladas con Ang II (Ishida et al., 1995).

Algunos datos indican que los intermediarios de reactivos de oxígeno, en concreto el H₂O₂, sirven como mensajeros en la vía de activación de NF- κ B (Schreck et al., 1992). De hecho, antioxidantes como el PDTC disminuyen la activación de NF- κ B y la expresión génica de MCP-1 y otros genes inflamatorios (Collins et al., 1993).

Investigaciones recientes han mostrado que los intermediarios de reactivos de oxígeno también parecen estar implicados en las señales de transducción intracelular de la Ang II (Puri et al., 1995). Nuestros datos muestran que la inhibición de los efectos de la Ang II por medio del PDTC están en consonancia con este mecanismo.

1.4.- LA INHIBICION DE LA ECA DISMINUYE LA ACTIVACION NF- κ B EN VASOS DAÑADOS

Aunque estudios previos han mostrado que en hámsters hiperlipidémicos el inhibidor de la ECA captopril inhibe la acumulación de macrófagos independientemente de la presión sanguínea y de los lípidos plasmáticos, no se ha propuesto ninguna posible explicación (Kowala et al., 1994). En este trabajo, hemos demostrado por primera vez que la disminución de monocitos en la neointima de conejos hiperlipidémicos tratados con quinapril está claramente asociada a la reducción tanto en la activación de NF- κ B como en la expresión del mRNA y la proteína de MCP-1 en la pared arterial (Hernández-Presa et al., 1997).

También hemos demostrado por primera vez la presencia de NF- κ B activado en las arterias femorales de los conejos mediante una nueva técnica de localización *in situ*. El NF- κ B activado se encontró tanto a nivel de neointima como de capa media, apareciendo mucho más incrementado en las femorales de los animales sin tratamiento. Estos resultados están en consonancia con los estudios llevados a cabo por el grupo de Brand, donde se demuestra la presencia de NF- κ B activado en lesiones ateroscleróticas humanas mediante técnicas inmunohistoquímicas (Brand et al., 1996). En estas lesiones la actividad NF- κ B fue identificada en CML, macrófagos y CE. En nuestro modelo identificamos actividad NF- κ B en macrófagos y CML.

Estos resultados están de acuerdo con la idea de que la activación de NF- κ B y la subsiguiente expresión de genes inflamatorios conducen a los eventos que van a dar lugar al desarrollo de la lesión aterosclerótica. La actividad de NF- κ B puede ser inducida por una amplia variedad de tipos celulares en respuesta al tratamiento con estímulos como IL-1,

TNF- α , stress oxidativo, y LDLox (Grimm et al., 1993). En esta tesis, también hemos demostrado que la Ang II es otro factor que podría ser añadido a esta lista. Cabe destacar que la actividad NF- κ B constitutiva es esencial para la proliferación de cultivos de CML bovinas (Bellas et al., 1995).

Estudios recientes han demostrado que la inestabilidad de la placa aterosclerótica está íntimamente relacionada con su contenido de macrófagos (Moreno et al., 1994). Uno podría especular que durante la aterosclerosis temprana en conejos, la disminución de la producción de MCP-1 y el contenido de macrófagos a nivel neointimal inducido por el quinapril podría favorecer la estabilización de la lesión. En este sentido, algunos estudios realizados en pacientes a los que se les ha suministrado inhibidores de la ECA han mostrado una disminución del riesgo de eventos isquémicos agudos (Yusuf et al., 1992).

1.5.- LA DIETA ATEROGENICA POTENCIA LA ACTIVACION DE NF- κ B EN LAS AORTAS NO DAÑADAS

Una de las respuestas a la dieta hipercolesterolémica es la expresión de MCP-1 por CML (Yu et al., 1992). En conejos sometidos a una dieta rica en colesterol, durante los primeros 10-12 días el endotelio no dañado parece estar morfológicamente intacto, sin que haya adherencia de plaquetas (Simionescu et al., 1986).

La hiperlipidemia es uno de los factores de riesgo más importantes para las enfermedades cardiovasculares, tanto es así que recientemente se ha demostrado, en un modelo de conejos con dieta rica en colesterol (Mitani et al., 1996), que la hiperlipidemia incrementa la actividad de la ECA en vasos sanguíneos existiendo una estrecha relación entre la actividad de la ECA tisular y la formación de la placa.

Además la estimulación de CML con LDL *in vitro* incrementa la estabilidad del receptor AT1 (Nichenig et al., 1997). Este hecho es muy interesante ya que podría estar relacionado con la asociación entre niveles elevados de LDL e hipertensión arterial (Kannel et al., 1995; Flesch et al., 1994).

Por otra parte, Liao y colaboradores han mostrado que existe una fuerte correlación entre la susceptibilidad de formación de la estría grasa aórtica y la activación de NF- κ B (Liao et al., 1994). Estos hechos se han confirmado en estudios realizados sobre conejos hipercolesterolémicos donde la administración de antioxidantes como el PDTC redujo la formación de la lesión neointimal (Kurz et al., 1995).

En este sentido, nuestros resultados muestran que la LDL induce expresión de MCP-1 a través de la activación de NF- κ B en células mononucleares y en CML. Además, el análisis de las aortas no dañadas, mediante ensayos de retardo, mostró una fuerte activación de NF- κ B debida únicamente a la dieta hipercolesterolémica, a los 7 y a los 28 días. El tratamiento con quinapril redujo dicha actividad en ambos casos. Mediante ensayos de superretardo se demuestra que el NF- κ B está formado por las subunidades p⁵⁰ y p⁶⁵. Esta disminución de la actividad NF- κ B en las aortas de los animales tratados con quinapril podría ser explicada por la reducción de la Ang II, generada como consecuencia de la hiperlipidemia.

1.6.- EFECTO DEL QUINAPRIL SOBRE LA EXPRESION DE IL-8

La interleuquina-8 (IL-8) es un péptido quimiotáctico perteneciente, junto con el MCP-1, a la familia de las quimioquinas. Hasta hace poco no se había dado una especial atención a este péptido en la aterosclerosis, probablemente debido a que inicialmente fue identificado como un potente factor quimiotáctico de neutrófilos, un tipo celular no muy frecuente en las lesiones ateroscleróticas humanas.

Sin embargo, estudios recientes han mostrado que esta quimioquina es inducida y producida por macrófagos espumosos en las placas de ateroma (Wang et al., 1996), y que está implicada en muchos procesos biológicos relacionados con la aterogénesis. Así, es un potente factor quimiotáctico y/o mitogénico de linfocitos T (Larsen et al., 1989), de CML (Yue et al., 1994) y de CE (Szekanecz et al., 1994), pudiendo de este modo participar en el engrosamiento intimal.

Todo esto sugiere que IL-8 podría estar implicada en la migración y proliferación de CML contribuyendo, por un lado, a la formación de la placa aterosclerótica y, por otro, a su desestabilización y rotura a través de sus propiedades angiogénicas (Szekanecz et al., 1994).

La activación de NF- κ B parece ser indispensable para la transcripción génica de IL-8, aunque dependiendo del tipo celular, NF-IL6 y AP-1 parecen ser también requeridos (Mukaida et al., 1994; Muñoz et al., 1996). En este sentido, tras los resultados obtenidos sobre las CML donde la Ang II indujo activación NF- κ B, estudiamos si la inhibición de la generación de Ang II debido al tratamiento con quinapril podría dar lugar a la normalización de la expresión de IL-8 en las arterias femorales dañadas.

Nuestros resultados han mostrado que la inducción de daño endotelial en la arteria femoral de los conejos produjo un aumento en la expresión de IL-8 tanto en el modelo de 7 como en el de 28 días. El tratamiento con quinapril redujo de forma significativa la expresión génica y proteica en ambos modelos.

Una hipótesis interesante, que explicaría estos hechos, es que el descenso de IL-8 podría estar relacionado con el incremento en la generación de NO como consecuencia de la inhibición de la ECA, ya que se ha demostrado que el NO regula la expresión de IL-8 por el bloqueo de la activación de NF- κ B (Andrew et al., 1995; De-Caterina et al., 1995).

1.7.- EXPRESION DE IL-1 β Y TNF- α

IL-1 β y TNF- α son citoquinas proinflamatorias que juegan un importante papel en el desarrollo de la lesión aterosclerótica. Ambas citoquinas junto con el TGF- β inhiben la proliferación endotelial e inducen la expresión de genes de forma indirecta, como el PDGF, al actuar sobre macrófagos, CML y CE (Ross et al., 1996). También pueden regular la producción de MCP-1 (Libby et al., 1995) y de moléculas de adhesión (Braun et al., 1995) contribuyendo de esta forma a la migración y adhesión de monocitos.

En nuestro modelo experimental (7 y 28 días) ambas citoquinas se encontraban aumentadas en los animales con aterosclerosis no tratada. La administración de quinapril, tan solo produjo un ligero descenso en su expresión, que fue algo más acusado a los 7 días.

Los datos aquí presentados sugieren, por tanto, que el sistema renina-angiotensina, al menos en las condiciones de nuestro estudio, no es clave en su regulación.

1.8.- REGULACION DEL PDGF-B Y COLAGENO I POR QUINAPRIL

1.8.1.- Efecto sobre la expresión de PDGF-B

Uno de los principales factores de crecimiento implicados en el proceso aterogénico es el PDGF, que puede aparecer como dos productos génicos distintos según sus cadenas proteicas, PDGF-A y PDGF-B (Raines et al., 1990). En esta tesis nos hemos centrado en el estudio del PDGF-B que es un importante factor mitogénico y quimiotáctico de CML, implicado en la migración de éstas hacia la íntima (Uchida et al., 1996) promoviendo así el desarrollo de la lesión aterosclerótica. Recientemente se ha demostrado que el PDGF-B puede inducir la activación de NF- κ B en CML de rata, pudiendo estar implicada esta activación en la proliferación de dichas células (Obata et al., 1996).

El PDGF-B también es considerado un potente factor quimiotáctico de monocitos, sobre los que induce la expresión del factor tisular, principal iniciador de la cascada de coagulación (Emofsson et al., 1996).

Uchida y colaboradores, han demostrado que la expresión del PDGF-B se encuentra incrementada en arterias femorales de conejo dañadas mediante balón (Uchida et al., 1996), alcanzando la máxima expresión al cabo de 7 días y manteniéndose hasta 21 días. Acorde a estos resultados, nos planteamos analizar la expresión del mRNA del PDGF-B, mediante hibridación *in situ*, al cabo de 28 días de haberse producido el daño endotelial. La expresión génica de PDGF-B incrementó tanto a nivel neointimal como de capa media respecto a los animales control. Sin embargo, el tratamiento con quinapril al cabo de 28 días indujo un fuerte descenso de dicha expresión. Estos resultados, junto con el hecho de que el PDGF-B sea un factor quimiotáctico de monocitos y pueda inducir la proliferación de las CML vía

NF- κ B, sugerirían el posible efecto beneficioso que pueden tener los inhibidores de la ECA sobre la progresión y estabilidad de la lesión.

1.8.2.- Efecto sobre la expresión de colágeno I

El colágeno constituye la principal proteína de la matriz extracelular de la placa, representando el colágeno tipo I junto con el III el 60% de proteína total presente (Barnes, 1985) y al menos el 90% del colágeno total (Mecham et al., 1987). El colágeno I se encuentra concretamente en la íntima de las placas fibrosas (Rekhter et al., 1993).

En las placas ateromatosas, la expresión génica del colágeno I es focal y aparece principalmente en la cápsula fibrosa, proporcionando rigidez y estabilidad (Davies, 1996). La reducción de la síntesis de colágeno I, posiblemente por muerte apoptótica de CML (Geng YJ et al., 1995; Björkerud et al., 1996), junto con la presencia de macrófagos que liberan metaloproteinasas, que degradan el colágeno que forma la cápsula, conduce al debilitamiento de ésta, haciéndola más propensa a la rotura (Nikkari et al., 1996).

En nuestro modelo experimental, al cabo de 7 y 28 días de haberse producido el daño endotelial, los animales no tratados mostraron un aumento de la expresión del mRNA y de su proteína apareciendo a nivel de neointima y de la capa media. El tratamiento con quinapril no modificó este aumento.

El hecho de que el quinapril reduzca la expresión de quimioquinas (MCP-1 e IL-8) y el infiltrado de macrófagos sin afectar la expresión de colágeno I, concuerda con la hipótesis de que los iECAs podrían estabilizar las placas ateroscleróticas.

2.- EFECTO DE LA INHIBICION DE LA HMG-CoA REDUCTASA EN UN MODELO DE HIPERLIPIDEMIA MIXTA

2.1.- LA INHIBICION DE LA HMG-COA REDUCTASA DISMINUYE LA FORMACION NEOINTIMAL

Los fármacos hipolipemiantes reducen la incidencia de eventos isquémicos (Brown et al., 1996), en particular, los inhibidores del enzima HMG-CoA reductasa disminuyen la mortalidad total y cardiovascular, tanto en prevención secundaria (The 4S investigators, 1994) como en primaria (Shepherd et al., 1995). Estos efectos no son explicables por la escasa reducción en la progresión de las lesiones ateroscleróticas que consiguen (Brown et al., 1996) y se han atribuido a una posible acción estabilizadora de la placa.

El tratamiento hipolipemiante intensivo depleciona estas placas de ésteres de colesterol, reduciendo su tamaño y ofreciendo una imagen de ligera regresión angiográfica en un 10%-20%. En este sentido, el tratamiento con atorvastatina, un nuevo inhibidor de la HMG-CoA reductasa, indujo una reducción significativa del tamaño de la lesión en un modelo de hiperlipidemia mixta en conejos.

Sin embargo, las estatinas consiguen una reducción de la incidencia de trombosis de placa mucho mayor (unas 10 veces) (Brown et al., 1990), que no puede explicarse por las modestas regresiones observadas. La disminución del número de macrófagos, inducida por el tratamiento en nuestro modelo, podría aportar una explicación alternativa a los efectos beneficiosos encontrados en los ensayos clínicos.

2.2.- LA INHIBICION DE LA HMG-COA REDUCTASA: ¿VENTAJAS MAS ALLA DE LA REDUCCION DEL COLESTEROL?. EL PAPEL DE LOS ISOPRENOIDES

Aunque los resultados beneficiosos de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa pueden ser explicados a través de su acción hipolipemiente, ciertos datos sugieren que además podrían tener un efecto directo sobre la pared arterial. De hecho, los inhibidores de la HMG-CoA reductasa o estatinas, han sido beneficiosos en una variedad de modelos de daño vascular o renal en la ausencia de efectos significativos sobre el colesterol sérico (Bandoh et al., 1996; Guijarro et al., 1996).

Recientemente, se ha mostrado que la inhibición de la HMG-CoA reductasa mediante pravastatina esta asociada con una reducción en episodios de rechazo agudo cardiaco o renal en receptores transplantados (Katznelson et al., 1995; Kobashigawa et al., 1995).

Las estatinas ejercen su acción directa en un paso temprano en la ruta de biosíntesis del colesterol: la conversión del 3-hidroxi-3-metil-glutaril coenzima A en ácido mevalónico (Goldstein et al., 1990). El metabolismo del mevalonato produce una serie de intermediarios isoprenoides, incluyendo el farnesil, el geranilgeranil, y el dolicol. Los isoprenoides son necesarios para la proliferación celular y otras funciones celulares importantes. La potencia del efecto de las estatinas a nivel de la pared vascular dependería de su afinidad por el enzima y de su capacidad para penetrar en las células de la pared vascular (Bocan et al., 1992), siendo mayor en las más lipofílicas (Bocan et al., 1992; Sliskovic et al., 1992).

Estos hechos inducen a pensar que la reducción de isoprenoides podría explicar algunos de los efectos beneficiosos de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa, como la inhibición de la proliferación de las CML (Massy et al., 1996). Esta hipótesis está de acuerdo con el trabajo de Soma y colaboradores (Soma et al., 1993) quienes muestran que lovastatina puede reducir la formación neointimal en un 33% en un modelo de conejos normocolesterolémicos. Por otro lado, estudios previos han demostrado la mayor eficacia de atorvastatina en reducir el tamaño de las lesiones ateromatosas frente a otras estatinas menos lipofílicas, a pesar de conseguir similares reducciones de colesterol plasmático (Bocan et al., 1994).

2.3.- LA INHIBICION DE LA HMG-COA REDUCTASA ANULA LA INFILTRACION DE MACROFAGOS EN LA LESION Y REDUCE LA EXPRESION DE MCP-1

La mayoría de las trombosis de las lesiones ateroscleróticas van precedidas de una fisura en las mismas que pone en contacto su núcleo lipídico con la sangre (Fuster et al., 1992; Fernández-Ortiz et al., 1994). En general, suelen ser placas que ocasionan sólo estenosis leves o moderadas pero con un alto contenido lipídico. En su rotura juega un papel importante la reacción inflamatoria y se ha demostrado la presencia de macrófagos en la proximidad de las zonas fisuradas en placas complicadas procedentes de pacientes con síndromes coronarios agudos (van der Wal et al., 1994; Moreno et al., 1994). Estas células son capaces de liberar enzimas proteolíticas que degradan la cápsula de la lesión aterosclerótica, debilitándola y facilitando su rotura (Henney et al., 1991; Galis et al., 1994).

La presencia de macrófagos en la lesión es favorecida por factores quimiotácticos tales como LDLox y MCP-1. En este sentido, atorvastatina no sólo reduce la generación de LDLox sino también la síntesis de MCP-1. Nuestros resultados muestran que el tratamiento con atorvastatina reduce el MCP-1 y elimina la infiltración de macrófagos en la lesión aterosclerótica y esto podría ayudar a explicar el efecto estabilizador de las estatinas. Hay que destacar que el tratamiento con atorvastatina no comenzó al inicio del experimento sino tras 4 semanas de dieta hiperlipémica, intentando imitar así las condiciones de la aterosclerosis humana, donde las estatinas se utilizan, en la mayoría de los casos, una vez que la aterogénesis ha comenzado.

Sin embargo, pese a la ausencia de macrófagos en las lesiones de los conejos tratados con atorvastatina, la expresión de MCP-1 no fue completamente anulada, lo que sugiere que el fármaco podría modular mecanismos adicionales implicados en la infiltración a nivel neointimal, tales como la expresión de moléculas de adhesión y otras quimioquinas. En este sentido, se ha visto que la hipercolesterolemia puede inducir la expresión de moléculas de adhesión vascular (Li et al., 1993).

El mecanismo de reducción en la expresión de MCP-1 a nivel vascular no puede ser dilucidado con los datos presentados en esta tesis, ya que no podemos excluir la posibilidad de que atorvastatina también tenga un efecto directo sobre las lesiones ateroscleróticas. En

este sentido, estudios *in vitro* realizados por nuestro grupo indican que la inducción de MCP-1 en las CML y monocitos por factores que están sobreexpresados en la lesión vascular (Ang II, IL-1 y TNF- α), puede ser reducida mediante el pretratamiento de las células con atorvastatina (Ortego et al., enviado), excluyendo así la posibilidad de acciones mediadas por la reducción del colesterol sérico.

También se demuestra en este trabajo que la Ang II, IL-1 y TNF- α inducen la activación de NF- κ B en CML y que el bloqueo de esta activación inhibe la expresión de MCP-1. Puesto que atorvastatina modula el NF- κ B inducido por estos factores, posiblemente inhibe la expresión de MCP-1 a través de este mecanismo. Estos resultados sugieren que parte de los efectos encontrados *in vivo* por el tratamiento con atorvastatina podrían ser debidos a un efecto directo del fármaco sobre las placas ateroscleróticas.

Esta hipótesis, esquematizada en la figura 51, explicaría los mecanismos celulares por los que el tratamiento con una estatina, en este caso atorvastatina, induce una reducción del número de macrófagos presentes en la placa de ateroma.

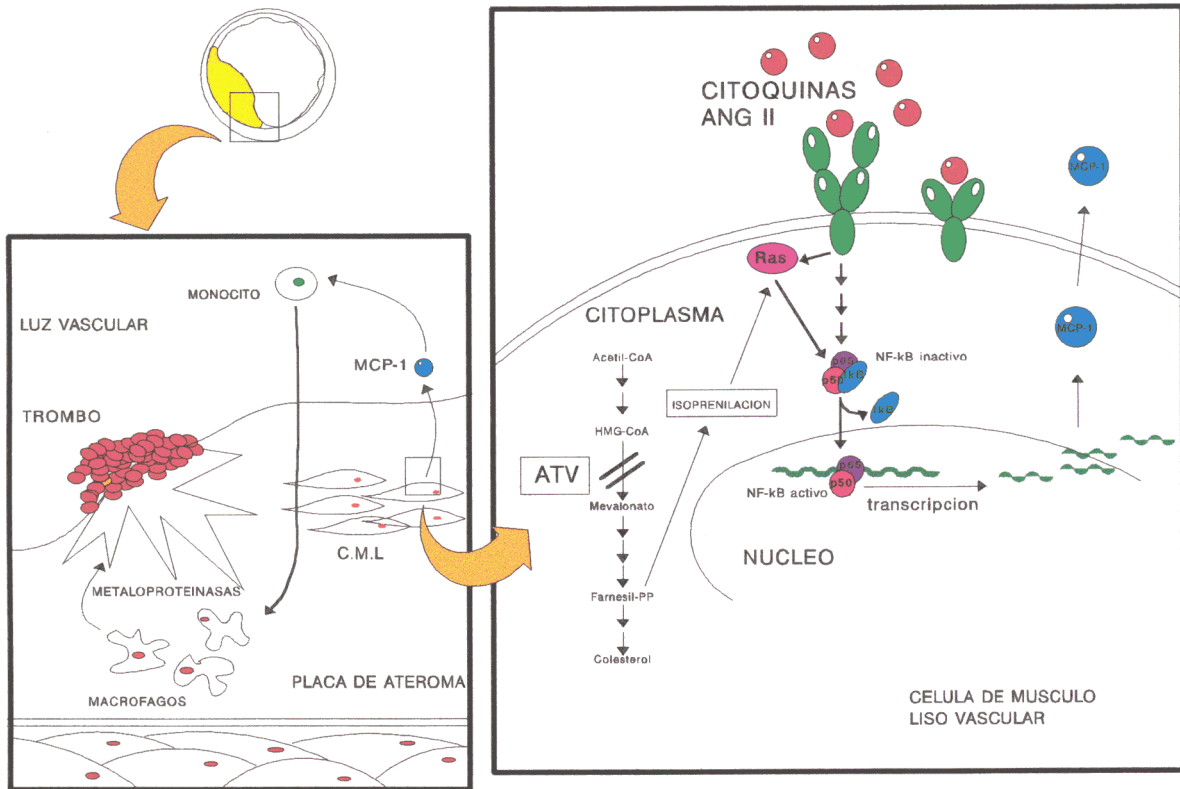


Figura 51. Esquema hipotético de los mecanismos por los que atorvastatina podría reducir el infiltrado de monocitos. En la figura de la izquierda se esquematiza el proceso que conduciría a un aumento del infiltrado de monocitos. En la placa de ateroma silente existe proliferación de CML procedentes de la capa media las cuales generarían MCP-1, atrayendo de este modo a los monocitos circulantes. Una vez que éstos entran en el espacio subintimal, se transforman en macrófagos que liberan metaloproteinasas debilitando la cápsula de la placa, produciendo su rotura y la subsiguiente formación de un trombo. En la figura de la derecha se muestra un detalle de una CML que al ser estimulada por factores que se encuentran en la lesión como citoquinas y Ang II provocarían la activación de proteínas Ras y de NF- κ B que se traslocaría al núcleo potenciando la transcripción del gen de MCP-1. La hipotética acción directa de atorvastatina sobre las CML se produciría al inhibir la HMG-CoA reductasa, reduciendo así la formación de isoprenoides que activarían la cascada de proteínas Ras implicadas en la activación de NF- κ B. La disminución de MCP-1 conduciría por tanto a una reducción del infiltrado de monocitos.

2.4.- ATORVASTATINA REDUCE LA ACTIVACION NF- κ B EN AORTA, HIGADO Y ARTERIA FEMORAL

Ya que el incremento de lípidos plasmáticos puede inducir la expresión de MCP-1 a través de la activación de NF- κ B (Liao et al., 1994), la disminución de los lípidos plasmáticos producida por el tratamiento con atorvastatina podría también favorecer la reducción de la activación de NF- κ B y la expresión de MCP-1.

Los resultados presentados, que muestran una disminución de la actividad NF- κ B en aorta e hígado de conejos con hiperlipidemia y tratados con atorvastatina podrían reforzar esta hipótesis ya que estos tejidos solo estuvieron expuestos al aumento de lípidos sin existir daño local. Este efecto parece específico sobre el NF- κ B, ya que la activación de AP-1, otro factor de transcripción comúnmente incrementado durante la inflamación y también relacionado al daño vascular (Miano et al., 1993), no se vió modificada por el tratamiento.

Además de la reducción importante de la LDL plasmática, atorvastatina también produjo una disminución significativa del nivel de triglicéridos. Estudios recientes han mostrado una correlación de niveles elevados en plasma con un mayor riesgo de trombosis, atribuido al incremento del complejo del factor VII por lipoproteínas ricas en triglicéridos (Gotto et al., 1995).

Por otro lado, en las arterias femorales dañadas analizamos la presencia de NF- κ B activado mediante su localización *in situ*. Los animales sin tratamiento presentaron un mayor incremento de NF- κ B activado que aquellos tratados con atorvastatina, localizándose dicha activación en la íntima y la media. En las arterias sanas no se detectó actividad NF- κ B.

En conclusión, la disminución de este factor nuclear podría reducir la expresión de muchos genes inflamatorios implicados en el proceso aterosclerótico. Nuestros resultados proporcionan una explicación potencial al efecto beneficioso de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa en la reducción de eventos isquémicos observada en enfermos tratados con estos fármacos en estudios clínicos.

VI.- CONCLUSIONES

I.- LA ANG II ES UN IMPORTANTE REGULADOR DE DOS FENOMENOS ESENCIALES EN LA FORMACION DE LA PLACA ATEROMATOSA, LA ACUMULACION DE MACROFAGOS Y LA PROLIFERACION DE CML.

1.- En un modelo de aterosclerosis focal inducido en conejos mediante dieta rica en colesterol y daño endotelial por nitrógeno, hemos observado que el inhibidor de la ECA quinapril inhibe la ECA sérica en un 70% mientras que la vascular es reducida en un 40% en la fase temprana (7 días) y en un 50% en la fase avanzada (28 días). Sin embargo, estas inhibiciones no parecen suficientes puesto que a pesar de observar una disminución en la lesión, ésta no fue significativa.

2.- La expresión de algunos factores inflamatorios (MCP-1, IL-8 y PDGF-B) relacionados con el reclutamiento de monocitos y CML, está incrementada a nivel vascular, coincidiendo este hecho con un aumento de la actividad del factor nuclear que los regula, el NF- κ B, y con una elevación del infiltrado de macrófagos en la lesión. La administración de quinapril reduce todos estos eventos.

Mediante estudios *in vitro* demostramos que la Ang II induce activación NF- κ B y la expresión de MCP-1 en monocitos y CML, sugiriendo que la inhibición de la generación de Ang II debido al tratamiento con quinapril parece estar asociada a la disminución observada del infiltrado de macrófagos y a la reducción de la actividad NF- κ B vascular y de los factores que regula (MCP-1, IL-8 y PDGF-B).

3.- La expresión de colágeno I, factor asociado a la estabilidad de la placa, se encuentra incrementada tanto en la fase temprana (7 días) como en la más avanzada (28 días). El tratamiento con quinapril no modifica su expresión (génica y proteica).

Estos resultados contribuirían a la disminución del riesgo de rotura de la placa aterosclerótica al conferirle una mayor estabilidad.

II.- LA INHIBICION DE LA HMG-CoA REDUCTASA DISMINUYE ALGUNOS COMPONENTES INFLAMATORIOS DE LA LESION ATEROSCLEROTICA, Y SUGIERE UNA POSIBLE EXPLICACION DE LA REDUCCION OBSERVADA DE EVENTOS ISQUEMICOS EN ENSAYOS CLINICOS.

4.- En un modelo de aterosclerosis acelerada similar al anterior, la administración del inhibidor de la HMG-CoA reductasa atorvastatina reduce de forma significativa el colesterol total, LDL y triglicéridos y la formación neointimal.

5.- Las LDL inducen expresión de MCP-1 y activación de NF- κ B en monocitos y CML. Esto hace pensar que el colesterol puede ser responsable del incremento de actividad NF- κ B observado en la aorta e hígado de los animales no tratados. La administración de atorvastatina no sólo reduce la actividad NF- κ B en las lesiones (30% vs 60%) en macrófagos y CML, sino que también disminuye significativamente la expresión de MCP-1 en la neointima y en la capa media, además de anular el infiltrado de macrófagos en la lesión

6.- Estos resultados sugieren que probablemente la reducción del colesterol sea la principal responsable de los efectos vistos en nuestro modelo, aunque no debemos descartar que atorvastatina, además de su acción hipolipemiente, pudiera tener un efecto directo sobre la lesión.

En resumen, en dos modelos de aterosclerosis experimental hemos demostrado la participación de factores quimiotácticos en el infiltrado de células inflamatorias. Asimismo, hemos observado que la activación del factor de transcripción NF- κ B puede estar implicado en muchos de los procesos que conducen a la desestabilización y rotura de la placa aterosclerótica que dan lugar a los eventos isquémicos más graves. La administración de quinapril y de atorvastatina reducen estos riesgos, aportando nuevas expectativas de abordaje en la patogenia de la aterosclerosis.

VII.- BIBLIOGRAFIA

- Acton SL, Scherer PE, Lodish HF, Krieger M: Expression cloning of SR-BI, a CD36-related class B scavenger receptor. *J Biol Chem* 1994;269:21003-21009
- Adams DO, Hamilton TA: Macrophages as destructive cells in host defense. in Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R (eds): *Basic principles and clinical correlates*. New York, Raven Press, 1992, pp 637-662
- Akahoshi T, Wada C, Endo H, Hirota K, Hosaka S, Takagishi K, Kondo H, Kashiwazaki S, Matsushima K: Expression of monocyte chemotactic and activating factor in rheumatoid arthritis regulation of its production in synovial cells by interleukin-1 and tumor necrosis factor. *Arthritis Rheum* 1993;36:762-771
- Alberts AW, Chen JS, Kuron G, et al: Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of HMG-CoA reductase and a cholesterol-lowering agent. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980;77:3957-3961
- Andrew PJ, Harant H, Lindley IJ: Nitric oxide regulates IL-8 expression in melanoma cells at the transcriptional level. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214:949-956
- Angel P, Karin M: The role of Jun, Fos and AP-1 complex in cell proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1991;129:157
- Apostolopoulos J, Davenport P, Tipping PG: Interleukin-8 production by macrophages from atheromatous plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:1007-1012
- Asakura T, Karino T: Flow patterns and spatial distribution of atherosclerosis lesions in human coronary arteries. *Circ Res* 1990;66:1045-1066
- Asplund-Carlson A, Hamsten A, Wiman B, Carlson LA: Relationship between plasma plasminogen activator inhibitor-1 activity and VLDL triglyceride concentration insulin levels and insulin sensitivity: studies in randomly selected normolipidemic and hypertriglyceridemic men. *Diabetologia* 1993;36:817-825
- Assman G, Schulte H: Relation of high density lipoprotein cholesterol and triglycerides to incidence of atherosclerosis coronary artery disease (the PROCAM experience). *Am J Cardiol* 1992;70:733-737
- Baeuerle PA, Baltimore D: NF- κ B: Ten years after. *Cell* 1996;87:13-20
- Bandoh T, Mitani H, Niihashi M, et al: Inhibitory effect of fluvastatin on intimal thickening following balloon catheterization at the doses insufficient to lower serum lipids. *66th Congress of the European Atherosclerosis Society* 1996;p231(Abstract)
- Barnes MJ: Collagens in atherosclerosis. *Collagen Related Res* 1985;5:65-97
- Bell L, Luthringer DJ, Madri JA, Warrem SL: Autocrine angiotensin system regulation of bovine aortic endothelial cell migration and plasminogen activation involves modulation of proto-oncogene pp60c-src expression. *J Clin Invest* 1992;89:215-220
- Bell L, Madri JA: Influence of the angiotensin system on endothelial and smooth muscle cell migration. *Am J Pathol* 1990;137:7-12

- Bellas RE, Lee JS, Sonenshein GE: Expression of a constitutive NF- κ B like activity is essential for proliferation of cultured bovine vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1995;96:2521-2527
- Benditt EP, Barret T, McDougall JK: Viruses in the etiology of atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:6386-6389
- Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards S, et al: Atherosclerosis, basic mechanism: oxidation, inflammation and genetics. *Circulation* 1995;91:2488-2496
- Billett MA, Adbeish IS, et al: Increased expression of genes for platelet-derived growth factor in circulating mononuclear cells of hypercholesterolemic patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:399-406
- Björkerud S, Björkerud B: Apoptosis is abundant in human atherosclerotic lesions, especially in inflammatory cells (Macrophages and T cells), and may contribute to the accumulation of Gruel and plaque instability. *Am J Pathol* 1996;149:367-380
- Bocan TMA, Mazur MJ, Mueller SB, Brown EQ, Sliskovic DR, O'Brien PM, et al: Antiatherosclerotic activity of liver selective and nonselective inhibitors of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase in cholesterol-fed rabbits: a biochemical and morphological evaluation. *Atherosclerosis* 1994;111:127-142
- Bocan TMA, Ferguson E, McNally W, Uhlendorf PD, Mueller SB, De Hart P, et al: Hepatic and nonhepatic cholesterol synthesis and tissue distribution following administration of a liver selective HMG-CoA reductase inhibitor, CI-981: comparison with selected HMG-CoA reductase inhibitors. *Biochem Biophys Acta* 1992;1123:133-144
- Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D: Activated transcription factor nuclear factor- κ B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996;97:1715-1722
- Braun M, Pietsch P, Felix SB, Baumann G: Modulation of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 on human coronary smooth muscle cells by cytokines. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:2571-2579
- Brown BG, Fuster V: Impact of management in stabilization of coronary disease. in Fuster V, Ross R, Topol EJ (eds): *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996, pp 191-205
- Brown BG, Albers JJ, Fisher LD, Schaefer SM, Lin JT, Kaplan C, Zhao XQ, Bisson BD, Fitzpatrick WF, Dodge HT: Regression of coronary artery disease as a result of intensive lipid-lowering therapy in men with high levels of apolipoprotein B. *N Engl J Med* 1990;323:1289-1298
- Brown MS, Goldstein JL: Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. *Ann Rev Biochem* 1983;52:223-261
- Burleigh MC, Briggs AD, Lendon CL, Davies MJ, Born GV, Richardson PD: Collagen type I and III, collagen content, GAGs and mechanical strength of human atherosclerotic plaque caps: Span-wise variations. *Atherosclerosis* 1992;96:71-81

- Cannon JG, Clark BD, Wingfield P, Schmeissner U, Losberger C, Dinarello CA, Shaw AR: Cloning, expression, biologic properties and transcription during endotoxemia. *The Journal of immunology* 1989;142:2299-2306
- Chatterjee S: Role of oxidized human plasma low density lipoproteins in atherosclerosis: effects on smooth muscle cell proliferation. *Mol Cel Biochem* 1992;111:143-147
- Chobanian AV, Haudenschild CC, Nickerson C, Drago R: Antiatherogenic effect of captopril in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Hypertension* 1990;15:327-331
- Chobanian AV, et al: The effects of ACE inhibitors and other antihypertensive drugs on cardiovascular risk factors and atherogenesis. *Clin Cardiol* 1990;13:43-48
- Chomezynski P, Sacchi N: Singlestep of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156-159
- Chung KY, Agarwal A, Uitto J, Mauviel A: An AP-1 binding sequence is essential for regulation of the human alpha2 (I) collagen (COL1A2) promoter activity by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 1996;271:3272-3278
- Clinton SK, Underwood R, Hayes L, et al: Macrophage colony-stimulating factor gene expression in vascular cells and in experimental and human atherosclerosis. *Am J Pathol* 1992;140:301-316
- Clozel JP, Müller RK, Roux HR, Fischli W, Baumgartner HR: Influence of the status of the renin-angiotensin system on the effect of cilazapril on neointima formation after vascular injury in rats. *Circulation* 1993;88:1222-1227
- Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T: Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF-kappa B and cytokine inducible enhancers. *FASED J* 1995;9:899-909
- Collins T: Endothelial nucleal factor-kappa B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest* 1993;68:499-508
- Cushing SD, Borliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parham F, Gerrity R, Schwartz CJ, Fogelman AM: Minimally modified low density lipoprotein induce monocyte chemotactic protein 1 in human endotelial cells and smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:5134-5138
- Daemen BJ, Lombardi DM, Bosman FT, Schwartz SM: Angiotensin II induce smooth muscle cell proliferation in the normal and injured rat arterial wall. *Circ Res* 1991;68:450-456
- Davies MJ: The composition of coronary-artery plaques. *N Eng J Med* 1997;336:1312-1314
- Davies MJ: Stability and instability: Two faces of coronary atherosclerosis. *Circulation* 1996;94:2013-2020
- Davignon J, Montigny M, Dufour R: HMG-CoA Reductase inhibitors: A look Back and a look Ahead. *Can J Cardiol* 1992;8:843-864

- De-Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA, Shin WS, Liao JK: Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest* 1995;96:60-68
- Di Corleto PE, Soyombo AA: The role of the endothelium in atherogenesis. *Curr Opin Lipidol* 1993;4:364-372
- Diet F, Pratt RE, Berry GJ, Momose N, Gibbons GH, Dzau VJ: Increased accumulation of tissue ACE in human atherosclerotic coronary artery disease. *Circulation* 1996;94:2756-2767
- Dinareello CA: Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095-2147
- Dixit VM, Green S, Sarma V, et al: Tumor necrosis factor alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin. *J Biol Chem* 1990;265:2973-2978
- Dowell FJ, Hamilton CA, Lindop GB, Reid JL: Development and progression of atherosclerosis in aorta from heterozygous and homozygous rabbits. Effects of simvastatin treatment. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:152-160
- Duguid JB: Thrombosis as a factor in the pathogenesis of coronary atherosclerosis. *J Pathol Bacteriol* 1946;58:207-212
- Dzau VJ, Chobanian AV: Renin- Angiotensin system and atherosclerotic vascular disease. in Fuster V, Ross R, Topol EJ (eds): *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996.
- Dzau VJ, Re R: Tissue angiotensin system in cardiovascular medicine: a paradigm shift? *Circulation* 1994;89:493-498
- Dzau VJ: Local expression and pathophysiological role of renin-angiotensin in the blood vessels and heart. *Basic Res Cardiol* 1993;88:1-14
- Dzau VJ, Pratt RE: Renin-angiotensin system. in Fozzard HA, et al (eds): *The Heart and Cardiovascular System*. New York, Raven Press, 1991, pp 1817-1850
- Egido J: Vasoactive hormones and renal sclerosis. *Kidney Int* 1996;49:578-597
- Endo A, Kuroda M, Tsujita Y: ML-236A, ML-236B, and ML-236C, new inhibitors of cholesterol synthesis produced by *Penicillium citrinum*. *J Antibiot* 1976;29:1346-1348
- Ermofsson M, Siegbahn A: Platelet-derived growth factor-BB and monocyte chemoattractant protein-1 induce human peripheral blood monocytes to express tissue factor. *Thromb Res* 1996;83:307-320
- Falk E, Shah PK, Fuster V: Pathogenesis of plaque disruption, in Fuster V, Ross R, Topol EJ (eds): *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996.
- Farber HW, Center DM, Rounds S, Danilov SM: Components of the angiotensin system cause release of a neutrophil chemoattractant from cultured bovine and human endothelial cells. *Eur Heart J* 1990;11 (suppl B):100-107

- Faruqui RM, Di Corleto PE: Mechanism of recruitment and accumulation. *Br Heart J* 1993;69:S19-S29
- Feener EP, Northrup JM, Aiello LP, King GL: Angiotensin II induces plasminogen activator inhibitor-1 and -2 expression in vascular endothelial and smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1995;95:1353-1362
- Fernández-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, Fuster V, Meyer B, Mailhac A, Weng D, Shah PK, Badimon L: Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol* 1994;23:1562-1569
- Ferran C, Millan MT, Csizmadia V, Cooper JT, Brostjan C, Bach FH, Winkler H: Inhibition of NF- κ B by pyrrolidine dithiocarbamate blocks endothelial cell activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1995;214:212-223
- Finco TS, Baldwin AS: κ B site-dependent induction of gene expression by diverse inducers of nuclear factor κ B requires Raf-1. *J Biol Chem* 1993;268:17676-17679
- Flesch M, Sachinidis A, Ko Y, Kraft K, Vetter H: Plasma lipids and lipoprotein and essential hypertension. *Clin Invest* 1994;72:944-950
- Freeman EJ, Chilsolm GM, Ferrario CM, Tallant EA: Angiotensin-(1-7) inhibits vascular smooth muscle cell growth. *Hypertension* 1996;28:104-108
- Frostegard J, Kjellman B, Gidlund M, Andersson B, Jindal S, Kiessling R: Induction of heat shock protein in monocytic cells by oxidized low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* 1996;121:93-103
- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, et al: The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndrome. *N Engl J Med* 1992;326:242/250-310/318
- Fuster V, Badimon JJ, Taubman MB, Chesebro JH: Syndromes of accelerated atherosclerosis: Role of vascular injury and smooth muscle cell proliferation. *J Am Coll Cardiol* 1990;15:1667-1687
- Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P: Increased expression of matrix-metalloproteinases and matrix-degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 1994;94:2493-2503
- García-Gil C, Cortés M: Comparación de las tendencias de mortalidad por enfermedades isquémicas de corazón y otras cardiovasculares entre España y otros países desarrollados 1970-1980. *Med Clin (Barc)* 1989;93:790-798
- Geng YJ, Libby P: Evidence for apoptosis in advanced human atheroma: colocalization with interleukin-1 beta-converting enzyme. *Am J Pathol* 1995;147:251-266
- Gibbons GH, Pratt RE, Dzau VJ: Vascular smooth muscle cell hypertrophy vs hyperplasia: Autocrine transforming growth factor beta 1 expression determines growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1992;90:456-461
- Gimbrone MA Jr. Vascular endothelium in health and disease. in Haber E (ed): *Molecular cardiovascular medicine*. New York, Scientific American Medicine. 1995.

- Goetzl EJ, Klickstein LB, Watt KWK, Wintroub BU: The preferential human mononuclear leukocyte chemotactic activity of the substituent tetrapeptides of angiotensin II. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;97:1097-1102
- Goldstein JL, Brown MS: Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990;343:425-430
- Gotto AM: Lipid lowering, regression, and coronary events. A review of the interdisciplinary council on lipids and cardiovascular risk intervention, seventh council meeting. *Circulation* 1995;92:646-656
- Gown AM, Vogel AM, Gordon D, Lu PL: A smooth muscle-specific monoclonal antibody recognizes smooth muscle actin isoforms. *J Cell Biol* 1985;100:807-813
- Griendling KK, Alexander RW: Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J* 1996;10:283-292
- Grimm S, Baeuerle PA: The inducible transcription factor NF-kappa B: structure-function relationship of its protein subunits. *Biochem J* 1993;290:297-308
- Guijarro C, Keane WF: Effects of lipids in the pathogenesis of progressive renal failure. Role of HMG-CoA reductase inhibitors in the prevention of glomerulosclerosis. *Miner Electrol Metab* 1996;22:147-152
- Hamdan AD, Quist WC, Gagne JB, Feener EP: Angiotensin-converting enzyme inhibition suppresses plasminogen activator inhibitor-1 expression in the neointima of balloon-injured rat aorta. *Circulation* 1996;93:1073-1078
- Hamsten A, Walldius G, Szamosi, et al: Plasminogen activator inhibitor in plasma: risk factor for recurrent myocardial infarction. *Lancet* 1987;2:3-9
- Han DKM, Haudenschild CC, Hong MK, Tjurmin A, Liav G, Kent Km: Apoptosis as a determinant of cellularity in advanced atherosclerotic lesion. *Circulation* 1994;90:1291
- Hansson GK: Immunological control mechanisms in plaque formation. *Basic Res Cardiol* 1994;89:41-46
- Hansson GK, Jonasson L, Seifert PS, Stemme S: Immune mechanism in atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1989;9:567-578
- Hansson GK, Holm J, Jonasson L: Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol* 1989;135:169-175
- Henney AM, Wakeley PR, Davies MJ, Foster K, Hembry T, Murphy G, et al: Localization of stromelysin gene expression in atherosclerotic plaques by *in situ* hybridation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8154-8158
- Hernández-Presa MA, Bustos C, Ortego M, Tuñón J, Renedo G, Ruiz-Ortega M, Egido J: Angiotensin-converting enzyme inhibition prevents arterial nuclear factor-kappa B activation monocyte chemoattractant protein-1 expression, and macrophage infiltration in a rabbit model of early accelerated atherosclerosis. *Circulation* 1997;95:1532-1541
- Hogg N, Harvey J, Cabanas C, Landis RC: Control of leukocyte integrin activation. *Am Rev Respir Dis* 1993;48:S55-S59

- Horning B, Kohler C, Drexler H: Role of Bradykinin in mediating vascular effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors in humans. *Circulation* 1997;95:1115-1118
- Ishida M, Marrero MB, Schieffer B, Ishida T, Bernstein KE, Berk BC: Angiotensin II activates pp60^{c-src} in vascular smooth muscle cells. *Cir Res* 1995;77:1053-1059
- Itoh H, Mukoyama M, Pratt RE, Gibbons GH, Dzau VJ: Multiple autocrine growth factors modulate vascular smooth muscle cell growth response to angiotensin II. *J Clin Invest* 1993;91:2268-2274
- Jang IK, Lassila R, Fuster V: Atherogenesis and inflammation. *European Heart Journal* 1993;14:2-6
- Jang Y, Lincoff M, Plow EF, Topol EJ: Cell adhesion molecules in Coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:1591-1601
- 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
- Kaneto H, Morrissey J, Klahr S: Increased expression of TGF- β 1 mRNA in the obstructed kidney of rats with unilateral ureteral ligation. *Kidney Int* 1993;44:313-321
- Kannel WB: Range of serum cholesterol values in the population developing coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1995;76:69C-77C
- Karin M: The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 1995;270:16483-16486
- Kathawala FG: HMG-CoA reductase inhibitors: an exciting development in the treatment of hyperlipoproteinemia. *Med Res Rev* 1991;11:121-146
- Katsuda S, Okada Y, Minamoto T, Oda Y, Matsui Y, Nakanishi I: Collagens in Human Atherosclerosis Immunohistochemical Analysis using collagen Type-specific antibodies. *Arteriosclerosis and Thrombosis* 1992;12:494-502
- Katznelson S, Kobashigawa JA: Dual roles of HMG-CoA reductase inhibitors in solid organ transplantation: Lipid lowering and immunosuppression. *Kidney Int* 1995;48:S112-S115
- Khachigian LM, Resnick N, Gimbrone MA, Collins T: Nuclear Factor-kB interacts functionally with the platelet-derived growth factor B-chain shear-stress. Response element in vascular endothelial cells expose to fluid shear stress. *J Clin Invest* 1995;96:1169-1175
- Kiessling R, Grönberg A, Ivanyi J, et al: Role of hsp 60 during autoimmune and bacterial inflammation. *Immunol Rev* 1991;121:91-111
- Kishikawa H, Shimokama T, Watanabe T: Localization of T Lymphocytes and macrophages expressing IL-1, IL-2 receptor, IL-6 and TNF in human aortic intima. Role of cell-mediated immunity in human atherogenesis. *Virchows Archiv A Pathol Anat* 1993;423:433-442
- Kobashigawa JA, Katznelson S: Effect of pravastatin on outcomes after cardiac transplantation. *N Engl J Med* 1995;333:621-627

- Kowala MC, Grove RI, Aberg G: Inhibitors of angiotensin converting enzyme decrease early atherosclerosis in hyperlipidemic hamsters. Fosinopril reduces plasma cholesterol and captopril inhibits macrophage-foam cell accumulation independently of blood pressure and plasma lipids. *Atherosclerosis* 1994;108:61-72
- Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human, rabbit endothelial cells. *J Clin Invest* 1992;90:1138-1144
- Kurz S, Palmer SJ, Rajagopalan S, Münzel T, Medford RM, Harrison DG: Improvement of endothelium dysfunction in hypercholesterolemic rabbits by chronic administration of the antioxidant pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC). *Circulation* 1995;92:1230
- LaRosa JC, Hunnigake D, Grundy SM, Wilson PW, Clarkson TB, Hay JW: The cholesterol facts. A summary of the evidence relating dietary habits, serum cholesterol, and coronary heart disease. A joint statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung, and Blood Institute. *Circulation* 1990;81:1721-1733
- Larsen C.G, Anderson A.O, Appella E: The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science* 1989;243:1464-1466
- Le.Veen RF, Wolf GL, Villanueva TG: New rabbit atherosclerosis model for the investigation of transluminal angioplasty. *Invest Radiol* 1982;17:470-475
- Li H, Freeman MW, Libby P: Regulation of smooth muscle cell scavenger receptor expression in vivo by atherogenic diets and in vitro by cytokines. *J Clin Invest* 1995;95:122-133
- Li H, Cybulsky M, Gimbrone MA Jr., Libby P: Inducible expression of vascular cell adhesion molecule-1 by vascular smooth muscle cells in vitro and within rabbit atheroma. *Am J Pathol* 1993;143:1551-1559
- Liao F, Andalibi A, Qiao JH, Allaye H, Fogelman AM, Lusis AJ: Genetic evidence for a common pathway mediating oxidative stress, inflammatory gene induction, and aortic fatty streak formation in mice. *J Clin Invest* 1994;94:877-884
- Liao F, Andalibi A, de Beer FC, Fogelman AM, Lusis AJ: Genetic control of inflammatory gene induction and NF-kB like transcription factor activation in response to atherogenic diet in mice. *J Clin Invest* 1993;91:2572-2579
- Libby P: Molecular bases of the acute coronary syndromes. *Circulation* 1995;91:2844-2850
- Lindpainter K, Lu W, Niedermajer N, et al: Selective activation of cardiac angiotensinogen gene expression in postinfarction ventricular remodeling in the rat. *J Mol Cell Cardiol* 1993;25:133-143
- Linz W, Wiemer G, Gohlke P, Unger T, Scholkens B.A: Contribution of Kinins to the cardiovascular actions of angiotensin-converting enzyme inhibitors. *Pharmacol Rev* 1995;47:25-49
- Lonn EM, Yusuf S, Jha P, Moritague TJ, Teo KK, Benedict CR, Pitt B: Emerging role of angiotensin-converting enzyme inhibitors in cardiac and vascular protection. *Circulation* 1994;90:2056-2069

- Loree HM, Kamm RD, Stringfellow RG, Lee RT: Effects of fibrous cap thickness on peak circumferential stress in model atherosclerotic vessels. *Circ Res* 1992;71:850-858
- Mancini GB, Henry GC, Macaya C, O'Neill BJ, Pucillo AL, Carere RG, Wargovich TJ, Mudra H, Luscher TF, Klibaner MI: The TREND (Trial on Reversing Endothelial Dysfunction) study. Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1996;94:258-265
- Marrero MB, Schieffer B, Paxton WG, Heerdt L, Berk BC, Delafontaine P, Bernstein KE: Direct stimulation of Jak/STAT pathway by the angiotensin II AT1 receptor. *Nature* 1995;375:247-250
- Massy ZA, Keane WF: Pathogenesis of Atherosclerosis. *Seminars in Nephrology* 1996;16:12-20
- Matrisian LM: The matrix-degrading metalloproteinases. *BioEssays* 1992;14:455-463
- Mecham RP, Whitehouse LA, Wrenn DS, et al: Smooth muscle-mediated connective tissue remodeling in pulmonary hypertension. *Science* 1987;237:423-426
- Miano JM, Vlasic N, Tota RR, Stemerman MB: Localization of Fos and Jun proteins in rat aortic smooth muscle cells after vascular injury. *Am J Pathol* 1993;142:715-724
- Mitani H, Bando T, Kimura M, Totsuka T, Hayashi S: Increased activity of vascular ACE related to atherosclerotic lesions in hyperlipidemic rabbits. *Am J Physiol* 1996;271:H1065-H1071
- Mitchinson MJ: The new face of atherosclerosis. *Br J Clin Pract* 1994;48:149-151
- 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
- Moreno PR, Falk E, Palacios IF, Newell JB, Fuster V, Fallon JT: Macrophage infiltration in acute coronary syndromes: implication for plaque rupture. *Circulation* 1994;90:775-778
- Moyer CF, Sajuthi D, Tulli H, Williams JK: Synthesis of IL-1 alpha and IL-1 beta by arterial cells in atherosclerosis. *Am J Pathol* 1991;138:951-960
- Mukaida N, Okamoto S, Ishikawa Y, Matsushima K: Molecular mechanism of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 1994;56:554-558
- Muñoz C, Pascual-Salcedo D, Castellanos MC, Alfranca A, Aragonés J, Vara A, Redondo MJ, de-Landazuri MO: Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits the production of interleukin-6, interleukin-8, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor by human endothelial cells in response to inflammatory mediators: modulation of NF-kappa B and AP-1 transcription factors activity. *Blood* 1996;88:3482-3490
- Nakajama I, Kawahara Y, Tsuda T, Okuda M, Yokoyama M: Angiotensin II inhibits cytokine-stimulated inducible nitric oxide synthase expression in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1994;269:11628-11633
- Negoro N, Kanayama Y, Haraguchi M, Umetani N, Nishimura M, Konishi Y, Iwai J, Okamura M, Inoue T, Takeda T: Blood pressure regulates platelet-derived growth factor A-chain gene expression in vascular smooth muscle cells in vivo. *J Clin Invest* 1995;95:1140-1150

- Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox JN: Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J Clin Invest* 1991;88:1121-1127
- Nickenig G, Sachinidis A, Michaelsen F, Böhm M, Seewald S, Vetter H: Upregulation of vascular angiotensin II receptor gene expression by low-density lipoprotein in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1997;95:473-478
- Nikkari ST, Geary RL, Hatsukami T, Ferguson M, Forough R, Alpers CE, Clowes AW: Expression of collagen, interstitial collagenase, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in restenosis after carotid endarterectomy. *Am J Pathol* 1996;148:777-783
- O'Brien KD, McDonald TO, Chait A, Allen MD, Alpers CE: Neovascular expression of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in human atherosclerosis and their relation to intimal leucocyte content. *Circulation* 1996;93:672-682
- Obata H, Biro S, Arima N, Kaieda H, Kihara T, Eto H, Miyata M, Tanaka H: NF-kappa B is induced in the nuclei of cultured rat aortic smooth muscle cells by stimulation of various growth factors. *Biochem Biophys Res Commun* 1996;224:27-32
- Okazaki H, Majesky MW, Harker LA, Schwartz SM: Regulation of platelet - derived growth factor ligand and receptor gene expression by alpha - thrombin in vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1992;76:1285-1293
- Ortego M, Bustos C, Hernández-Presa MA, Tuñón J, Díaz C, Hernández G, Egado J: *The HMG-CoA reductase inhibitor atorvastatin reduces NF-kB activation and MCP-1 gene expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells.* 1997, (Enviado para publicación)
- Oskarsson HJ, Heistad DD: Oxidative stress produced by angiotensin too. *Circulation* 1997;95:557-559
- Osterrieder W, Muller RKM, Powell JS, Clozel JP, Hefti F, Baumgarther HR: Role of angiotensin II in injury-induced neointima formation in rats. *Hypertension* 1991;11:60-II-64
- Owens GK: Role of alterations in the differentiated state of vascular smooth muscle cells in atherogenesis. in Fuster V, Ross R, Topol EJ (eds): *Atherosclerosis and Coronary Disease.* Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996,
- Owens GK, Loeb A, Gordon D, Thompson MM: Expression of smooth muscle-specific α -isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation. *J Cell Biol* 1986;102:343-352
- Patsch JR, Miesenbock G, Hopferwieser T, et al: The relationship of triglyceride metabolism and coronary artery disease. Studies in the postprandial state. *Arterioscler Thromb* 1992;12:1336-1345
- Pekkanen J, Linn S, Heiss G, et al: Ten-year mortality from cardiovascular disease: Relation to cholesterol level among men with and without preexisting cardiovascular disease. *N Engl J Med* 1990;322:1700-1707
- 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

- Pfeffer MA, Braunwald E, Moya LA, et al: Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. *N Engl J Med* 1992;327:669-677
- Powell JS, Clozel JP, Muller RKM, Kuhn H, Hefli F, Hosang M, Baumgarther HR: Inhibitors of angiotensin-converting enzyme prevent myointimal proliferation after vascular injury. *Science Wash* 1989;245:186-188
- Prescott MF, Webb RL, Reidy MA: Angiotensin-converting enzyme inhibitor versus angiotensin II AT1 receptor antagonist: effects on smooth muscle cell migration and proliferation after balloon catheter injury. *Am J Pathol* 1991;131:1291-1296
- Puri PL, Avantiaggiati ML, Burgio VL, Chirillo P, Colleparado D, Natoli G, Balsano C, Levrero M: Reactive oxygen intermediates (ROIs) are involved in the intracellular transduction of angiotensin II signal in C2C12 cells. *Ann N Y Acad Sci* 1995;752:394-405
- Quinn MT, Parthasarathy S, Steinberg D: Lysophosphatidylcholine: A chemotactic factor for human monocytes and its potential role in atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:2805-2809
- Raines EW, Rosenfeld ME, Ross R: The role of macrophages. in Fuster V, Ross R, Topol EJ (eds): *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996,
- Raines EW, Ross R: Smooth muscle cells and the pathogenesis of the lesions of atherosclerosis. *Br Heart J* 1993;69:S30-S37
- Raines EW, Bowen-Pope DF, Ross R: Platelet-derived growth factor, in Sporn MB, Roberts AB (eds): *Handbook of experimental pharmacology: Peptide growth factors and their receptors*. Heidelberg, Springer-Verlag, 1990, pp 262-263
- Rakugi H, Kim DK, Krieger JE, Wang DS, Dzau VJ, Pratt RE: Induction of angiotensin converting enzyme in the neointima after vascular injury. Possible role in restenosis. *J Clin Invest* 1994;93:339-346
- Rakugi H, Wang DS, Dzau VJ, Pratt RE: Potential importance of tissue angiotensin-converting enzyme inhibition in preventing neointima formation. *Circulation* 1994;90:449-455
- Rangaswamy S, Penn MS, Saidel GM, Chilsolm GM: Exogenous oxidized low density lipoprotein injuries and alters the barrier junction of endothelium in rats in vivo. *Circ Res* 1997;80:37-44
- Rauterburg J, Jaeger E, Althau M: Collagens in atherosclerotic vessel wall lesions. *Curr Top Pathol* 1993;87:163-192
- Reagan LP, Yee DK, He PF, Fluharty SJ: Heterogeneity of angiotensin type 2 (AT2) receptors. *Adv Exp Med Biol* 1996;396:199-208
- Rekhter MD, Zhang K, Narayanan AS, Phan S, Schork MA, Gordon D: Type I collagen gene expression in human atherosclerosis. Localization to specific plaque regions. *Am J Pathol* 1993;143:1634-1648
- Richardson M, Hadcock S, DeReske M, Cybulsky M: Increased expression in vivo of VCAM-1 and E-selectin by the aortic endothelium of normolipemic and hyperlipemic diabetic rabbits. *Arterioscler Thromb* 1994;14:760-769

- Rosenfeld ME, Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Ord VA, et al: Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesion of rabbits and man. *Am J Pathol* 1992;140:291-300
- Rosenfeld ME, Ross R: Macrophage and smooth muscle cell proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 1990;10:680-687
- Rosenfeld ME, Tsukada T, Gown AM, Ross R: Fatty streak initiation in WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 1987;7:9-23
- Ross R, Libby P: Cytokines and growth regulatory molecules in atherosclerosis. in Fuster V, Ross R, Topol EJ (eds): *Atherosclerosis and Coronary Diseases*. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996, pp 585-594
- Ross R, Fuster V: The pathogenesis of atherosclerosis. in Fuster V, Ross R, Topol EJ (eds): *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Philadelphia, Lippincott-Raven, 1996, pp 441-460
- Ross R: Atherosclerosis: A Defense Mechanism Gone Awry. *Journal of Pathology* 1993;143:
- Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-809
- Ross R: Atherosclerosis: A defense mechanism gone awry. *Am J Pathol* 1993;143:987-1002
- Ross R: The pathogenesis of atherosclerosis. An Update. *N Engl J Med* 1986;314:488-500
- Sakata N, Jimi S, Fujimitsu K, Takebayashi S: The role of collagen matrix in atherogenesis. *Nippon Rinsho* 1993;52:1967-1973
- Sandison AT: Degenerative vascular disease. in Brothwell D, Sandison AT (eds): *Diseases in Antiquity: A survey of the Diseases, Injuries and surgery of Early Populations*. Springfield, IL, Charles C Thomas, 1967, pp 474-488
- Schreck R, Meier B, Mannel DN, Dröge W, Baeuerle PA: Dithiocarbamates as potent inhibitors of nuclear factor kappa B activation in intact cells. *J Exp Med* 1992;175:1181-1194
- Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS, et al: Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy: effects on coronary resistance, contractility and relaxation. *J Clin Invest* 1990;86:1913-1920
- Seifert PS, Hansson GK: Complement receptors and regulatory proteins in human atherosclerotic lesions. *Arteriosclerosis* 1989;9:802-811
- Shakhov AN, Kuprash DV, Azizov MM, Jongeneel CV, Nedospasov SA: Structural analysis of the rabbit TNF locus, containing the genes encoding TNF- β (lymphotoxin) and TNF- α (tumor necrosis factor). *Gene* 1990;95:215-221
- Shepherd J: The west of Scotland coronary prevention study: A trial of cholesterol reduction in scottish men (WOSCOPS). *Am J Cardiol* 1995;76:113C-117C
- Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CJ, Lorimer AR, MacFarlane PW, et al: Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1995;333:1301-1307

- Shiomi M, Ito T, Tsukada T, et al: Reduction of serum cholesterol levels alters lesional composition of atherosclerotic plaques. Effect of pravastatin sodium on atherosclerosis in mature WHHL rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995;15:938-944
- Silveria A, Karpe F, Blombäck M, Steiner G, Walldius G, Hamsten A: Activation of coagulation factor VII during alimentary lipemia. *Arterioscler Thromb* 1994;14:60-69
- Simionescu N, Vasile E, Lupu F, Popescu G, Simionescu M: Prelesional events in atherogenesis: accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit. *Am J Pathol* 1986;123:109-125
- Sliskovic DR, Roth BD, Bocan TMA: Tissue selectivity of HMG-CoA reductase inhibitors. *Drug News Perspectives* 1992;5:517-533
- Smith D, Gilbert M, Owen WG: Tissue plasminogen activator release in vivo in response to vasoactive agents. *Blood* 1985;66:835-839
- Smyth SS, Joneckis CC, Parise LW: Regulation of vascular integrins. *Blood* 1997;81:2827-2843
- Soma MR, Doneti E, Parolini C, Mazini G, Ferrari G, Fumagalli R, Paoletti R: HMG-CoA reductase inhibitors: *In vivo* effects of carotid intimal thickening in normocholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 1993;13:571-578
- Stary HC, Blankenhorn DH, Chandler AB, et al: A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from Committee on Vascular lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1992;85:391-405
- Steinberg D: Oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997;95:1062-1071
- Steinberg D, Parthasarathy S, Carew TE, Khoo JC, Witztum JL: Beyond cholesterol: Modifications of low density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Engl J Med* 1989;320:915-924
- Stukker GE, Hoffman WF, Alberts AW, et al: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. Structural modifications of 5-substituted 3,5-dihydroxypentanoic acids and their lactone derivatives. *J Med Chem* 1985;28:347-358
- Sun S.C, Ganchi P.A, Ballard D.W, Greene W.C: NF-kB controls expression of inhibitor I κ B- α : evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 1993;261:1912-1915
- Suzuki YJ, Mizuno M, Packer L: Signal transduction for nuclear factor-kB activation: proposed location of antioxidant-inhibitable step. *J Immunol* 1994;153:5008-5015
- Swartz SL, Moore TJ: Effect of angiotensin II on collagen induced platelet aggregation in normotensive subjects. *Tromb Haemostasis* 1990;63:87-90
- Szekanecz Z, Shah MR, Harlow LA, Pearce WH, Koch AE: Interleukin-8 and tumor necrosis factor- α are involved in human aortic endothelial cell migration. The possible role of these cytokines in human aortic aneurysmal blood vessel growth. *Pathobiology* 1994;62:134-139
- Takahashi M, Masuyama JI, Ikeda U, Kasahara T, Kitagawa SI, Takahashi YI, Shimasa K, Kano S: Induction of monocyte chemoattractant protein-1 synthesis in human monocytes during transendothelial migration in vitro. *Circ Res* 1995;76:750-757

Takasaki I, Chobanian AV, Sarzani R, Brecher P: Effect of hypertension on fibronectin expression in the rat aorta. *J Biol Chem* 1990;265:21935-21939

Thamos D, Maniatis T: NF- κ B: a lesson in family values. *Cell* 1995;80:529-532

The 4S Investigators: Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian simvastatin survival study (4S). *Lancet* 1994;344:1388-1389

The CONSENSUS Trial study group: Effect of enalapril on mortality in severe congestive heart failure: results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). *N Engl J Med* 1987;316:1429-1435

The SOLVD Investigators: Effect of enalapril on survival in patients with reduced left ventricular ejection fractions and congestive heart failure. *N Engl J Med* 1991;325:293-302

Tipping PG, Hancock WW: Production of tumor necrosis factor and interleukin-1 by macrophages from human atheromatous plaques. *Am J Pathol* 1993;141:1721-1728

Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gertz SD, Fernández-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nermerson Y, Badimon JJ: Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1997;95:594-599

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

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

Tsujita Y, Kuroda M, Shimoda Y: CS-514, a competitive inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase: Tissue selective inhibition of sterol synthesis and hypolipidemic effect on various animal species. *Biochim Biophys Acta* 1986;877:50-60

Tsukada T, Rosenfeld ME, Ross R, Gown AM: Immunocytochemical analysis of cellular components in atherosclerotic lesions. Use of monoclonal antibodies with the Watanabe and fat-fed rabbit. *Arteriosclerosis* 1986;6:601-613

Uchida K, Sasahara M, Morigami N, Hazama F, Kinoshita M: Expression of platelet-derived growth factor B-chain in neointimal smooth muscle cells of balloon injured rabbit femoral arteries. *Atherosclerosis* 1996;124:9-23

Ueda A, Okuda K, Ohno S, Shirai A, Igarashi T, Matsunaga K, Fukushima J, Kawamoto S, Ishigatsubo Y, Okubo T: NF- κ B and SP1 regulate transcription of the human monocyte chemoattractant protein 1 gene. *J Immunol* 1994;153:2052-2063

Ullian ME, Linas SL: Angiotensin II surface receptors coupling to inositol triphosphate formation in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 1990;265:195-200

van der Wall, Becker AE, van der Loos, Tigges AJ, Das PK: Fibrous and lipid-rich atherosclerotic plaques are part of interchangeable morphologies related to inflammation: a concept. *Coron Artery Dis* 1994;5:463-469

van der Wall, Becker AE, van der Loos, 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

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

van Leeuwen RTJ, Kol A, Andreotti F, Kluft C, Maseri A, Sperti G: Angiotensin II increases plasminogen activator inhibitor type 1 and tissue-type plasminogen activator messenger RNA in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circulation* 1994;90:362-368

Vaughan DE, Lazos SA, Tong K: Angiotensin II regulates the expression of plasminogen activator inhibitor in cultured endothelial cells. *J Clin Invest* 1995;95:995-1001

Virchow R: Phlogose und thrombose im Gefäßsystem. in Virchow R (ed): *Gesammelte Abhandlungen zur wissenschaftliche Medizin*. Berlin, Meidinger Sohn, 1856, pp 458-463

von Rokitsansky: *Handbuch der Pathologische Anatomie*. Wien, 1844.

Wang N, Tabas I, Winchester R, Ravalli S, Rabbani LE, Tall A: Interleukin 8 is induced by cholesterol loading of macrophages and expressed by macrophage foam cells in human atheroma. *J Biol Chem* 1996;271:8837-8842

Wang X, Feverstein GZ, Gu JL, Lysko PG, Yue TL: Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules un human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 1995;115:89-98

Wang XB, Watanabe Y, Osugi T, Ikemoto M, Hirata M, Miki N: In situ DNA-protein binding: a novel method for detecting DNA-binding activity of transcription factor in brain. *Neurosci Lett* 1992;146:25-28

Weber KJ, Pathak A, Moses JW, et al: Induction of monocyte chemoattractant protein-1 and its role in the development of unstable coronary atherosclerotic plaques. *Circulation* 1995;92 (suppl I):I-160

Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-376

Wiener L, Lattes RG, Meltzer BG, Spiro G: The cellular pathology of experimental hypertension. Evidence for increased vascular permeability. *Am J Pathol* 1969;54:187-207

Wiggins R, Goyal M, Merrit S, Killen PD: Vascular adventitial cell expression of Collagen I messenger ribonucleic acid in antiglomerular basement membrane antibody induced crescentic nephritis in the rabbit. *Lab Invest* 1993;68:557-565

Wilson PWF: Established risk factors and coronary artery disease: The Framingham study. *Am J Hipertens* 1994;7:7S-12S

Wright RA, Flapan AD, Alberti KGMM, Ludlam CA, Fox KA: Effects of captopril therapy on endogenous fibrinolysis in men with recent uncomplicated myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 1994;24:67-73

- Yang SG, Saifeddine M, Lanyon A, Hollenberg MD: Distinct signal transduction pathways for angiotensin II in guinea pig gastric smooth muscle: differential blockade by indomethacin and tyrosine kinase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 1993;264:958-966
- Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, et al: Expression of monocyte chemoattractant protein-1 in macrophage rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5252-5256
- Ylä-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Särkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D: Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:5252-5256
- Yu CL, Meter DJ, Campbell GS, Lamer AC, Carter-Su C, Schwartz J, Jove R: Enhanced DNA binding activity of Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science* 1995;269:81-83
- Yu X, Druz S, Graves DT, Zhang L, Antoniadis HN, Hollander W, Prusty S, Valente AJ, Schwartz CJ, Sonenshein GE: Elevated expression of monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:6953-6957
- Yue TL, Wan X, Sung C-P, Olson B, McKenna PJ, Gu J-L, Feuerstein GZ: Interleukin-8. A mitogen and chemoattractant for vascular smooth muscle cells. *Circ Res* 1994;75:1-7
- Yusuf S, Pepine CJ, Garces C, Pouleur H, Salem D, Kostis J, Benedict CR, Rousseau M, Bourassa M, Pitt B: Effect of enalapril on myocardial infarction and unstable angina in patients with low ejection fractions. *Lancet* 1992;240:1173-1178
- Zeher AM, Fisslthaler B, Schray-Utz B, Busse R: Nitric oxide modulates the expression of monocyte chemoattractant protein 1 in cultured human endothelial cells. *Cir Res* 1995;76:980-986