

Neovascularización en arterias coronarias humanas con distintos grados de lesión

Josep O. Juan-Babot, José Martínez-González, María Berrozpe y Lina Badimon

Centro de Investigación Cardiovascular. CSIC-ICCC. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. España.

Introducción y objetivos. Los factores de crecimiento producidos por las células musculares lisas activadas, las células inflamatorias y especies moleculares plasmáticas infiltradas en la lesión pueden modular la función endotelial. El objetivo de este estudio ha sido cuantificar la presencia de neovasos en lesiones ateroscleróticas de arterias coronarias humanas con diferentes grados de lesión en relación con la infiltración de células inflamatorias y moléculas del plasma.

Pacientes y método. Se estudiaron 60 arterias coronarias procedentes de pacientes sometidos a operaciones de trasplante cardíaco. Por técnicas de histología convencional, inmunohistoquímica y análisis de imagen se analizaron y cuantificaron los marcadores celulares (célula muscular lisa, monocito/macrófago), la presencia de lípidos, de trombina/protrombina y los valores de expresión del factor de crecimiento endotelial de origen vascular (VEGF).

Resultados. Se detectaron neovasos en lesiones avanzadas y se observó una correlación positiva con el grado de intrusión, la infiltración de monocitos/macrófagos y el contenido lipídico. Las células musculares lisas fueron las principales productoras de VEGF, tanto en la íntima como en la media de las lesiones avanzadas. En estas lesiones se observó colocalización de zonas con un alto contenido de trombina/protrombina, con células musculares en estado activado.

Conclusiones. La presencia de neovasos en las lesiones de las arterias coronarias se correlaciona con el contenido de células inflamatorias, de material lipídico y de trombina/protrombina. La expresión de VEGF se asocia principalmente a las células musculares lisas, lo que indica un papel clave de estas células como moduladoras de las células endoteliales.

Palabras clave: Angiogénesis. Aterosclerosis. Célula muscular lisa. VEGF.

VÉASE EDITORIAL EN PÁGS. 947-8

Este trabajo ha sido posible gracias a los fondos proporcionados inicialmente por la Marató-TV3 para Enfermedades Cardíacas de 1995, que permitió iniciar el banco de tejidos, por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS99/0907) y el Plan Nacional (SAF2000-0174), y gracias a una beca de la Fundación Española del Corazón 1999-2000 para formación posdoctoral de Josep O. Juan-Babot.

Correspondencia: Prof. Lina Badimon.
Centro Investigación Cardiovascular. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Avda. Sant Antoni M.º Claret, 167. 08025 Barcelona. España.
Correo electrónico: lbmucv@cvid.csic.es

Recibido el 25 de septiembre de 2002.

Aceptado para su publicación el 12 de junio de 2003.

Neovascularization in Human Coronary Arteries With Lesions of Different Severity

Introduction and objectives. Endothelial function can be modulated by growth factors produced by activated smooth muscle cells, inflammatory cells and plasma products that infiltrate the lesion. The aim of this study was to quantify neovessels in human coronary arteries with atherosclerotic lesions of different severity and analyze their relationship with inflammatory cell and plasma product infiltrates.

Patients and method. We studied 60 coronary arteries from patients who underwent heart transplant. Cellular markers (smooth muscle cell, monocyte/macrophage), the presence thrombin/prothrombin and expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) were analyzed and quantified by conventional histology, immunohistochemistry and image analysis techniques.

Results. Neovessels were detected in advanced lesions, and a positive correlation was observed with the degree of vessel remodeling, monocyte/macrophage infiltration and lipid deposition. Smooth muscle cells were the main producers of VEGF in both the intima and media layers of advanced lesions. In these lesions thrombin/prothrombin-positive areas colocalized with activated smooth muscle cells.

Conclusions. The presence of neovessels in coronary arteries correlated with inflammatory cell infiltration, lipid deposition and thrombin/prothrombin content. VEGF expression was mainly associated with smooth muscle cells, indicating a key role of these cells in the modulation of endothelial cell function.

Key words: Angiogenesis. Atherosclerosis. Smooth muscle cell. VEGF.

Full English text available at: www.revespcardiol.org

INTRODUCCIÓN

La arteriosclerosis es una enfermedad sistémica y multifactorial en la que se hallan implicados diversos factores de riesgo¹⁻⁶. Múltiples factores de crecimiento, citocinas y otras sustancias producidas por las células endoteliales, células musculares lisas (CML), mo-

ABREVIATURAS

CML: células musculares lisas.
 MD: miocardiopatía dilatada.
 MI: miocardiopatía isquémica.
 VEGF: factor de crecimiento vascular del endotelio.

nocitos/macrófagos y linfocitos T regulan la respuesta inflamatoria y la proliferación celular que se produce en las lesiones ateroscleróticas. El resultado de la interacción de estos factores es una respuesta fibroproliferativa que hace evolucionar las lesiones ateroscleróticas. Uno de los primeros elementos que resultan afectados en la génesis de las lesiones ateroscleróticas es el endotelio; de hecho, la disfunción endotelial es un denominador común durante el proceso aterogénico⁷⁻⁹. Además, el endotelio se ha revelado clave en el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización) que tiene lugar en placas ateroscleróticas avanzadas^{10,11}.

La formación de nuevos vasos es activada por diferentes factores de crecimiento, como el factor de crecimiento endotelial de origen vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos de tipo básico (bFGF), cuya expresión aumenta en respuesta a diferentes desencadenantes del proceso¹²⁻¹⁴. El VEGF es un factor angiogénico, mitógeno para las células endoteliales, que aumenta la permeabilidad vascular y modula la trombogenicidad¹⁵. En la pared vascular, y especialmente en las lesiones ateroscleróticas, los factores de crecimiento producidos por las CML, como el VEGF, pueden modular la función endotelial y la expresión de genes vinculados a la activación de la migración y proliferación de las células endoteliales durante la angiogénesis¹⁶. Además de estos factores, que son generados *in situ* por las células que interactúan en las lesiones ateroscleróticas, la trombina retenida por la matriz extracelular, donde permanece funcionalmente activa¹⁷, parece desempeñar un papel importante en la regulación del proceso, ya que puede promover la activación de las células vasculares, tanto CML como células endoteliales.

Los estudios sobre angiogénesis se han realizado *in vitro*, en modelos experimentales, principalmente en animales transgénicos, y en arterias humanas procedentes de autopsias^{14,15}, pero no conocemos estudios que analicen sistemáticamente el proceso de neovascularización en lesiones arteroscleróticas de arterias coronarias humanas obtenidas inmediatamente tras la extracción quirúrgica del corazón. El objetivo de este estudio fue cuantificar la presencia de neovasos en lesiones coronarias con distinto grado de lesión y estudiar los valores de expresión de factores de creci-

miento potencialmente asociados a dicha neovascularización.

En este estudio realizado en arterias coronarias humanas se ha observado una formación significativa de neovasos sólo en lesiones avanzadas. En estas lesiones, la expresión de VEGF fue muy significativa y, desde el punto de vista cuantitativo, estaba principalmente asociada a CML. Con frecuencia se observó colocalización entre áreas con alto contenido de trombina/protrombina y CML en estado activado. Estas células podrían desempeñar un papel en el proceso de formación de neovasos maduros.

PACIENTES Y MÉTODO

Obtención y preparación de las muestras de tejido

Las arterias coronarias humanas se obtuvieron a partir de corazones extraídos en operaciones de trasplante cardíaco, concretamente de segmentos proximales de unos 2 cm de longitud, a partir del *ostium* de las coronarias derecha, circunfleja y descendente anterior. Las arterias se procesaron inmediatamente tras la extracción del corazón. Fueron fijadas en paraformaldehído, criopreservadas en sacarosa e incluidas en OCT (Miles Inc.). Finalmente, se conservaron a -80°C hasta su análisis. Un grupo de muestras, después de la fijación con paraformaldehído, se incluyó en parafina mediante un procesador automático de tejidos (Shandon-Elliot).

A partir de las muestras congeladas o incluidas en parafina se generaron secciones seriadas consecutivas de 5 μm de grosor mediante crióstato (JUNGCM 3000, Leica) o micrótopo (Supercut, Reichert), respectivamente.

Para el análisis de VEGF, las arterias fueron subdivididas en fragmentos y se realizó una asignación aleatoria en tres grupos que se procesaron independientemente: mediante fijación con paraformaldehído, por congelación en nitrógeno líquido o mediante inclusión en parafina. En las muestras fijadas en paraformaldehído, la inmunotinción del VEGF no permitió diferenciar áreas celulares de áreas acelulares. Además, la inespecificidad de la tinción del VEGF enmascaró la tinción de los marcadores celulares, lo que no permitió identificar tipos celulares. La inmunotinción del VEGF en muestras congeladas directamente en nitrógeno líquido fue positiva en las tunicas media e íntima. Sin embargo, el bajo contraste entre las áreas de celularidad y las zonas ricas en matriz extracelular no permitió identificar claramente estructuras vasculares en la íntima. En la doble inmunotinción fue difícil observar colocalización de VEGF con las células. Por tanto, para analizar el VEGF se escogió el método de inclusión en parafina por su mayor especificidad.

Tinciones histopatológicas e inmunohistoquímicas

Se realizó una tinción con tricrómico de Masson¹⁸ para identificar las estructuras vasculares, y una tinción con Oil Red-O (ORO)¹⁹ para determinar el contenido lipídico. A partir de estas tinciones, las lesiones se clasificaron de acuerdo con el criterio de la American Heart Association (AHA)^{20,21}.

Método de fosfatasa alcalina

Este método se aplicó según las técnicas convencionales²² para analizar la presencia de los siguientes marcadores: HAM56, protrombina, α -SM actina, y CD34 (tabla 1).

Método de avidina-biotina-peroxidasa

Este método se utilizó según las técnicas convencionales²³ para la detección de VEGF y Ki67 (tabla 1). En el caso de doble inmunotinción con VEGF y un marcador celular, se utilizó el método avidina-biotina-peroxidasa (ABC Kit, Vector Labs.) para el VEGF, y el de fosfatasa alcalina (Vector Labs.) para el marcaje complementario.

Método de fluorescencia

También siguiendo técnicas convencionales²⁴ se utilizó este método para el marcaje del factor von Willebrand (vWF) y α -SM actina (tabla 1).

Análisis de imagen

Las preparaciones se observaron mediante un microscopio binocular de luz transmitida y fluorescencia (Vanox AHBT3, Olympus). Para bajos aumentos se utilizó una lupa binocular (SCH10, Olympus). La captación de imágenes se realizó mediante una cámara digital (Sony 3CCD) y el análisis de imagen se llevó a cabo informáticamente mediante el programa Visilog 4.1.5 (Noesis).

Cálculos de áreas generales sobre las coronarias

La imagen de cuatro secciones de cada coronaria teñida mediante la tinción tricrómica de Masson se captó con lupa binocular ($\times 25$ aumentos). Mediante el programa Visilog se midió el área de la media (A_m), de la íntima (A_i) y del lumen (A_l). Se calculó el porcentaje de estenosis y el grado de intrusión (GI) según las fórmulas:

$$\text{Estenosis (\%)} = [A_i / (A_i + A_m)] \times 100$$

$$\text{GI (\%)} = [A_l / (A_i + A_m)] \times 100$$

Los resultados de las áreas se expresaron en mm^2 y el grado de estenosis e intrusión, en porcentajes^{25,26}.

Cuantificación de las áreas de lípidos y macrófagos

Para la cuantificación del contenido de lípidos (tinción ORO) y de monocitos/macrófagos (tinción con el marcador HAM56) se procedió a la captación de cinco campos por sección con una magnificación de $\times 200$. A continuación se procedió a desarrollar un programa informático con una subrutina incorporada que permitió calcular el porcentaje del área de la íntima ocupada por el marcador estudiado mediante el cálculo de la relación (en porcentaje) entre el área teñida (área positiva) y el área total, multiplicado por 100.

Presencia de neovasos en las lesiones

De una sección elegida al azar entre las incubadas con la combinación de anticuerpos antifactor von Willebrand (vWF) y anti- α -actina de músculo liso (α -SM actina) se captaron a 200 aumentos las áreas teñidas con el factor von Willebrand. Se determinó el área ocupada por estos neovasos y se calcularon las relaciones entre la superficie ocupada por los neovasos y las diferentes áreas indicadas anteriormente.

La densidad de los neovasos (D) se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$D = \text{ANv} / (A_m + A_i) \times 100$$

donde ANv es el área ocupada por los neovasos²⁷.

TABLA 1. Anticuerpos primarios utilizados en inmunohistoquímica

| Antígeno reconocido | Tipo | Clon | Dilución | Proveedor | Técnica de análisis |
|-----------------------|------------|--------------------|----------|-------------------|-----------------------|
| HAM56 | Monoclonal | HAM56 | 1/50 | DAKO | FA-POD |
| VEGF | Policlonal | Rabbit IgG | 1/400 | Sta. Cruz Biotech | ABC-POD |
| Factor von Willebrand | Policlonal | Rabbit Ig fraction | 1/100 | DAKO | Fluorescencia |
| CD34 | Monoclonal | QBEnd/10 | 1/50 | Novocastra | FA-POD |
| α -SM actina | Monoclonal | 1A4 | 1/50 | DAKO | Fluorescencia, FA-POD |
| Ki67 | Monoclonal | MIB-1 | 1/50 | Immunotech | ABC-POD |
| Protrombina | Policlonal | Sheep IgG | 1/100 | DAKO | FA-POD |

Marcadores: CD34 y vWF (marcadores de endotelio, neovasos); HAM56 (marcador de monocitos/macrófagos); α -SM actina (marcador de células musculares lisas, CML); Ki67 (marcador de proliferación). Métodos: ABC, avidina-biotina; FA, fosfatasa alcalina; POD, peroxidasa.

Análisis estadísticos

Los resultados se expresaron como el valor medio \pm EEM (error estándar de la media) y se analizaron con el programa estadístico Statview™ (Abacus Concepts). La comparación entre dos grupos se realizó mediante la prueba de la U de Mann-Whitney, y la regresión, con el análisis no paramétrico de Spearman. Las diferencias se consideraron significativas cuando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Características de los pacientes

Se analizaron las arterias coronarias de 20 pacientes de raza blanca (el 90% varones y el 10% mujeres) sometidos a trasplante, con edades comprendidas entre los 18 y los 63 años, seleccionados durante un período de 18 meses (desde octubre de 1999 a marzo de 2001). En la tabla 2 se muestra la distribución de factores de riesgo en estos pacientes, de acuerdo con la enfermedad subyacente: miocardiopatía dilatada (MD) o isquémica (MI). En la MI destacó la presencia de hiperlipemia (88%), hipertensión arterial (67%) y diabetes (11%), frente a la ausencia de dichos factores de riesgo en los pacientes con MD. Todos los pacientes con MI tenían antecedentes de infarto de miocardio antiguo.

TABLA 2. Factores de riesgo en los pacientes incluidos en el estudio

| | Miocardiopatía dilatada a (n = 11) | Miocardiopatía isquémica (n = 9) |
|-------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| Hiperlipemia | 0 (0,0) | 8 (88,0) |
| Hipertensión | 0 (0,0) | 6 (66,6) |
| Tabaquismo | 6 (54,5) | 5 (55,5) |
| Antecedentes familiares | 2 (18,0) | 5 (55,5) |
| Alcoholismo | 4 (36,3) | 4 (44,4) |
| Diabetes | 0 (0,0) | 1 (11) |

Los valores expresan las cifras absolutas de los factores de riesgo. Entre paréntesis se indica el porcentaje de pacientes con miocardiopatía dilatada o miocardiopatía isquémica que presentan el factor de riesgo estudiado.

Clasificación de las lesiones estudiadas

Se analizaron un total de 60 lesiones correspondientes a 60 coronarias. En la tabla 3 se muestra la distribución de las lesiones de acuerdo con los factores de riesgo. En general, se observó que las lesiones avanzadas correspondían a pacientes con MI (24 de 25 lesiones, tipos IV a VIII), mientras que las lesiones tempranas se observaron en pacientes con MD no isquémica (32 de 35 lesiones analizadas, tipos I-III). En la figura 1 se muestran ejemplos característicos correspondientes a dichas lesiones. Los estudios de correlación de Spearman mostraron que la gravedad de las lesiones, que conlleva un aumento del grado de estenosis, se correlacionó positivamente con la infiltración de monocitos/macrófagos ($r = 0,536$; $p = 0,0001$), alcanzando el máximo en la lesión tipo VI, para luego disminuir en los estadios finales (tipo VII y VIII), y con el contenido lipídico ($r = 0,647$; $p = 0,0001$).

Neovascularización en las lesiones ateroscleróticas humanas

En las lesiones tempranas (tipos I y II) no se detectaron neovasos. Éstos aparecen a partir de las lesiones intermedias (tipo III), y su número aumenta hasta la lesión tipo VI, para finalmente disminuir en las lesiones avanzadas (tipo VII y VIII). Los neovasos se encontraron no sólo alrededor del núcleo lipídico, sino también en la capa media y en la frontera entre la media y la íntima. Los estudios de doble inmunolocalización mostraron que las áreas que rodean a los neovasos son ricas en células inflamatorias, especialmente monocitos/macrófagos. Por lo general, son áreas donde aumenta el contenido de CML (marcador α -SM actina). En la figura 2 se muestra un ejemplo representativo de una lesión avanzada con un elevado contenido de neovasos. El resultado de la cuantificación de las áreas ocupadas por neovasos en los diferentes tipos de lesión se muestra en la tabla 4. Estudios de correlación de Spearman mostraron una correlación positiva entre el contenido de neovasos y el grado de estenosis ($r = 0,740$; $p = 0,0001$), de intru-

TABLA 3. Distribución de las lesiones según el factor de riesgo

| Factores de riesgo | EIA (n = 12) | I-II (n = 16) | III (n = 7) | IV-V (n = 6) | VI (n = 7) | VII-VIII (12) |
|-----------------------------|--------------|---------------|-------------|--------------|------------|---------------|
| Diabetes (%) | 0 | 0 | 0 | 0 | 28,5 | 8,3 |
| Hipertensión (%) | 0 | 12,5 | 14,2 | 50 | 71,4 | 83,3 |
| Hiperlipemia (%) | 0 | 12,5 | 14,2 | 85 | 100 | 66,6 |
| Antecedentes familiares (%) | 8,3 | 37,5 | 0 | 33 | 85,7 | 50 |
| Alcoholismo (%) | 25 | 43,7 | 0 | 33 | 42,8 | 58,3 |
| Tabaquismo (%) | 25 | 81,2 | 42,8 | 85 | 42,8 | 50 |

EIA: engrosamiento de la íntima arterial.

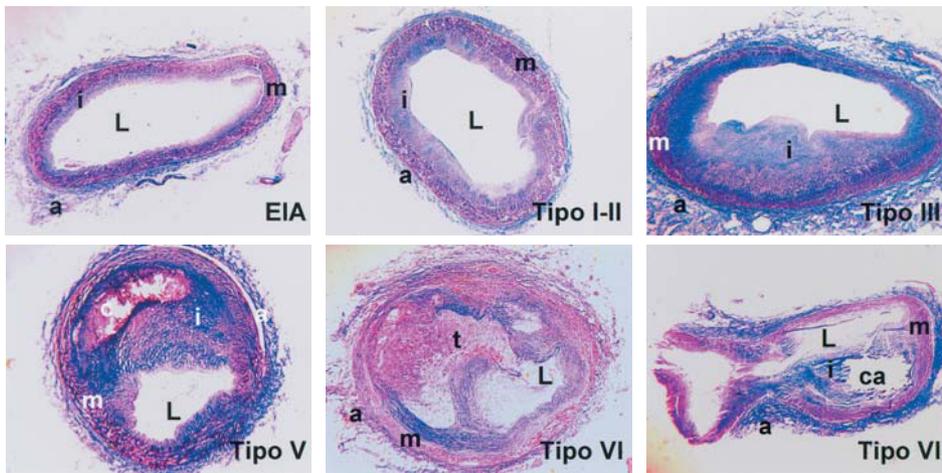


Fig. 1. Tinción tricrómica de Masson de arterias coronarias en diferentes grados de lesión. EIA: engrosamiento de la íntima arterial; a: adventicia; c: core lipídico; ca: calcificación; i: íntima; L: lumen; m: media; t: trombo (×25).

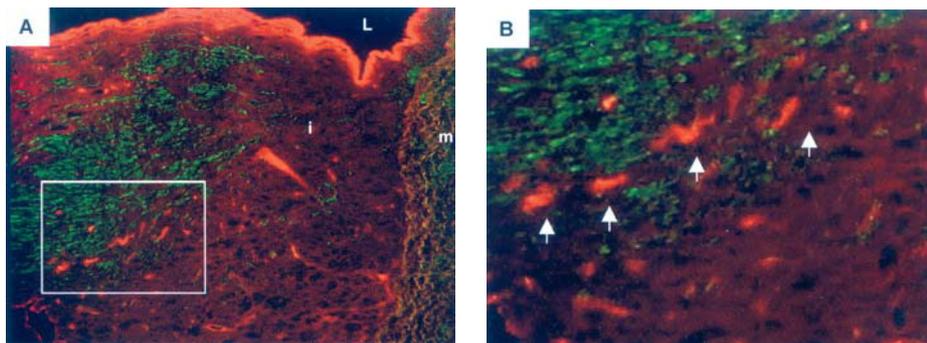


Fig. 2. A: Lesión avanzada con un elevado contenido de neovasos. Inmunolocalización de α -SM actina (verde) y factor von Willebrand (rojo) (×100). B: Ampliación de la imagen indicada en A. Las flechas indican la posición de los neovasos. i: íntima; L: lumen; m: media.

sión ($r = 0,758$; $p = 0,0001$), la infiltración de monocitos/macrófagos ($r = 0,537$; $p = 0,0001$), el contenido lipídico ($r = 0,663$; $p = 0,0001$) y la presencia de trombina/protrombina ($r = 0,650$; $p = 0,0001$).

Expresión del factor de crecimiento endotelial de origen vascular en las lesiones

El método de inclusión en parafina fue el más eficaz para analizar el VEGF. Éste se colocalizó con áreas celulares y definió áreas perivasculares en el endotelio vascular y en los neovasos de la íntima (fig. 3B y F). Los *vasa vasorum* de la adventicia también mostraron una tinción positiva para el VEGF. La tinción del VEGF se colocalizó principalmente con las CML de las capas media e íntima (fig. 3C, D y G), y también con las células endoteliales (fig. 3E) y los macrófagos (fig. 3H). Las áreas ricas en colágeno fueron negativas para el VEGF. Como se aprecia en la figura 3, estruc-

turalmente, los neovasos maduros están formados por una monocapa de células endoteliales rodeada de musculatura lisa (positivo para α -SM actina).

Expresión de moléculas proangiogénicas: trombina

No se detectó trombina/protrombina en las arterias con engrosamiento intimal (EIA) (fig. 4C); en cambio, su presencia aumentó en la íntima a medida que evolucionó la lesión, alcanzando su nivel más alto en la lesión tipo VI (fig. 4 D). En las lesiones de tipo II y III se encuentra asociada a la presencia de monocitos/macrófagos, CML y material lipídico. En las lesiones avanzadas, su distribución está relacionada con las CML, monocitos/macrófagos y matriz extracelular. Se observó una colocalización de zonas con un alto contenido de trombina/protrombina con CML en estado activado (positivo para Ki67) (fig. 5).

TABLA 4. Contenido de neovasos en las lesiones ateroscleróticas

| Tipo lesión | EIA | I-II | III | IV-V | VI | VII-VIII |
|-------------|----------------|----------------|---------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Neovasos | 0,00% (n = 12) | 0,00% (n = 16) | 0,06% (n = 7) | 0,27% (n = 6) ^a | 0,69% (n = 7) ^b | 0,53% (n = 12) ^c |

Neovasos, expresados como porcentaje de superficie transversal de coronaria ($A_m + A_i$) ocupada por marcadores de endotelio.

^a $p < 0,05$ frente a EIA y I-II; ^b $p < 0,05$ frente a EIA, I-II, III y IV-V; ^c $p < 0,05$ frente a EIA, I-II y III. EIA: engrosamiento de la íntima arterial.

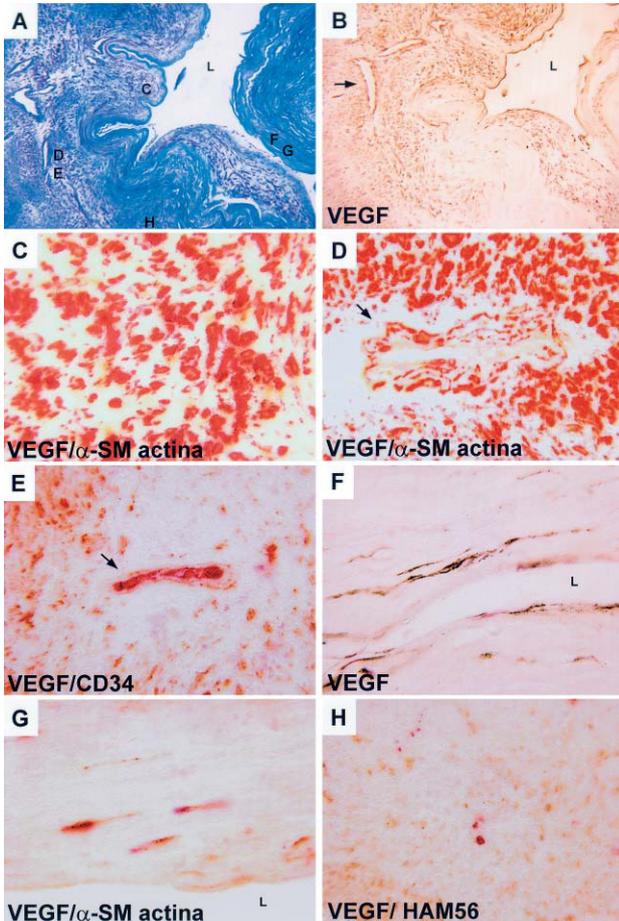


Fig. 3. Inmunotinción de VEGF en secciones parafinadas. A: tinción tricrómica de Masson. B: localización inmunohistoquímica de VEGF. C y D: doble inmunotinción de VEGF (marrón) y α -SM actina (rojo). E: doble inmunotinción de VEGF (marrón) y CD34 (rojo, célula endotelial). F: inmunotinción de VEGF. G: doble inmunotinción de VEGF (marrón) y α -SM actina (rojo). H: doble inmunotinción de VEGF (marrón) y HAM56 (rojo, macrófago). En A, las letras indican la zona de las imágenes mostradas en C a H. Las flechas indican la posición de los neovasos. L: lumen. A y B ($\times 100$), C a H ($\times 600$).

DISCUSIÓN

En este estudio nos planteamos analizar la presencia de neovasos y VEGF en relación con los marcadores de evolución de la lesión en arterias coronarias humanas.

Se incluyó a 20 pacientes, de los que 9 sufrían MI y 11 MD. Las lesiones avanzadas pertenecían mayoritariamente a pacientes con MI, y los factores de riesgo más prevalentes fueron la hiperlipemia y la hipertensión. Como la diabetes es una contraindicación relativa de trasplante cardíaco, sólo uno de los 20 pacientes incluidos en el estudio sufría dicha afección. Las lesiones tempranas correspondían principalmente a pacientes con MD que no presentaron estos factores de riesgo. La edad de los pacientes con MI fue significativamente mayor que la de los que padecían MD. De hecho, ningún paciente menor de 45 años presentó lesiones avan-

zadas ni evidencias de complicación trombótica en sus coronarias. Este estudio fue llevado a cabo en arterias procesadas inmediatamente después de la extracción quirúrgica del corazón. Esta aproximación puede aportar información más próxima a la situación *in vivo* que la obtenida del análisis de especímenes de autopsias, ya que el tiempo de obtención de las muestras en estos casos suele ser de varias horas *post mortem*. Por otra parte, la inmunorreactividad de las proteínas puede alterarse en las muestras procedentes de autopsias, y también puede producirse la liberación del contenido celular, lo que dificulta la localización de los marcadores celulares y de las proteínas de interés.

En las lesiones analizadas, la presencia de neovasos en la íntima se correlacionó con el porcentaje de estenosis, de intrusión, con el contenido de células inflamatorias, material lipídico y la presencia de trombina/protrombina. La presencia de lípidos aumentó gradualmente hasta la lesión tipo VI, y fueron las lesiones tipo VI las más ricas en neovasos. Resultados previos han relacionado la presencia de neovasos con complicaciones trombóticas^{28,29} y, precisamente, son las placas tipo VI las más asociadas a complicaciones trombóticas. Además, la colocalización de los neovasos con monocitos/macrófagos sugiere un papel importante de estas células, que producen factores angiogénicos que pueden estimular la formación de neovasos³⁰.

Estudios *in vitro* e *in vivo* han mostrado que el VEGF es el factor angiogénico más importante^{14,15,31-33}. Sin embargo, su análisis se realizó utilizando diferentes métodos de procesamiento/fijación, normalmente en arterias humanas procedentes de autopsias en las que el tiempo de extracción variaba de 3 a 16 h *post mortem*^{14,15}. Los resultados de estos estudios son, en cierto modo, discrepantes; ya que en inmunohistoquímica, la obtención de las muestras y su procesamiento pueden afectar significativamente a los resultados³⁴. Nosotros observamos que el método de inclusión en parafina fue el más específico para analizar el VEGF en las arterias coronarias humanas extraídas inmediatamente tras la extracción quirúrgica del corazón en el trasplante cardíaco. El principal tipo celular que expresó el VEGF en las lesiones fue el de las CML, de acuerdo con estudios anteriores llevados a cabo en diferentes arterias humanas^{12,14,32}. En los neovasos presentes en la íntima, el VEGF se colocalizó con las CML y las células endoteliales. La expresión del VEGF se asoció con células vasculares, pero también con monocitos/macrófagos. Algunos autores han detectado VEGF en la matriz extracelular, en zonas próximas a las CML y en macrófagos³³, o de forma generalizada³². Nosotros sólo detectamos expresión significativa de VEGF en la matriz extracelular en las muestras fijadas en paraformaldehído, un procedimiento con el que la tinción de VEGF fue poco específica.

Además de factores autocrinos generados por las cé-

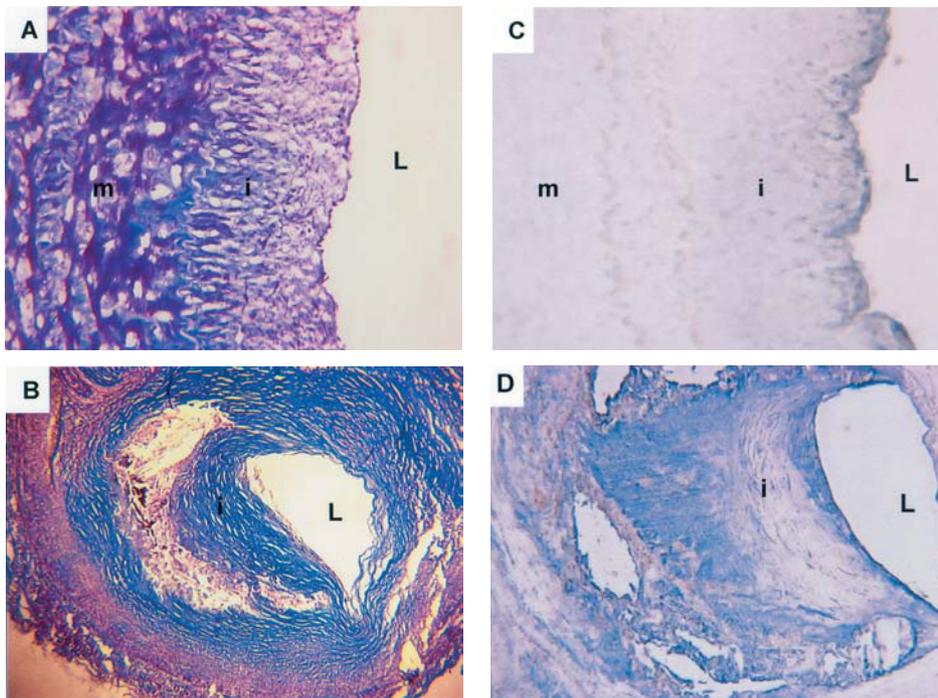


Fig. 4. Presencia de trombina/protrombina en lesiones avanzadas. A y B: tinción tricrómica de Masson. C y D: inmunolocalización de trombina/protrombina (azul) en secciones consecutivas a las mostradas en A y B. A y C: engrosamiento de la íntima arterial (EIA). B y D: lesión tipo VI. i: íntima; L: lumen; m: media. A y C ($\times 100$), B y D ($\times 40$).

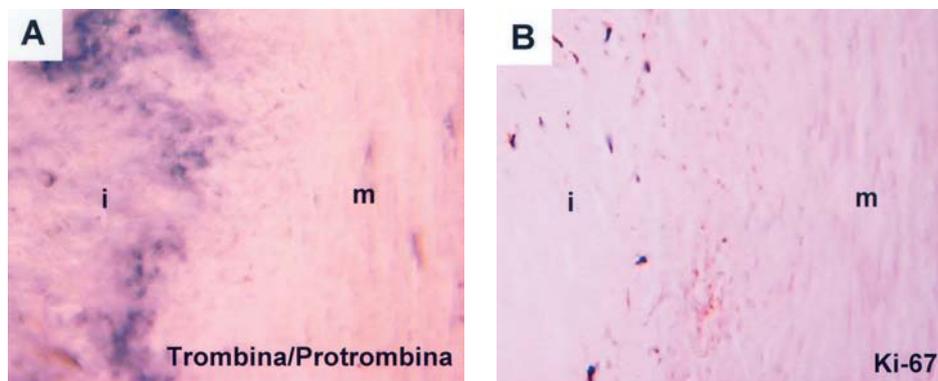


Fig. 5. Inmunolocalización de trombina/protrombina (azul) (A) y Ki67 (negro) (B) en una lesión avanzada tipo VI. Ki67: marcador de proliferación; i: íntima; m: media ($\times 200$).

lulas vasculares *in situ*, como el VEGF, otras moléculas de origen plasmático infiltradas en la pared, como la trombina, pueden potenciar el proceso angiogénico^{35,36}. La trombina modula la actividad de las metaloproteinasas^{37,38} y posee actividad mitogénica para las células endoteliales³⁹ y las CML⁴⁰. Además, puede liberar factores de crecimiento «secuestrados» por los componentes de la matriz⁴¹ y, por tanto, también puede potenciar de forma indirecta la angiogénesis. En nuestro estudio, en lesiones avanzadas observamos colocalización de áreas con un alto contenido de trombina/protrombina con CML activadas (Ki67 positivas).

Aunque en numerosos estudios realizados en muestras procedentes de pacientes fallecidos como consecuencia de complicaciones agudas se observa neovascularización en la íntima de las lesiones ateroscleróticas, su papel fisiopatológico es controvertido. Nuestro estudio muestra que, en las lesiones ateroscleróticas

de pacientes sometidos a trasplante cardíaco, el grado de neovascularización es bajo, incluso en las lesiones avanzadas de los pacientes con episodios previos de miocardiopatía isquémica. Esto podría deberse al riguroso control farmacológico de estos pacientes. Por tanto, una excesiva angiogénesis favorecería la rotura de las placas y el desarrollo de episodios agudos. Esta hipótesis está siendo evaluada en este momento en nuestro laboratorio.

Limitaciones del estudio

Debido a las características del estudio, basado en pacientes estabilizados en espera de recibir un trasplante cardíaco, debemos precisar que no se cuenta con información de pacientes en fase aguda y que también hay un déficit de información sobre diabéticos. Ambos grupos de pacientes son obviamente de interés

y serán el foco de futuros trabajos.

CONCLUSIONES

Hemos detectado neovasos a partir de lesiones de tipo III, y su número fue máximo en las de tipo VI. Los neovasos se localizaron tanto en la íntima como en las zonas contiguas entre íntima y la media, en áreas ricas en material lipídico y células inflamatorias. Se encontraron neovasos casi exclusivamente en los pacientes con MI que presentaban lesiones avanzadas asociadas a una mayor incidencia de factores de riesgo, como la hipertensión y la hiperlipemia. En estas lesiones, la expresión de VEGF fue muy significativa y, desde el punto de vista cuantitativo, estaba vinculada principalmente a las CML.

AGRADECIMIENTO

Los autores agradecen la colaboración continuada del equipo de trasplante cardíaco de la División de Cardiología y Cirugía Cardíaca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Los autores agradecen el apoyo continuado de la Fundación de Investigación Cardiovascular-Catalana Occidente.

BIBLIOGRAFÍA

- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. Part I. *N Engl J Med* 1992;326:242-50.
- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. Part II. *N Engl J Med* 1992;326:310-8.
- Gurfinkel EP. Infección y aterosclerosis. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:383-92.
- Sánchez-Recalde A, Kaski JC. Diabetes mellitus, inflamación y aterosclerosis coronaria: perspectiva actual y futura. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:751-63.
- Navarro-López F. Bases genéticas de la enfermedad coronaria. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:413-31.
- Patterson C. Temas actuales en biología vascular: puesta al día para el siglo XXI. *Rev Esp Cardiol* 2002;54:635-42.
- Badimon L, Martínez-González J. Alteraciones funcionales y estructurales del endotelio en la aterosclerosis. En: Aranda P, Coca A, Palma JL, Plaza L, editores. *Hipertensión y medicina cardiovascular*. Madrid: Scientific Communication Management, 2001; p. 127-49.
- Badimon L, Martínez-González J. Endotelio en la protección vascular: nuevos conocimientos. *Rev Esp Cardiol* 2002;55:17-26.
- Martínez-González J, Llorente-Cortés V, Badimon L. Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas. *Rev Esp Cardiol* 2001;54:218-31.
- Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res* 2001;49:507-21.
- Giordano FJ. Angiogenesis: mechanisms, modulation, and targeted imaging. *J Nucl Cardiol* 1999;6:664-71.
- Broggi E, Wu T, Namiki A, Isner JM. Indirect angiogenic cytokines upregulate VEGF and bFGF gene expression in vascular smooth muscle cells, whereas hypoxia upregulates VEGF expression only. *Circulation* 1994;90:649-52.
- Liu Y, Cox SR, Morita T, Kourembanas S. Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells. Identification of a 5' enhancer. *Circ Res* 1995;77:638-43.
- Chen YX, Nakashima Y, Tanaka K, Shiraishi S, Nakagawa K, Sueishi K. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor in atherosclerotic intimas of human coronary arteries. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:131-9.
- Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions. Possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation* 1998;98:2108-16.
- Kuzuya M, Satake S, Esaki T, Yamada K, Hayashi T, Naito M, et al. Induction of angiogenesis by smooth muscle cell-derived factor: possible role in neovascularization in atherosclerotic plaque. *J Cell Physiol* 1995;164:658-67.
- Bar-Shavit R, Eldor A, Vlodavsky Y. Binding of thrombin to subendothelial extracellular matrix: protection and expression of functional properties. *J Clin Invest* 1989;84:1096-104.
- Bradbury P, Gordon KC. Connective tissues and stains. En: Bancroft JD, Stevens A, editors. *Theory and practice of histological techniques*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1990; p. 119-42.
- Bayliss OB. Lipids. En: Bancroft JD, Stevens A, editors. *Theory and practice of histological techniques*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1990; p. 215-44.
- Sary HC. Composition and classification of human atherosclerotic lesions. *Virchows Archiv a Pathol Anat Histopathol* 1992; 421:277-90.
- irmani R, Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Schwartz SM. Lessons from sudden coronary death. A comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1262-75.
- Mason DY, Sammons R. Alkaline phosphatase and peroxidase for double immunoenzymatic labelling of cellular constituents. *J Clin Pathol* 1978;31:454-60.
- Guesdon JL, Terynck T, Avrameas S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *J Histochem Cytochem* 1979;27:1131-9.
- Marriot D, Carlton SJ. Immunofluorescent techniques. En: Bancroft JD, Stevens A, editors. *Theory and practice of histological techniques*. 3rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1990; p. 451-63.
- Kragel AH, Reddy SG, Wittes JT, Roberts WC. Morphometric analysis of the composition of coronary arterial plaques in isolated unstable angina pectoris with pain at rest. *Am J Cardiol* 1990; 66:562-7.
- McGill HC, McMahan CA, Zieske AW, Tracy RE, Malcom GT, Herderick EE, et al. Association of coronary heart disease risk factors with microscopic qualities of coronary atherosclerosis in youth. *Circulation* 2000;102:374-9.
- Celletti FL, Hilfiker PR, Ghafouri P, Dake MD. Effect of human recombinant vascular endothelial growth factor 165 on progression of atherosclerotic plaque. *J Am Coll Cardiol* 2001;37: 2126-30.
- Zhang Y, Cliff WJ, Schoeffl GI, Higgins G. Immunohistochemical study of intimal microvessels in coronary atherosclerosis. *Am Journal Pathol* 1993;143:164-72.
- Jeziorska M, Woolley DE. Local neovascularization and cellular composition within vulnerable regions of atherosclerotic plaques of human carotid arteries. *J Pathol* 1999;188:189-96.
- De Boer OJ, Van der Wal A, Teeling P, Becker AE. Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization? *Cardiovasc Res* 1999;41: 443-9.
- Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces plasminogen activators and plasminogen activator inhibitor-1 in microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1991;181:902-6.
- Couffinhall T, Kearney M, Witzensbichler B, Chen D, Murohara T,

- Losordo DW, et al. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor (VEGF/VPF) in normal and atherosclerotic human arteries. *Am J Pathol* 1997;150:1673-85.
33. Ramos MA, Kuzuya M, Esaki T, Miura S, Satake S, Asai T, et al. Induction of macrophage VEGF in response to oxidized LDL and VEGF accumulation in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:1188-96.
34. Carson FL. *Histotechnology: a self-instructional text*. Chicago: ASCP Press, 1990; p. 236-7.
35. Haralabopoulos GC, Grant DS, Kleinman HK, Maragoudakis ME. Thrombin promotes endothelial cell alignment in Matrigel in vitro and angiogenesis in vivo. *Am J Physiol* 1997;273: C239-45.
36. Zucker S, Mirza H, Conner CE, Lorenz AF, Drews MH, Bahou WF, et al. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int J Cancer* 1998; 75:780-6.
37. Zucker S, Conner C, DiMassimo BI, Ende H, Drews M, Seiki M, et al. Thrombin induces the activation of progelatinase A in vascular endothelial cells physiologic regulation of angiogenesis. *J Biol Chem* 1995;270:23730-8.
38. Duhamel-Clerin E, Orvain C, Lanza F, Cazenave JP, Klein-Soyer C. Thrombin receptor-mediated increase of two matrix metalloproteinases, MMP-1 and MMP-3, in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vas Biol* 1997;17:1931-8.
39. Herbert JM, Dupuy E, Laplace MC, Zini JM, Bar-Shavit R, Tobelem G. Thrombin induces endothelial cell growth via both a proteolytic and a non-proteolytic pathway. *Biochem J* 1994;303: 227-31.
40. Varela O, Martínez-González J, Badimon L. The response of smooth muscle cells to alpha-thrombin depends on its arterial origin: comparison among different species. *Eur J Clin Invest* 1998; 28:313-23.
41. Benezra M, Vlodaysky I, Ishai-Michaeli R, Neufeld G, Bar-shavit R. Thrombin-induced release of active basic fibroblast growth factor-heparan sulfate complexes from subendothelial extracellular matrix. *Blood* 1993;81:3324-31.