Patologia molecular
(R. Bartrons, ed.)

Treballs de la SCB. Vol. 49 (1999) 207-222

PATOLOGIA DE LA PROGRESSIÓ DE LA MALALTIA ARTERIAL CORONÀRIA DES DEL PUNT DE VISTA MOLECULAR

LINA BADIMON, JOSÉ MARTÍNEZ-GONZÁLEZ I TERESA ROYO

Centre d'Investigació Cardiovascular. IIBB/CSIC - HSCSP - UAB. Barcelona.

INTRODUCCIÓ

L'aterosclerosi és una malaltia vascular que afecta la capa íntima de les artèries de mitjà i gran calibre. Es caracteritza per l'acumulació de material lipídic i elements cel·lulars, sobretot macròfags i cèl·lules musculars llises (CML). En l'actualitat la hipòtesi més acceptada sobre l'origen de l'aterosclerosi la considera com una resposta inflamatòria especialitzada a diferents formes de lesió de la paret (Ross, 1990). El caràcter crònic del procés inflamatori condueix a la formació de plaques que en fases avançades poden obturar les artèries.

Les síndromes coronàries agudes semblen més relacionades amb la ruptura de les plaques que amb la seva progressió gradual fins a l'oclusió completa de les artèries (Fuster *et al.*, 1992). La ruptura o ulceració de les plaques provoca la formació de trombes que poden donar origen a complicacions clíniques o bé contribuir al creixement de la placa de forma asimptomàtica (Badimon *et al.*, 1998). Per tant, el paper de les plaquetes i dels fenòmens de la coagulació són de cabdal importància. En condicions normals, els constituents de la sang no interaccionen amb l'endoteli vascular. Tanmateix, l'exposició al flux sanguini de la superfície vascular alterada o de trams vasculars amb certes característiques anatòmiques (ramificacions) inicia complexos mecanismes que condueixen a la ràpida deposició de plaquetes, fibrina insoluble, leucòcits i eritròcits. Segons les condicions del flux sanguini local es formen trombes rics en plaquetes. El desenvolupament de trombes pot arribar a cloure el flux local de sang, o bé aquests trombes poden despendre's i produir embolització amb oclusions en zones distals a les d'origen. L'oclusió de les artèries amb lesions ateroscleròtiques per processos trombòtics o tromboembòlics és responsable dels processos d'isquèmia coronària, malaltia cerebrovascular i dels processos d'isquèmia perifèrica.

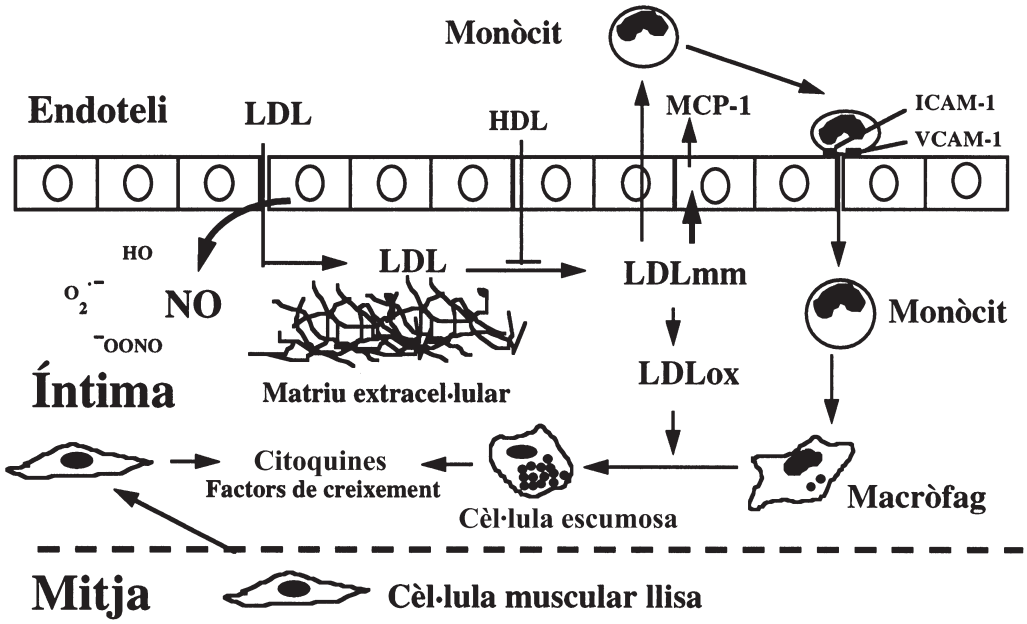

FIGURA 1. Esquema dels mecanismes cel·lulars i moleculars que donen origen a l'inici i progressió de les lesions ateroscleròtiques.

Els processos cel·lulars i moleculars que participen en l'inici i progressió de les lesions ateroscleròtiques poden ser dividits en diverses fases, que s'analitzaran separadament en aquest capítol.

RETENCIÓ I MODIFICACIÓ OXIDATIVA DE LES LDL EN LA PARET VASCULAR

L'acumulació de lipoproteïnes plasmàtiques, especialment lipoproteïnes de baixa densitat (LDL), sembla un dels primers esdeveniments associats al desenvolupament de lesions ateroscleròtiques. El sistema vascular està recobert per una monocapa de cèl·lules endotelials. L'endoteli és una barrera parcial que permet l'entrada i sortida de molècules, entre les quals les LDL. Les LDL travessen l'endoteli per un procés que no està mitjançat per receptor, que es veu afavorit en els punts de bifurcació i àrees de curvatura de les artèries. Alguns factors de risc, com la hipertensió o la hipercolesterolèmia, afavoreixen la penetració i la retenció de les LDL a l'íntima. Les LDL interaccionen amb els proteoglicans i glicosaminoglicans presents a l'íntima, la qual cosa n'afavoreix la retenció i els processos de modificació proteolítics i oxidatius (Hurt-Camejo *et al.*, 1992). En l'oxidació de les LDL intervenen en un primer moment les cèl·lules endotelials i posteriorment les CML i els macròfags. Diversos sistemes enzimàtics, com la mieloperoxidasa i les lipooxigenases, molt actius en els macròfags, s'han implicat en aquest procés (Daugherty *et al.*, 1994; Ylä-Herttuala *et al.*, 1991*a*). L'oxidació de les LDL afecta tant els àcids grassos, que poden arribar a fragmentar-se i a generar grups aldehids i cetones, com les apoproteïnes. Els

intermediaris altament reactius que es generen en el procés d'oxidació s'uneixen covalentment amb l'apoB, apoproteïna majoritària de les LDL, en modifiquen la càrrega global i generen nous epítops. Aquestes LDL modificades no són reconegudes pel receptor de les LDL natives sinó pels receptors *scavenger* de monòcits i CML. L'acumulació massiva de LDLox en aquestes cèl·lules les converteix en cèl·lules escumoses (figura 1). Quan l'acumulació de cèl·lules escumoses en l'íntima és important, la lesió es fa visible i es denomina estria grassa. L'estria grassa correspon a la lesió tipus II en la classificació acceptada per l'American Heart Association que agrupa les lesions ateroscleròtiques en vuit fases o estadis.

La importància de l'oxidació de les LDL en l'aterogènesi s'ha comprovat en diversos models animals hiperlipidèmics en els quals el tractament amb probucol, un potent antioxidant, disminueix el desenvolupament de les lesions ateroscleròtiques (Sasahara *et al.*, 1994). En el procés d'oxidació de les LDL es generen substàncies com la lisofosfatidilcolina amb activitat quimioatraient per a monòcits i CML. A més, les LDLox indueixen en aquestes cèl·lules i en les cèl·lules endotelials l'expressió de la proteïna 1 quimiotàctica de monòcits (MCP-1) (Ylä-Herttuala *et al.*, 1991*b*). L'oxidació de les LDL produeix també substàncies citotòxiques que agreugen la lesió endotelial i en estadis avançats poden provocar la mort de les CML i dels monòcits.

DISFUNCIÓ ENDOTELIAL

El terme disfunció endotelial fa referència a qualsevol alteració de la fisiologia de l'endoteli que produeixi una descompensació de les funcions reguladores que aquest realitza. Aquestes funcions s'exerceixen a través d'una estricta regulació de factors que en alguns casos operen antagònicament. Així, l'endoteli regula el to vascular mitjançant la producció de molècules vasodilatadores com l'òxid nítric (NO) i la prostaciclina (PGI_2) i substàncies vasoconstrictores com l'endotelina i l'angiotensina II (Moncada i Vane, 1979; Nathan i Xie, 1994*ab*). L'endoteli també expressa proteïnes de membrana que actuen com molècules d'adhesió per a receptors específics de monòcits i limfòcits T. Aquestes molècules són selectines (E-selectina, P-selectina), denominades així per la seva similitud estructural a les lectines, i proteïnes que pertanyen a la superfamília de les immunoglobulines com la molècula 1 d'adhesió vascular (VCAM-1) i les molècules 1 i 2 d'adhesió intercel·lular (ICAM-1 i –2).

Una disfunció endotelial pot produir un augment de la permeabilitat, la qual cosa facilita l'acumulació de LDL a l'íntima; una sobreproducció de les molècules d'adhesió i substàncies quimioatraients, la qual cosa facilita la unió i migració de monòcits; una pertorbació del balanç entre els agents vasoactius o entre les seves funcions pro i antitrombogèniques, amb el consegüent increment de l'adhesió de plaquetes. Són múltiples els factors que poden provocar una disfunció endotelial; els més estudiats inclouen substàncies immunoreguladores com el factor necrosant de tumors (TNF) i la interleuquina-1 (IL-1); toxines bacterianes com el lipopolisacàrid i sobretot el colesterol i les LDLox.

En cultius de cèl·lules endotelials les LDLox produeixen una disminució dels nivells de RNA missatger i de proteïna de l'òxid nítric sintasa endotelial (eNOS), enzim que regula la síntesi de NO per l'endoteli (Liao *et al.*, 1995) (figura 1). Recentment, s'ha observat que les LDL natives, com ho són majoritàriament les circulants, en concentracions aterogèniques també exerceixen aquest efecte (Vidal *et al.*, 1998) (figura 2). El NO alliberat per l'endoteli no només és important per mantenir el to arterial sinó que

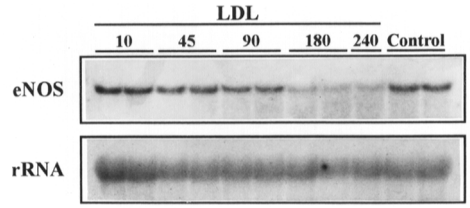

FIGURA 2. Efecte de concentracions creixents de LDL natives (mg/dl) sobre els nivells d'expressió de NO sintasa en cèl·lules endotelials en cultiu. L'RNA es va analitzar mitjançant Northern *blot* utilitzant com a sonda un fragment de DNA corresponent al gen de l'enzim NO sintasa. En la part inferior es mostra el resultat d'hibridar amb un fragment de DNA corresponent a l'RNA ribosomal 28 S (RNAr) utilitzat com a control. Reimpresa de Vidal *et al.*, 1998.

també evita la proliferació de les CML, disminueix l'adhesió de monòcits i l'agregació de plaquetes, i preserva de l'oxidació a les LDL (Nathan i Xie, 1994*b*). Per tant, la disminució de l'alliberament de NO potencia el dany endotelial i facilita la proliferació de les CML induïda per mitògens.

En cèl·lules endotelials en cultiu les LDLox també indueixen l'expressió de RNAm que codifica molècules d'adhesió com VCAM-1, ICAM-1 i les selectines E i P (Vora *et al.*, 1994). La inducció de molècules d'adhesió també s'ha observat *in vivo* a l'endoteli dels vasos d'animals sotmesos a dietes riques en colesterol (Li *et al.*, 1993; Smalley *et al.*, 1996). El poder inductor de les LDLox sobre l'expressió de molècules d'adhesió sembla lligat a la lisofosfatidilcolina, molt abundant en les LDLox (Kume *et al.*, 1992).

ACUMULACIÓ DE MONÒCITS I LIMFÒCITS

A causa del caràcter de resposta inflamatòria-fibroproliferativa crònica del procés ateroscleròtic, els monòcits i limfòcits T tenen un paper clau tant en la seva gènesi com en la progressió de les lesions.

Adhesió i migració de monòcits

Probablement el primer esdeveniment cel·lular detectable morfològicament en l'aterogènesi sigui l'adhesió focal de monòcits circulants a l'endoteli i la seva migració a l'íntima. L'augment de la unió de monòcits a l'endoteli, que s'observa en les lesions ateroscleròtiques, és degut a un increment de l'expressió de les molècules d'adhesió mencionades anteriorment que són induïdes per agents proaterogènics. Els monòcits s'adhereixen a l'endoteli i penetren a l'íntima, atrets per les LDLox i altres substàncies quimiotàctiques sintetitzades per l'endoteli activat, com l'MCP-1.

Pel que fa a l'adhesió dels monòcits a la paret, s'ha proposat un model segons el qual una primera interacció làbil entre el monòcit i l'endoteli es produiria a través de les selectines. A l'endoteli activat la sobreexpressió de molècules d'adhesió com VCAM-1 i ICAM-1 permetria la unió més estable dels monòcits a través de receptors específics. Per exemple, VCAM-1 s'uneix específicament a VLA-4 dels monòcits, que és un receptor pertanyent a la subfamília b1 de les integrines (Elices *et al.*, 1990). Posteriorment, el monòcit travessa l'endoteli a través dels espais intercel·lulars on participen altres proteïnes especialitzades com la PECAM-1.

Activació de monòcits a macròfags

L'activació a l'íntima dels monòcits a macròfags és estimulada per les LDLox i diferents molècules produïdes pels limfòcits T, les cèl·lules endotelials i les CML. Els limfòcits T produeixen interferó gamma (INF-γ) i TNF-α, que activen els monòcits, i factors estimuladors de la formació de colònies com el GM-CSF, que estabilitzen els macròfags i n'estimulen la proliferació (Ross,

1990). El TNF-α i els factors estimulants de la formació de colònies també són produïts per les cèl·lules endotelials i les CML. Els macròfags activats es divideixen i s'acumulen a l'íntima on contribueixen a oxidar les LDL. Les lesions ateroscleròtiques on es produeix major acumulació de macròfags i limfòcits T són les associades al trasplantament cardíac.

Captació de LDL modificades: receptors *scavenger*

Els macròfags posseeixen la capacitat de fagocitar i d'eliminar substàncies nocives, particularment LDL modificades. Els macròfags capten grans quantitats de LDLox i acumulen en el citoplasma el colesterol en forma esterificada. La captació d'aquestes LDL modificades es produeix mitjançant receptors *scavenger*. A diferència del receptor normal de les LDL, els receptors *scavenger* no estan sotmesos a regulació, de manera que els macròfags acumulen grans quantitats de colesterol i es converteixen en cèl·lules escumoses. Els receptors *scavenger* millor caracteritzats són els tipus I i II de la classe A, que han estat clonats en diferents models animals i en humans (Freeman, 1994). Aquests receptors funcionen com proteïnes de membrana homotrimèriques. Cada monòmer posseeix sis dominis estructurals ben definits: I, extrem N-terminal citoplasmàtic; II, transmembrana; III, espaiador; IV, estructura d'hèlice α; V, estructura similar al col·lagen (*col·lagen-like*), i VI, extrem C-terminal. Mitjançant estudis de mutagènesi dirigida s'ha pogut establir que la regió *col·lagen-like*, que posseeix una elevada càrrega positiva, constitueix la regió d'unió a les LDLox.

Les CML també capten LDL modificades que contribueixen a la progressió de les lesions ateroscleròtiques (Llorente *et al.*, 1998). En la figura 3 es mostra la captació per CML de LDL modificades per agregació.

Interacció dels macròfags amb altres elements cel·lulars

En les lesions avançades destaca el paper dels macròfags com a font de factors de creixement, citoquines i altres substàncies que actuen com a factors quimioatraients i estimulen la proliferació de les CML. En parti-

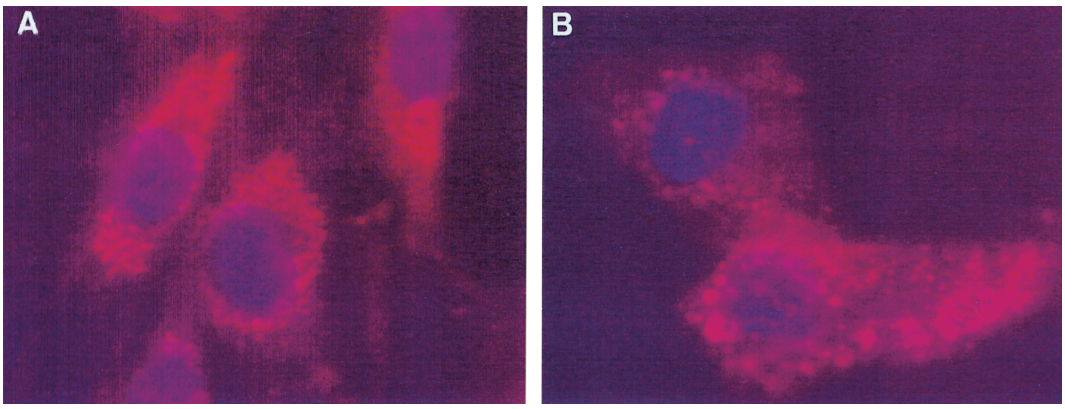

FIGURA 3. Captació de LDL nativa (A) i LDL agregada (B), marcades amb 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethyllindocarbocyanine (diI), per CML en cultiu. Reimpresa de Llorente-Cortés *et al.*, 1998.

cular destaca el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF), la IL-I i el TNF-α que indueixen l'expressió secundària de PDGF-AA en les CML, la qual cosa n'amplifica la proliferació. També produeixen el factor de creixement transformant beta (TGF-β), que és un potent inductor de la síntesi i secreció de teixit connectiu en les CML (Ross, 1990).

Als macròfags i limfòcits T se'ls atribueix un paper actiu en els processos que contribueixen a la ruptura de les plaques ateroscleròtiques. Les plaques, de localització normalment excèntrica, són més vulnerables en les àrees frontissa o zones d'unió a la paret sana. En aquestes àrees hi ha molts macròfags i limfòcits T. Aquestes cèl·lules debiliten la càpsula fibrosa de les plaques perquè secreten factors que inhibeixen la síntesi de les proteïnes de matriu, com l'INF-γ produït pels limfòcits T, i enzims que degraden activament el teixit connectiu, com les metaloproteïnases (col·lagenasa intersticial, gelatinases, estromelisina) produïdes pels macròfags (Shah *et al.*, 1995).

ACTIVACIÓ PLAQUETÀRIA I COMPLICACIÓ TROMBÒTICA DE LA LESIÓ

La trombosi mural en les zones que presenten plaques fissurades és un important mecanisme en la progressió de l'aterosclerosi fins i tot en absència de símptomes clínics. En les zones de lesió vascular, l'exposició al flux sanguini del col·lagen, constituent de la paret arterial; la trombina, generada per l'activació de la cascada de la coagulació, i l'epinefrina circulant, actuen com a potents activadors plaquetaris. Una altra via d'activació de l'agregació plaquetària està mitjançada per adenosina difosfat (ADP), que és alliberada per hemolització d'eritròcits en les àrees lesionades (Cristalli i Mills, 1993). Aquests agonistes de la plaqueta estimulen la descàrrega de calci i la contracció de la plaqueta amb la conseqüent alliberació del seu contingut granular. L'alliberament d'ADP i serotonina per part de la plaqueta produeix l'estimulació de les plaquetes adjacents i desencadena l'agregació plaquetària i la conseqüent formació de trombe.

Qualsevol dels mecanismes d'activació plaquetària indueix la subsegüent exposició de receptors plaquetaris, com la glicoproteïna (GP) IIb-IIIa i la GPIb (Kieffer i Phillips, 1990).

Glicoproteïna IIb-IIIa

El complex consta d'una molècula de GP IIb (GPIIbβ i GPIIbα unides per ponts disulfur) i una de GP IIIa. La GP IIb-IIIa és un heterodímer dependent de calci, que s'associa de forma no covalent (Fitzgerald i Phillips, 1985). En plaquetes activades, el GP IIb-IIIa és un receptor per fibrinogen, fibronectina, FvW, vitronectina i trombospondina (Plow i Ginsberg, 1991). El receptor s'uneix a petites seqüències peptídiques (Arg-Gly-Asp, RGD) presents a les proteïnes adhesives (Ruoslahti i Pierschbacher, 1987). El fibrinogen conté dues seqüències RGD a la cadena α, una localitzada en la zona N-terminal (residus 95-97) i la segona prop de l'extrem C-terminal (residus 572-574). El fibrinogen té un tercer lloc de reconeixement que correspon a una seqüència de dotze aminoàcids localitzada a l'extrem C-terminal de la cadena γ de la molècula. Aquest dodecapèptid és específic del fibrinogen i no conté la seqüència RGD.

Activació i exposició del receptor GP IIb-IIIa

En la superfície de les plaquetes no activades, GP IIb i GP IIIa formen un heterodí-

mer que és incapaç d'unir fibrinogen plasmàtic (Plow i Ginsberg, 1991; Smyth *et al.*, 1993). L'activitat receptora l'adquireix com a conseqüència de l'activació plaquetària i comporta canvis conformacionals en la disposició relativa dels dominis extracel·lulars de GP IIb i GP IIIa (Calvete *et al.*, 1994*a*). El fet que aquest receptor no pugui ser activat quan s'expressa en tipus cel·lulars que no siguin megacariòcit o plaquetes indica que l'expressió del receptor està regulada per elements cel·lulars específics, ja sigui en l'entorn lipídic (Smyth *et al.*, 1992) o factors intracel·lulars (O'Toole *et al.*, 1991). La unió del fibrinogen plasmàtic al receptor activat provoca canvis conformacionals tant en el receptor com en el lligant. La unió de complexos GP IIb-IIIa/fibrinogen al citoesquelet plaquetari no solament proporciona l'anclatge necessari per a la retracció del coàgul, sinó que regula la reorganització del propi citoesquelet i la formació d'un complex macromolecular d'enzims i proteïnes implicades en els mecanismes de transducció de senyal (Calvete *et al.*, 1994*b*; Fox *et al.*, 1993). A més del fibrinogen, a la GP IIb-IIIa s'uneixen altres macromolècules adhesives com el Factor von Willebrand (FvW) (Ruggeri *et al.*, 1983) i la fibronectina, formant ponts d'unió amb altres plaquetes i afavorint-ne el procés d'agregació plaquetària.

Glicoproteïna Ib

La GP Ib és necessària per a la normal adhesió de les plaquetes al subendoteli arterial a alta velocitat de cisallament (Sakariassen *et al.*, 1986), presumiblement a través de la seva interacció amb el FvW (Turitto i Baumgartner, 1987). La glicoproteïna Ib (GP Ib o GP Ib-IX) és la principal responsable de la càrrega negativa de la superfície de les plaquetes, per causa del seu alt contingut d'àcid siàlic i carbohidrats. Consta de dues subunitats unides per ponts disulfur, GP Ibα (143 kDa) i GPIbβ (22 kDa), que s'uneixen de manera no covalent a GP IX i en formen un complex heterodímer 1:1. La GPIbβ i la GP IX són glicoproteïnes transmembrana i formen el domini globular de mida més gran. La part elongada del receptor correspon a la subunitat GP Ibα. Aquest complex glicoproteic s'uneix al FvW immobilitzat exposat al subendoteli vascular i inicia l'adhesió de plaquetes. El domini d'unió a FvW se situa en els aminoàcids 251-279 de la subunitat GP Ibα (Vicente *et al.*, 1990). El domini citoplasmàtic del receptor té com a principal funció estabilitzar la membrana i mantenir la forma de la plaqueta mitjançant la unió de la membrana plasmàtica als filaments d'actina intracel·lular (Fox *et al.*, 1988). Diversos estudis han suggerit un doble paper d'aquesta glicoproteïna, és a dir, actuaria tant en l'adhesió com en les interaccions plaqueta-plaqueta que condueixen a la formació del trombe (Sakariassen *et al.*, 1979; Badimon *et al.*, 1987; Badimon *et al.*, 1988*ab*; Badimon *et al.*, 1989*ab*).

El coneixement actual permet afirmar que en condicions d'alta velocitat de cisallament, la GP Ib i la GP IIb-IIIa estan involucrades en els processos d'adhesió plaquetària, mentre que la GP IIb-IIIa intervé predominantment en la interacció plaqueta-plaqueta. Essencialment, el procés inicial està mitjançat pel FvW circulant i per l'alliberat per les plaquetes activades i les cèl·lules de l'endoteli. A més, en els petits vasos sanguinis i en aquells de major diàmetre parcialment closos per plaques en els quals la velocitat de cisallament és superior, és necessària la presència de FvW perquè es produeixi l'adhesió de les plaquetes (Sadler, 1991). D'aquesta manera l'acumulació local de plaquetes activades forma una massa expansiva que va augmentant físicament de mida amb l'arribada de plaquetes provinents del flux circulatori. Aquests fe-

nòmens que hemostàticament són beneficiosos, resulten lesius o fins i tot fatals quan s'assenten en vasos amb plaques ateroscleròtiques en desenvolupament (Fuster *et al.*, 1992).

ACUMULACIÓ DE CÈL·LULES MUSCULARS LLISES A L'ÍNTIMA

Les CML són el component cel·lular majoritari de les lesions ateroscleròtiques joves i de les plaques reestenosades en produir un dany en la paret com succeeix en les tècniques de revascularització. En les lesions ateroscleròtiques les CML es troben desorganitzades i han perdut la capacitat de regular el to vascular. Les CML de la capa mitjana són activades per molècules secretades per la resta de cèl·lules presents en les lesions ateroscleròtiques (figura 4). Les CML experimenten una transformació fenotípica que n'afecta la morfologia i sobretot la funció. CML de fenotip contràctil no proliferatiu es transformen en cèl·lules que proliferen activament, que migren atretes per agents quimiotàctics i que produeixen proteïnes de matriu extracel·lular (col·lagen tipus I i II, elastina, proteoglicans). Aquesta transformació activa l'expressió de gens que codifiquen receptors de membrana per factors de creixement com el PDGF. A més, s'estimula la producció de factors de creixement (PDGF, bFGF, IGF-I, etc.) i citoquines (TGFβ, IL-1, etc.), a través dels quals les CML modulen la seva pròpia activitat i la d'altres cèl·lules que intervenen en l'aterogènesi.

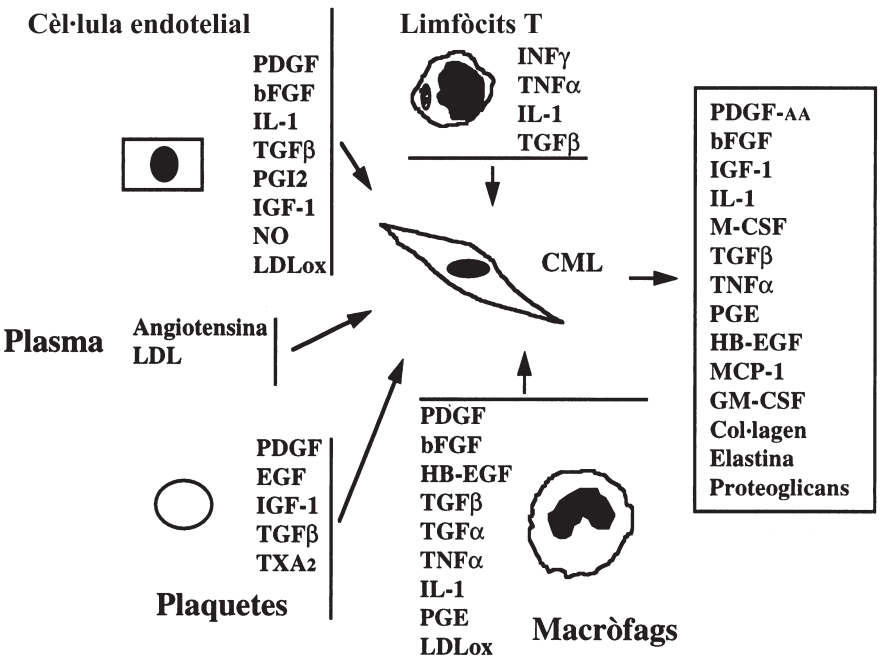

FIGURA 4. Interacció de molècules que activen les CML en l'aterosclerosi. S'indiquen els diferents factors de creixement, citoquines i macromolècules alliberades per les cèl·lules endotelials, plaquetes, CML, limfòcits T i macròfags en les lesions ateroscleròtiques.

L'estabilitat de les plaques depèn del gruix i composició de la seva coberta fibrosa, formada fonamentalment per proteïnes de matriu extracel·lular sintetitzada per les CML. La ruptura espontània d'una placa ateroscleròtica o la disrupció provocada per una tècnica de revascularització com l'angioplàstia ocasionen la pèrdua dels elements antitrombòtics de l'endoteli (NO, PGI_2, t-PA, etc.) i l'exposició d'estructures de la paret que produeixen la formació de trombes. Les plaquetes, en agregar-se, alliberen el contingut dels seus grànuls rics en mitògens, com PDGF i l'EGF, que indueixen la migració i proliferació de les CML. Utilitzant models animals s'ha establert que en els primers dies es produeix hipertròfia i proliferació de les CML a la mitjana (Ross, 1990; Fuster *et al.*, 1995). Posteriorment les CML migren a l'íntima on proliferen activament. En la figura 5 s'observa l'engrossiment de l'íntima d'una artèria porcina, degut a la proliferació de CML, als vint-i-vuit dies de practicar una angioplàstia experimental amb baló.

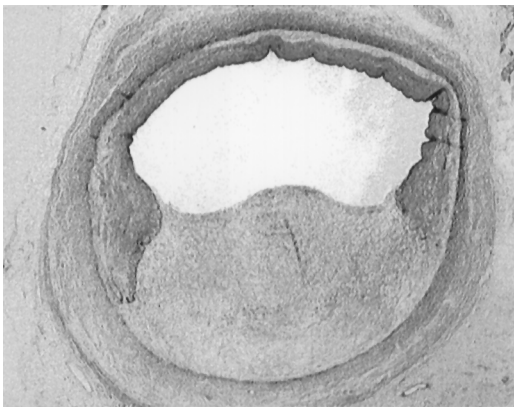

FIGURA 5. Microscòpia òptica d'una artèria porcina vint-i-vuit dies després de la inducció de lesió mitjançant dilatació amb baló. S'observa una gran quantitat de CML que han proliferat a l'íntima.

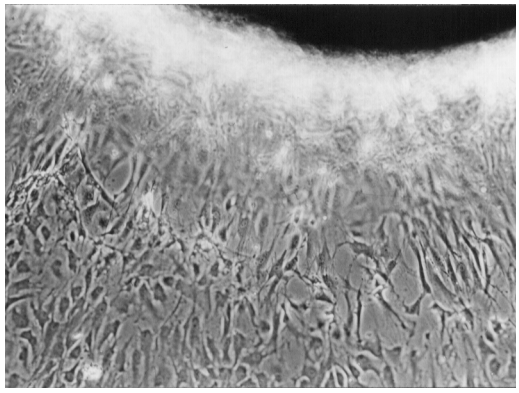

FIGURA 6. Migració de CML en cultiu a partir d'un fragment d'artèria porcina. Després de vint dies aprox. d'exposició dels fragments d'artèria porcina (explants) en medi de cultiu, amb 20 % de sèrum de fetus de vedell, les CML migren fora de l'explant i proliferen activament fins a constituir una monocapa.

Activació de les CML en la mitjana

En aquesta fase intervenen factors de creixement que alliberen l'endoteli i les CML, com el factor de creixement de fibroblasts (bFGF), a més del PDGF i la trombina generats per la trombosi. El bFGF sembla que té el paper més rellevant en la proliferació de les CML en la mitjana que és prèvia a la seva migració i proliferació a l'íntima. Quan s'indueix l'expressió de bFGF en les artèries, mitjançant tècniques de transferència gènica, es produeix hiperplàsia de l'íntima, i el bloqueig del bFGF amb anticossos específics inhibeix la formació de neoíntima (Nabel *et al.*, 1993*a*; Lindner i Reidy, 1991).

Migració de les CML

La migració de les CML és controlada de manera redundant per un conjunt de molècules que inclou el TGF-β, l'angiotensina II, la trombina i sobretot el PDGF-BB. En cultius cel·lulars el PDGF és l'inductor més po-

tent que es coneix de la migració i proliferació de les CML. El PDGF és produït per les plaquetes, les cèl·lules endotelials i els macròfags (Jackson *et al.*, 1993). El PDGF indueix l'expressió de proteases que degraden la matriu extracel·lular com l'activador del plasminogen, plasmina, MMP-2 i MMP-9. L'activitat d'aquests enzims, l'expressió dels quals es troba incrementada en les lesions ateroscleròtiques, facilita la migració de les CML. En la figura 6 s'observa com les CML han migrat, a partir d'un fragment d'artèria coronària porcina incubat durant vint dies en medi de cultiu amb sèrum, i han proliferat fins a constituir una monocapa.

Proliferació de les CML a l'íntima i síntesi de matriu extracel·lular

Estudis realitzats en animals trombocitopènics o tractats amb anticossos antiPDGF suggereixen que aquest factor de creixement és clau en la proliferació de les CML a l'íntima. La sobreexpressió de PDGF en la paret arterial, induïda *in vivo* amb vectors plasmídics, va produir l'engrossiment extraordinari de l'íntima (Nabel *et al.*, 1993*b*). A més, anticossos antiPDGF bloquegen la formació de neoíntima en el model d'angioplàstia en aorta de rata (Ferns *et al.*, 1991).

La pèrdua de l'endoteli produïda per una lesió vascular fa que persisteixi durant diverses setmanes la interacció de plaquetes amb la paret, la qual cosa produeix una alliberació permanent de PDGF. Amb la pèrdua de l'endoteli desapareix la inhibició que en condicions normals exerceix el NO sobre la proliferació de les CML. A més, la presència de LDLox en les àrees lesionades potencia la proliferació de les CML. Per altra banda, les CML activades secreten altres factors com IL-1, TNF-α, TGF-β, que poden estimular les CML de forma autocrina, és a dir, no actuen directament com a mitògens sinó que indueixen la síntesi i secreció d'altres factors com el PDGF-AA (Ross, 1990). A més del PDGF, altres agents com la trombina i l'angiotensina II promouen la proliferació de les CML. La trombina, que es genera en grans quantitats en els focus de trombosi (<130 nmol/L), actua com a agent hipertròfic i indueix la proliferació de les CML. A més, en les plaques ateroscleròtiques s'ha detectat un augment del nombre de receptors per la trombina en CML i macròfags, la qual cosa en potencia la capacitat de resposta (Nelken *et al.*, 1992).

La producció de matriu extracel·lular per les CML és estimulada especialment pel TGF-β. La sobreexpressió d'aquesta citoquina en la paret vascular, mitjançant la transferència de plàsmits d'expressió encapsulats en liposomes, produeix engrossiment de l'íntima per l'acumulació massiva de col·lagen secretat per les CML (Nabel *et al.*, 1993*c*). Altres factors com la trombina i l'angiotensina II, que activen la producció de PAI-1, faciliten l'acumulació de matriu per la plasmina (Noda *et al.*, 1993).

INDUCCIÓ DE GENS LLIGATS A LA PROLIFERACIÓ DE LES CÈL·LULES MUSCULARS LLISES

La proliferació de les CML no comença fins transcorreguts d'un a dos dies des de l'alliberament de mitògens. Tanmateix, els mecanismes moleculars que activen les CML tenen lloc de forma immediata. Els mitògens indueixen l'expressió de gens que s'expressen dèbilment o no s'expressen en les CML en estat quiescent (no proliferatiu). En primer lloc (transició de fase G0/G1) s'indueix l'expressió dels anomenats «gens de resposta immediata», que inclouen protooncògens com *c-fos*, *c-jun* i *c-myc*; la *ciclooxigenasa-2*, que és un gen marcador de resposta inflamatòria, i el *JE* o *MCP-1*, que

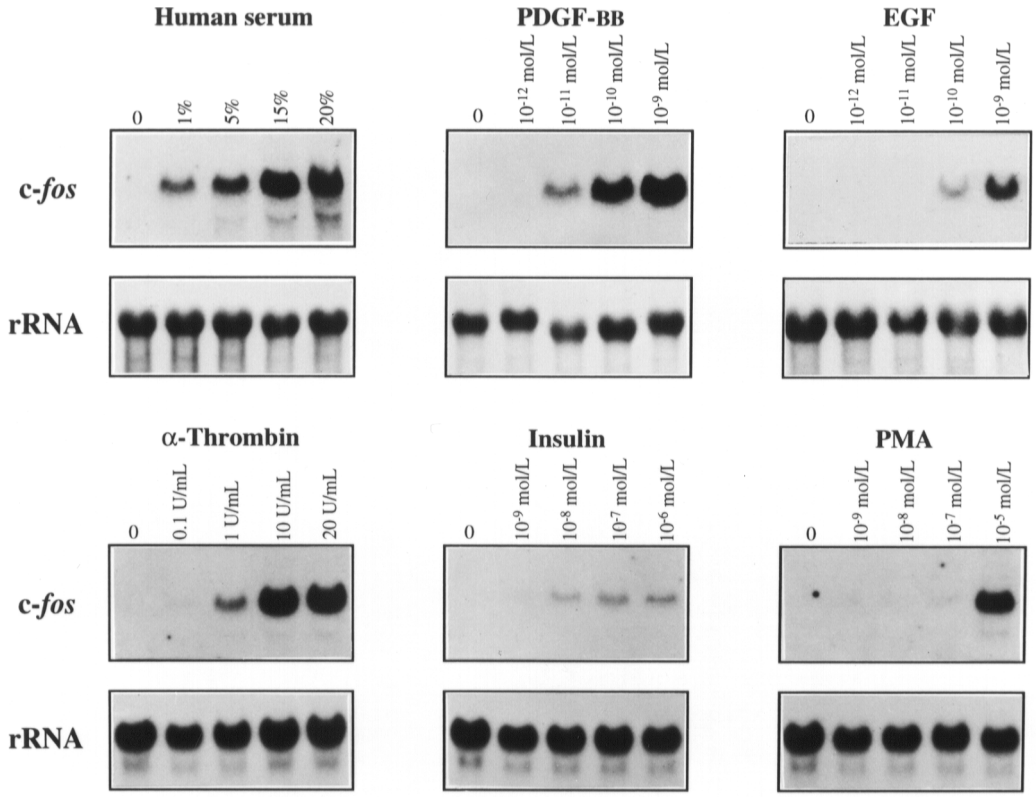

FIGURA 7. Inducció de l'expressió de *c-fos* en CML humanes en cultiu. S'indica l'efecte sobre l'expressió de *c-fos* de concentracions creixents de sèrum humà, PDGF-BB, EGF, α-trombina, insulina i 4-β-Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) als trenta minuts d'inducció. L'RNA es va analitzar mitjançant Northern *blot* utilitzant com a sonda un fragment de DNA de *c-fos* marcat radioactivament. En la part inferior es mostra el resultat d'hibridar amb un fragment de DNA corresponent a l'RNA ribosomal 28 S (RNAr) utilitzat com a control. Reimpresa de Martínez-González *et al.*, 1997.

actua com a substància quimioatraient per monòcits. L'expressió màxima d'aquests gens s'aconsegueix entre les dues i les sis hores posteriors a la inducció tant en cèl·lules en cultiu com en experiments *in vivo* en el model porcí (Campan *et al.*, 1992; Badimon *et al.*, 1995). En el cas de *c-fos* l'expressió és més transitòria, aconsegueix un màxim entre trenta i quaranta-cinc minuts, i després de dues hores els seus nivells descendeixen a valors basals. En la figura 7 es mostra la inducció de *c-fos* als trenta minuts d'estimular CML humanes en cultiu amb concentracions creixents de sèrum humà i altres mitògens. S'ha demostrat que existeix una relació quantitativa entre els nivells d'expressió de mRNA de *c-fos* induïts per diferents mitògens i el grau de proliferació que provoquen en CML humanes en cultiu (Martínez-González *et al.*, 1997). A més, *in vivo* s'ha observat proporcionalitat entre el grau de lesió produïda mitjançant angioplàstia en la paret vascular, el nivell d'inducció de *c-fos* i el desenvolupament posterior de reestenosi (Indolfi *et al.*, 1995). A mesura que les CML progressen en el cicle cel·lular s'indueixen altres gens com l'antigen nuclear de cèl·lules proliferants (PCNA), que és una apopro-

teïna que actua com a cofactor del DNA polimerasa delta, enzim necessari per a la síntesi de DNA, i *c-myb*, un altre protooncogen homòleg al gen transformant del virus de la mieloblastosi aviària.

La major part de factors de creixement actuen sobre la CML a través de receptors específics pertanyents a la família de receptors tirosina quinasa (Van deer Geer i Hunter, 1994). La connexió d'aquests receptors amb el nucli es realitza a través de mecanismes de transducció de senyal en els quals participen múltiples proteïnes que s'activen en cascada, la qual cosa amplifica el senyal.

BLOQUEIG DE LA PROLIFERACIÓ DE LES CML MITJANÇANT TÈCNIQUES DE DNA RECOMBINANT

El coneixement dels mecanismes moleculars que controlen l'inici i la progressió de les lesions ateroscleròtiques ha permès dissenyar estratègies per inhibir-ne el desenvolupament, dirigides sobretot a bloquejar la proliferació de les CML que es produeix en els processos de reestenosi postangioplàstia (Ohno *et al.*, 1994).

Una de les primeres estratègies desenvolupades fou utilitzar oligonucleòtids antisentit dirigits contra molècules que regulen la proliferació de les CML. En aquest camp ha estat pioner el grup de Simons que aconseguiren bloquejar *in vivo* la reestenosi postangioplàstia en rata quan aplicaren, sobre el vas dilatat pel baló, un gel que contenia un oligonucleòtid anti-*c-myb* (Simons *et al.*, 1992). Posteriorment, altres autors han obtingut resultats similars utilitzant oligonucleòtids dirigits contra el protooncongen *c-myc*, o contra el missatge d'altres proteïnes implicades en el cicle cel·lular com la ciclina cdk 2, o PCNA (Shi *et al.*, 1994; Morishita *et al.*, 1994).

Recentment s'han desenvolupat diferents tècniques per introduir i expressar gens en cèl·lules en cultiu o directament en la paret vascular. Els mètodes més comuns utilitzen vectors virals com: retrovirus i adenovirus; adenovirus conjugats amb sistemes d'alliberació a través de receptors, i sistemes no vírics com liposomes catiònics, injecció de DNA plasmídic, etc. (Nabel, 1995).

Els vectors retrovirals s'integren de manera estable en el DNA cromosòmic i per tant permeten l'expressió permanent del gen que incorporen. Tenen l'inconvenient que poden produir mutagènesi segons on se'n produeixi la inserció. S'han utilitzat sobretot *ex vivo*, en cèl·lules que s'extreuen, per exemple cèl·lules endotelials, i són transfectades *in vitro*. Posteriorment, es procedeix a la selecció de les cèl·lules que expressen el gen en qüestió i s'implanten de nou. L'aplicació *in vivo* d'aquest sistema presenta diversos inconvenients, ja que requereix la proliferació de les cèl·lules per aconseguir una integració del provirus al seu genoma; a més, les partícules retrovirals són molt làbils.

Alguns dels problemes que plantegen els retrovirus s'han resolt amb els adenovirus. Aquests vectors presenten una major resistència a la lisi, ja que les partícules víriques escapen a la degradació pels lisosomes gràcies a que posseeixen una càpsida proteica. El genoma de l'adenovirus no s'integra en el de la cèl·lula i es replica uns quants milers de vegades en cada cicle. Presenten l'inconvenient que la seva expressió acostuma a ser transitòria, unes tres setmanes, i poden provocar una resposta immune. Quan s'han utilitzat per dirigir gens a la paret vascular han causat inflamació i una acumulació de limfòcits T (Ohno *et al.*, 1994). Experimentalment aquest sistema s'ha utilitzat amb èxit per transferir la molècula VCAM-1 soluble (sVAM-1) a empelts venosos. Tanmateix, no se n'ha determinat l'efecte sobre el desenvolupament de lesions, que es basa en la com-

petència entre la VCAM-1 soluble i la VCAM-1 present a la membrana de cèl·lules endotelials i CML per la unió a monòcits circulants (Chen *et al.*, 1994). Els vectors adenovírics s'han modificat mitjançant la conjugació amb lligants que s'uneixen a receptors cel·lulars, la qual cosa permet l'alliberació de gens mediatitzada per receptor.

Un altre sistema és el dels liposomes catiònics. La càrrega positiva d'aquestes partícules fa que interaccionin ràpidament amb molècules de càrrega negativa com el DNA i formin espontàniament vesícules lipídiques. El DNA plasmídic, que conté el gen d'interès sota el control d'un promotor potent, queda encapsulat en els liposomes que en fusionar-se amb les membranes de les cèl·lules alliberen el seu contingut al citoplasma. Aquest sistema ha estat utilitzat per demostrar la implicació de diferents factors de creixement en la hiperplàsia de l'íntima (Nabel *et al.*, 1993*abc*). També ha estat perfeccionat mitjançant conjugació amb el virus hemaglutinant del Japó. Utilitzant aquest sistema s'ha inhibit el desenvolupament de la neoíntima *in vivo* en artèries caròtides de rates en les quals es va alliberar un plasmidi que expressava l'enzim eNOS després de produir denudació endotelial (Von deer Leyen *et al.*, 1995).

IMPLICACIÓ CLÍNICA I PERSPECTIVES FUTURES

En els processos ateroscleròtics crònics, la formació de trombes arterials com a conseqüència de la ruptura de plaques d'ateroma és un important factor desencadenant d'esdeveniments aguts en la progressió de la malaltia coronària. Durant la ruptura de la placa, a més de la deposició plaquetària en l'àrea lesionada, la desendotelització del vas i l'exposició del factor tisular activa el mecanisme de la coagulació. L'activació de la cascada de la coagulació condueix a la generació de trombina, que és un potent activador de les plaquetes i que catalitza la formació i polimerització de fibrina. La fibrina és essencial en l'estabilització del trombe i en la seva resistència a elevades pressions intravasculars i forces de cisallament. Aquests conceptes bàsics tenen un paper cabdal en la pràctica clínica dins del context de les síndromes coronàries agudes, on la ruptura de la placa exposa components que activen les plaquetes i el sistema de coagulació, la qual cosa produeix la formació d'un trombe oclusiu compost per plaquetes i fibrina (Badimon *et al.*, 1998).

La investigació des de la perspectiva molecular dels mecanismes d'activació de la plaqueta, transducció de senyal, unió a receptors, activació i funció de zimògens, reconeixement de substrats i processos d'adhesió és una arma bàsica per abordar de manera efectiva els problemes associats a la malaltia arterial coronària. Els receptors originalment només relacionats amb funcions d'anclatge són també importants factors en la transducció d'informació des del compartiment extracel·lular a l'interior de la cèl·lula i el seu paper és essencial en el control de la funció, forma, proliferació i diferenciació cel·lular. Tanmateix, la investigació de factors, pel que fa a agonistes o a canvis en la paret arterial lesionada, directa o indirectament responsables de la cronificació d'un procés trombòtic, permetrà un millor abordatge terapèutic i una prevenció més eficaç. Per altra banda, la tecnologia de DNA recombinant s'ha aplicat per definir el paper de determinats agents en la patogènesi de l'aterosclerosi i en el desenvolupament de productes d'aplicació terapèutica com el t-PA. Tot i que s'han realitzat avanços importants en el desenvolupament de vectors i en l'alliberació *in vivo* de gens, encara s'han de perfeccionar substancialment les tècniques abans de la seva aplicació clínica.

BIBLIOGRAFIA

BADIMON, L.; J. ALFON; T. ROYO; M. BERROZPE; J. MARTÍNEZ-GONZÁLEZ; F. VIDAL; J. H. CHESEBRO; V. FUSTER; J. J. BADIMON (1995). «Cell biology of restenosis post-angioplasty». *Z Kardiol*, núm. 84, pàg. 145-149.

BADIMON, L.; J. J. BADIMON; J. H. CHESEBRO; V. FUSTER (1988*b*). «Inhibition of thrombus formation: blockage of adhesive glycoprotein mechanisms versus blockage of the cyclooxygenase pathway». *J Am Coll Cardiol*, núm. 11, pàg. 30A.

BADIMON, L.; J. J. BADIMON; V. FUSTER (1998). «Pathogenesis of thrombosis». A: Verstraete, M.; Fuster, V.; Topol, E.J. [*e.d.*]*Cardiovascular Thrombosis: Thrombocardiology and Thromboneurology*, 2a ed. Philadelphia: New York: Lippincott-Raven Publishers, pàg. 23-44.

BADIMON, L.; J. J. BADIMON; V. T. TURITTO; S. VALLABHAJOSULA; V. FUSTER (1988*a*). «Platelet thrombus formation on collagen type I. Influence of blood rheology, von Willebrand Factor and blood coagulation». *Circulation*, núm. 78, pàg. 1431-42.

BADIMON, L.; J. J. BADIMON; V. T. TURITTO; V. FUSTER (1989*a*). «Platelet interaction to vessel wall and collagen. Study in homozygous von Willebrand's disease associated with abnormal collagen aggregation in swine». *Thromb Haemost*, núm. 61, pàg. 57-64.

BADIMON, L.; J. J. BADIMON; V. T. TURITTO; V. FUSTER (1989*b*). «Role of von Willebrand factor in mediating platelet-vessel wall interaction at low shear rate; the importance of perfusion conditions». *Blood*, núm. 73, pàg. 961-7.

BADIMON, L.; J. J. BADIMON; V. T. TURITTO; V. FUSTER (1987). «Platelet deposition in von Willebrand Factor deficient vessel wall». *J Lab Clin Med*, núm. 110, pàg. 634-47.

CALVETE, J. J. (1994*a*). «Clues for understanding the structure and function of a prototypic human integrin: The platelet glycoprotein IIb/IIIa complex». *Thromb Haemost*, núm. 72, pàg. 1-15.

CALVETE, J. J.; K. MANN; W. SCHÄFER; R. FERNÁNDEZ-LAFUENTE; J. M. GUISAN (1994*b*). «Proteolytic of the RGD-binding and non RGD-binding conformers of platelet integrin GPIIb/IIIa. Clues for identification of regions involved in receptor's activation». *Biochem J*, núm. 298, pàg. 1-7.

CAMPAN, M; C. DESGRANGES; A. P. GADEAU; D. MILLET; F. BELLOC (1992). «Cell cycle dependent gene expression in quiescent stimulated and asynchronously cycling arterial smooth muscle cells in culture». *J Cell Physiol*, núm. 150, pàg. 493-500.

CHEN, S. J.; J. M. WILSON; D. W. M. MULLER (1994). «Adenovirus-mediated gene transfer of soluble vascular cell adhesion molecule to porcine interposition vein grafts». *Circulation*, núm. 89, pàg. 1922-1928.

CRISTALLI, G.; D. C. B. MILLS (1993). «Identification of a receptor for ADP on blood platelets by photoaffinity labelling». Biochem J, núm. 291, pàg. 875-881.

DAUGHERTY, A.; J. L. DUNN; D. L. RATERI; J. W. HEINECKE (1994). «Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expresed in human atherosclerotic lesions». *J Clin Invest*, núm. 94, pàg. 437-444.

ELICES, M. J.; L. OSBORN; Y. TAKADA; C. CROUSE; S. LUBOWSKYJ; M. E. HEMLER; R. R. LOBB (1990). «VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at site distinc from the VLA-4/fibronectin binding site». *Cell*, núm. 60, pàg. 577-584.

FERNS, A. A.; E. W. RAINES; K. H. SPRUGEL; A. S. MOTANI; M. A. REIDY; R. ROSS (1991). «Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF». *Science*, núm. 253, pàg. 1129-1132.

FITZGERALD, L. A.; D. R. PHILLIPS (1985). «Calcium regulation of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex». *J Biol Chem*, núm. 260, pàg. 11366-11376.

FOX, J. E. B.; J. K. BOYLES; M. C. BERNDT; P. K. STEFFEN; L. K. ANDERSON (1988). «Identification of a membrane skeleton in platelets». *J Cell Biol*, núm. 106, pàg. 1525-1538.

FOX, J. E. B.; L. LIPFERT; E. A. CLARK; C. C. REYNOLDS; C. D. AUSTIN; J. S. BRUGGE (1993). «On the role of the platelet membrane skeleton in mediating signal transduction. Association of GPIIb-IIIa, pp60c-src, pp62c-yes, and the p21ras GTPase-activating protein with the membrane skeleton». *J Biol Chem*, núm. 268, pàg. 25973-25984.

FREEMAN, M. W. (1994). «Macrophage scavenger receptors». *Curr Opin Lipid*, núm. 5, pàg. 143-148.

FUSTER, V.; E. FALK; J. T. FALLON; L. BADIMON; J. H. CHESEBRO; J. J. BADIMON (1995). «The three processes leading to post PTCA restenosis: dependence on the lesion substrate». *Thromb Haemostasis*, núm. 74, pàg. 552-559.

FUSTER, V.; L. BADIMON; J. J. BADIMON; J. H. CHESEBRO (1992). «The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes». *N Engl J Med*, núm 326, part I: pàg. 242-250, part II: pàg. 310-318.

HURT-CAMEJO, G.; G. CAMEJO; B. ROSENGREN; F. LÓPEZ; C. AHLSTRÖM; G. FAGER; G. BONDJERS (1992). «Effect of arterial proteoglycans and glycosaminoglycans on low density lipprotein oxidation and its uptake by human macrophage and smooth muscle cells». *Arterioscler Thromb*, núm. 12, pàg. 569-583.

INDOLFI, C.; G. ESPOSITO; E. DI LORENZO; A. RAPACCIUOLO; A. FELICIELLO; A. PORCELLINI; V. E. AVVEDIMENTO; M. CONDORELLI; M. CHIARIELLO (1995).

«Smooth muscle cell proliferation is proportional to the degree of balloon injury in a rat model of angioplasty». *Circulation*, núm. 92, pàg. 1230-1235.

JACKSON, C. L.; E. W. RAINES; R. ROSS; M. REIDY (1993). «Role of endogenous PDGF in arterial SMC migration after balloon injury». *Arteriosclerosis*, núm. 13, pàg. 1129-1132.

KIEFFER, N.; D. R. PHILLIPS (1990). «Platelet membrane glycoproteins: Functions in cellular interactions». *Annu Rev Biol*, núm. 6, pàg. 329-357.

KUME, N.; M. CYBULSKY; M. GIMBRONE (1992). «Lysophosphatidyl-choline, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultures human and rabbit arterial endothelial cells». *J Clin Invest*, núm. 90, pàg. 1138-1144.

LI, H.; M. CYBULSKY; M. J. GIMBRONE; P. LIBBY (1993). «An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytoquine-regulated mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium». *Arteriscler Thromb*, núm. 13, pàg. 197-204.

LIAO, J. K.; W. S. SHIN; W. Y. LEE; S. L. CLARK (1995). «Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase». *J Biol Chem*, núm. 270, pàg. 319-324.

LINDNER, V.; M. A. REIDY (1991). «Proliferation of smooth muscle cells after vascular injury is inhibited by an antibody against bFGF». *Proc Natl Acad Sci USA*, núm. 88, pàg. 3739-3743.

LLORENTE, V.; J. MARTÍNEZ-GONZÁLEZ; L. BADIMON (1998). «Esterified cholesterol accumulation induced by aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells is reduced by HMG-CoA reductase inhibitors». *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, en prensa.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J.; M. VIÑALS; F. VIDAL; V. LLORENTE-CORTES; L. BADIMON (1997). «Mevalonate deprivation impairs IGF-I/insulin signaling in human vascualr smooth muscle cells». *Atherosclerosis*, núm. 135, pàg. 213-223.

MONCADA, S.; J. R. VANE (1979). «Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls». *N Engl J Med*, núm. 300, pàg. 1142-1147.

MORISHITA, R.; G. H. GIBBONS; K. E. ELLISON; M. NAKAJIMA; H. VON DEER LEYEN; L. ZHANG; Y. KANEDA; T. OGIHARA; V. DZAU (1994). «Intimal hyperplasia after vascular injury is inhibited by antisense cdk 2 kinase oligonucleotides». *J Clin Invest*, núm. 93, pàg. 1458-1464.

NABEL, E. G. (1995). «Gene therapy for cardiovascular disease». *Circulation*, núm. 91, pàg. 541-548.

NABEL, E. G.; L. SHUM; V. J. POMPILI; Z. Y. YANG; H. SAN; H. B. SHU; S. LIPTAY; L. GOLD; D. GORDON; R. DEYUNCK; G. J. NABEL (1993*c*). «Direct gene transfer of TGF-b1 inthearterial wall stimulates fibrocellular hyperplasia». *Proc Natl Acad Sci USA*, núm. 90, pàg. 10759-10764.

NABEL, E. G.; S. LIPTAY; Z. Y. YANG; S. LIPTAY; H. SAN; D. GORDON; C. C. HANDEUSCHILD; G. J. NABEL (1993*b*). «r-PDGF gene expression in porcine arteries induces intimal hyperplasia in vivo». *J Clin Invest*, núm. 91, pàg. 1822-1829.

NABEL, E. G.; Z. Y. YANG; G. PLAUTZ; R. FOROUGH; X. ZHANG; C. C. HANDEUSCHILD; T. MACIAG; G. J. NABEL (1993*a*). «rFGF gene expression in porcine arteries induces intimal hyperplasia and angiogenesis in vivo». *Nature*, núm. 362, pàg. 844-846.

NATHAN, C.; Q.-W. XIE (1994*a*). «Regulation of biosynthesis of nitric oxide». *J Biol Chem*, núm. 269, pàg. 13725-13728.

NATHAN, C.; Q.-W. XIE (1994*b*). «Nitric oxide synthase: roles, tolls and controls». *Cell*, núm. 78, pàg. 915-918.

NELKEN, N. A.; J. SOILER; J. O'KEEFE; T. K. VU; I. CHARO; S. COUGHLIN (1992). «Thrombin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries». *J Clin Invest*, núm. 90, pàg. 1614-1622.

NODA, H.; S. FUJI; B. SOBEL (1993). «Induction of vascular SMC expression of PAI-1 by thrombin». *Circ Res*, núm. 72, pàg. 36-43.

O'TOOLE, T. E.; D. MANDELMAN; J. FORSYTH; S. J. SHATTIL; E. F. PLOW; M. H. GINSBERG (1991). «Modulation of the affinity of integrin αIIbβ3 (GPIIb-IIIa) by the cytoplasmic domain of aIIb». *Science*, núm. 254, pàg. 845-847.

OHNO, T.; D. GORDON; H. SAN; V. J. POMPILI; M. J. IMPERIALE; G. J. NABEL; E. G. NABEL (1994). «Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury». *Science*, núm. 265, pàg. 781-784.

PLOW, E. F.; M. H. GINSBERG (1991). «The molecular basis of platelet function». A: Hoffman, R.; Benz, E. J. Jr.; Shattil, S. J.; Furie, B., Cohen, H. J. [ed.] *Hematology, Basic Principles and Practice*. New York: Churchill Livingstone; pàg. 1165-1176.

ROSS, R. (1990). «The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s». *Nature*, núm. 362, pàg. 801-808.

RUGGERI, Z. M.; L. DE MARCO; L. GATTO [*et al.*] (1983). «Platelets have more than one binding site for von Willebrand Factor». *J Clin Invest*, núm. 72, pàg. 1-12.

RUOSLAHTI, E.; M. D. PIERSCHBACHER (1987). «New perspectives in cell adhesion : RGD and integrins». *Science*, núm. 238, pàg. 491-497.

SADLER, J. E (1991). «von Willebrand Factor». *J Biol Chem*, núm. 266, pàg. 22777-22780.

SAKARIASSEN, K.; P. A. BOLHIUS; J. SIXMA (1979). «Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by Factor VIII-von Willebrand factor bound to the subendothelium». *Nature*, pàg. 636-8.

SAKARIASSEN, K. S.; P. F. NIEVELSTEIN; B. S. COLLER; J. J. SIXMA (1986). «The role of platelet membrane glycoproteins Ib and IIb/IIIa in platelet adherence to human artery subendothelium». *Br J Haematol*, núm. 63, pàg. 681-91.

SASAHARA, M.; E. W. RAINES; A. CHAIT; T. E. CAREW; D. STEINBERG; P. W. WAHL; R. ROSS (1994). «Inhibition of hypercholesterolemia-induced atherosclerosis in the nonhuman primate by probucol». *J Clin Invest*, núm. 94, pàg. 155-164

SHAH, P. K.; E. FALK; J. J. BADIMON; A. FERNÁNDEZ-ORTIZ; A. MAILHAC; G. VILLAREAL-LEVY; J. T. FALLON; J. RENGSTROM; V. FUSTER (1995). «Human monocyte-derived macrophages induce collagen breakdown in fibrous caps of atherosclerotic plaques: potential role of matrix-degrading metalloproteinases and implications for plaque rupture». *Circulation*, núm. 92, pàg. 1565-1569.

SHI, Y.; A. FARD; A. GALEO; H. G. HUTCHINSON; P. VERMANI; G. R. DODGE; D. J. HALL; F. SHAHEEN; A. ZALEWSKY (1994). «Transcatheter delivery of c-myc antisense oligomers reduces neointimal formation in a porcine model of coronary artery balloon injury». *Circulation*, núm. 90, pàg. 944-951.

SIMONS, M.; E. R. EDELMAN; J. L. DEKEYSER; R. LANGER; R. D. ROSENBERG (1992). «Antisense c-myb oligonucleotides inhibit intimal arterial smooth muscle cell accumulation in vivo». *Nature*, núm. 359, pàg. 67-70.

SMALLEY, D. M.; J. H. C. LIN; M. L. CURTIS; Y. KOBARI; M. B. STEMERMAN; K. A. PRICHARD (1996). «Native LDL increases endothelial cell adhesiveness by inducing intercellular adhesion molecule-1». *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, núm. 16, pàg. 585-590.

SMYTH, S. S.; C. A. HILLERY; L. V. PARISE (1992). «Fibrinogen binding to purified platelet glycoprotein IIb-IIIa (integrin αIIbβ3) is modulated by lipids». *J Biol Chem*, núm. 267, pàg. 15568-15577.

SMYTH, S. S.; C. C. JONECKIS; L. V. PARISE (1993). «Regulation of vascular integrins». *Blood*, núm. 81, pàg. 2827-2843.

TURITTO, V. T.; H. R. BAUMGARTNER (1987). A: Colman R.; Hirsh, J.; Marder, V.; Salzman, E. [ed.] *Hemostasis and Thrombosis, Basic Principles and Clinical Practice*. 2a ed. New York: JB Lippincott Co. pàg. 555-71.

VAN DEER GEER, P.; T. HUNTER (1994). «Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways». *Annu Rev Cell Biol*, núm. 10, pàg. 251-337.

VICENTE, V.; R. A. HOUGHTEN; Z. M. RUGGERI (1990). «Identification of a site in the α chain of platelet glycoprotein Ib that participates in von Willebrand factor binding». *J Biol Chem*, núm. 265, pàg. 274-280.

VIDAL, F.; C. COLOMÉ; J. MARTÍN-GONZÁLEZ; L. BADIMON (1998). «Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells». *Eur J Biochem*, núm. 252, pàg. 378-384.

VON DEER LEYEN, H. E.; G. H. GIBBONS; R. MORISHITA; N. LEWIS; L. ZHANG; M. NAKAJIMA; Y. KANEDA; J. P. COOKE; V. DZA (1995). «Gene therapy inhibing neointimal vascular lesion: in vivo transfer of endothelial cell nitric oxide synthase gene». *Proc Natl Acad Sci USA*, núm. 92, pàg. 1137-1141.

VORA, D. K.; Z. FANG; F. PARHAMI; A. FOGELMAN; M. TERRITO; J. BERLINER (1994). «P-selectin induction by mmLDL and its expression in human atherosclerotic lesons». *Circulation*, núm. 90, pàg. I-83.

YLÄ-HERTTUALA, S.; B. A. LIPTON; M. E. ROSENFELD; T. SÄKIOJA; T. YOSIMURA; E. J. LEONARD; J. L. WITZTUM; D. STEINBERG (1991*b*). «Expression of monocyte chemottractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions». *Proc Natl Acad Sci USA*, núm. 88, pàg. 5252-5256.

YLÄ-HERTTUALA, S.; M. E. ROSENFELD; S. PARTHASARATHY; E. SIGAL; T. SÄRKIOJA; J. L. WITZTUM; D. STEINBERG (1991*a*). «Gene expression in macrophage-rich human atherosclerotic lesions: 15-lipooxygenase and acetyl low density lipoprotein receptor messenger RNA colocalize with oxidation specific lipid-protein aducts». *J Clin Invest*, núm. 87, pàg. 1146-1152.