Genética y biología molecular en cardiología (II)

Biología celular y molecular de las lesiones ateroscleróticas

José Martínez-González, Vicente Llorente-Cortés y Lina Badimon

Centro de Investigación Cardiovascular. IIBB/CSIC-Institut de Recerca.
Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.

La asociación de la aterosclerosis con diferentes factores de riesgo, entre ellos los valores elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL), la hipertensión, la diabetes y el hábito tabáquico, generó la hipótesis de «respuesta al daño» para explicar la génesis y el desarrollo de las lesiones. De acuerdo con esta hipótesis, uno de los episodios más tempranos en la aterogénesis es la acumulación de LDL en la pared arterial, donde sufren modificación oxidativa. Estas LDL perturban la función endotelial y, con ello, todas las propiedades antiaterogénicas del endotelio. Además, los macrófagos y las células musculares lisas captan estas LDL, a través de diferentes receptores, y se transforman en células espumosas, cuya acumulación progresiva en la íntima contribuye a la evolución de las lesiones. Por tanto, el desarrollo de las lesiones comporta la activación tanto de las células endoteliales como de las musculares lisas y de los monocitos/macrófagos. En dicha activación intervienen múltiples factores de crecimiento (PDGF, EGF, etc.), citocinas (IL-1β, TNFα, entre otras) y las propias LDL modificadas, que a través de diferentes vías de transducción de señales activan factores de transcripción, como el factor nuclear kappa B (NF-κB) o protooncogenes como c-*fos*, c-*myc*, que regulan la expresión de genes involucrados en la respuesta inflamatoria/proliferativa de las lesiones.

Palabras clave: *Aterosclerosis. Célula muscular lisa (CML). Lipoproteínas de baja densidad (LDL). Macrófagos.*

(*Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 218-231)

Cellular and Molecular Biology of Atherosclerotic Lesions

The association of atherosclerosis with the most common risk factors including elevation of low density lipoprotein (LDL) levels, diabetes, hypertension and cigarette smoking, led to the hypothesis of «response to injury» to explain how the lesions develop. According to this hypothesis, one of the earliest events in atherogenesis is the accumulation of LDL in the arterial wall where they undergo oxidation. These LDL impair endothelial function, and thus, all the antiatherogenic properties of the endothelium. In addition, macrophages and smooth muscle cells take up these LDL, through different receptors, and become foam cells. The accumulation of foam cells in the arterial wall contributes to lesion development. Therefore, lesion development involves the activation of endothelial cells, as well as smooth muscle cells and monocytes/macrophages. In this activation different growth factors (PDGF, EGF, etc.), cytokines (IL-1β, TNFα, etc.) and the modified LDL themselves, play an important role. Through several signal transduction pathways these molecules activate transcription factors, such as the nuclear factor kappa B (NF-κB) or protooncogenes such as c-*fos,* c-*myc,* that regulate the expression of genes involved in the inflammatory/proliferative response of the lesions.

Key words: *Atherosclerosis. Smooth muscle cells (CML). Low density lipoproteins (LDL). Macrophages.*

(*Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 218-231)

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han producido importantes avances en el conocimiento de la aterosclerosis, enfermedad que subyace en la mayor parte de los episodios cardiovasculares. Actualmente la hipótesis más aceptada considera la aterosclerosis como el resultado de una respuesta inflamatoria de la pared a diferentes formas de lesión. El carácter crónico del proceso conduce a la formación de lesiones focales o placas que, en fases avanzadas, pueden ocluir la luz de los vasos directamente o mediante complicación trombótica[1,2].

La acumulación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) en el espacio subendotelial parece ser uno de los primeros episodios asociados al desarrollo de lesiones ateroscleróticas. Las LDL retenidas en la pared sufren procesos de oxidación (LDLox) y generan productos con actividad quimiotáctica para monocitos y células musculares lisas (CML). Los monocitos atraviesan el endotelio, y se diferencian a macrófagos, captan de forma masiva LDLox y se transforman en células espumosas cuya acumulación en la íntima origina la formación de la estría grasa[3]. En la aterogéne-

Sección patrocinada por el Laboratorio Dr. Esteve

Correspondencia: Prof. L. Badimon.
IIBB/CSIC. Jordi Girona, 18-26. 08034 Barcelona.
Correo electrónico: lbmucv@cid.csic.es

ABREVIATURAS

bFGF: factor de crecimiento de fibroblastos.
CI: cardiopatía isquémica.
CML: células musculares lisas.
EGF: factor de crecimiento endotelial.
eNOS o NOS III: óxido nítrico sintasa endotelial.
G-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos.
GDP: guanosín difosfato.
GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófatos.
GTP: guanosín trifosfato.
HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A.
ICAM-1: molécula-1 de adhesión intercelular.
IGF-1: factor de crecimiento insulínico-1.
IL: interleucinas
IL-1β: interleucina-1 beta.
INF-γ: interferón gamma.
iNOS o NOS II: óxido nítrico sintasa inducible.
LDL: lipoproteínas de baja densidad.
LDLag: LDL agregadas.
LDLmm: LDL mínimamente modificadas.
LDLox: LDL oxidadas.
LOX-1: *lectin-like ox-LDL receptor-1*.
LpL: lipoproteinlipasa.
LRP: *low density lipoprotein receptor-related protein.*
MAP cinasas: proteinasas activadas por mitógenos.
MCP-1: proteína-1 quimiotáctica de monocitos.
M-CSF: factor estimulante de colonias de macrófatos.
NF-κB: factor nuclear kappa beta.
ON: óxido nítrico.
PAI-1: inhibidor del activador del plasminógeno tisular.
PCNA: antígeno nuclear de células proliferantes.
PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas.
PECAM-1: molécula-1 de adhesión plaquetaria y endotelial.
PGI_2: prostaciclina.
TGFβ: factor de crecimiento transformante beta.
TNFα: factor necrosante de tumores alfa.
t-PA: activador del plasminógeno tisular.
VCAM-1: molécula-1 de adhesión vascular.
VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular.
VLA-4: *very late antigen-4*.
VLDL: lipoproteínas de muy baja densidad.

sis intervienen múltiples factores de crecimiento, citocinas y otras sustancias producidas por las células endoteliales, las CML, los macrófagos y los linfocitos T, que regulan la respuesta inflamatoria y la proliferación celular[4]. El resultado de la interacción de estos factores es una respuesta fibroproliferativa que hace evolucionar la estría grasa a placa aterosclerótica más compleja. La rotura o ulceración de las placas inestables tiene como consecuencia la exposición de superficies

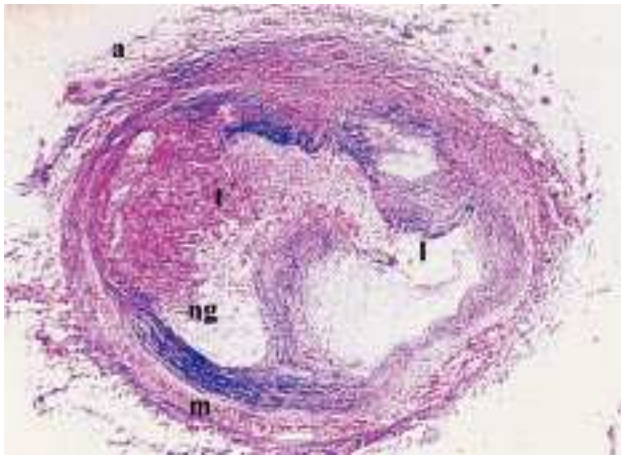

Fig. 1. Microfotografía de una tinción con tricrómico de Masson de una sección correspondiente a una arteria coronaria humana que presenta una lesión avanzada. Se pueden apreciar el núcleo lipídico y la gran cantidad de matriz extracelular que constituye el componente mayoritario de la placa que contribuye a obstruir la luz del vaso. a: adventicia; l: lumen; m: media; ng: núcleo graso; t: trombo.

procoagulantes y protrombóticas que provocan la activación de plaquetas y la formación de trombos, que pueden desencadenar complicaciones clínicas, o bien contribuir al crecimiento de la placa de forma asintomática[5]. En la estabilidad de las placas desempeña un papel clave su cubierta fibrosa, formada fundamentalmente por proteínas de matriz extracelular sintetizadas por las CML como el colágeno y proteoglicanos. Las placas más vulnerables contienen un gran núcleo lipídico envuelto por una cubierta fibrosa delgada. Este núcleo se compone de material lipídico intracelular, que ha sido internalizado por macrófagos y CML, y lípido extracelular, que deriva de la retención de lipoproteínas circulantes y del liberado por las células que sufren necrosis. En la figura 1 se expone una lesión avanzada de una arteria coronaria humana donde se observan su núcleo lipídico y la presencia de un trombo parcialmente organizado que provoca, en gran medida, la oclusión del vaso.

PAPEL DE LAS LIPOPROTEÍNAS DE BAJA DENSIDAD EN LA ATEROGÉNESIS

El colesterol se transporta en el plasma como componente de las lipoproteínas. Aproximadamente dos tercios del colesterol total son transportados por las LDL. Las concentraciones plasmáticas elevadas de LDL son un factor de riesgo para el desarrollo prematuro de aterosclerosis y cardiopatía isquémica (CI)[1,2]. Recientemente, varios ensayos clínicos con fármacos hipolipemiantes, en concreto con los inhibidores del enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMG-CoA) reductasa (estatinas), han demostrado una estrecha relación entre los valores circulantes de LDL y el riesgo de muerte asociado a CI[6-10].

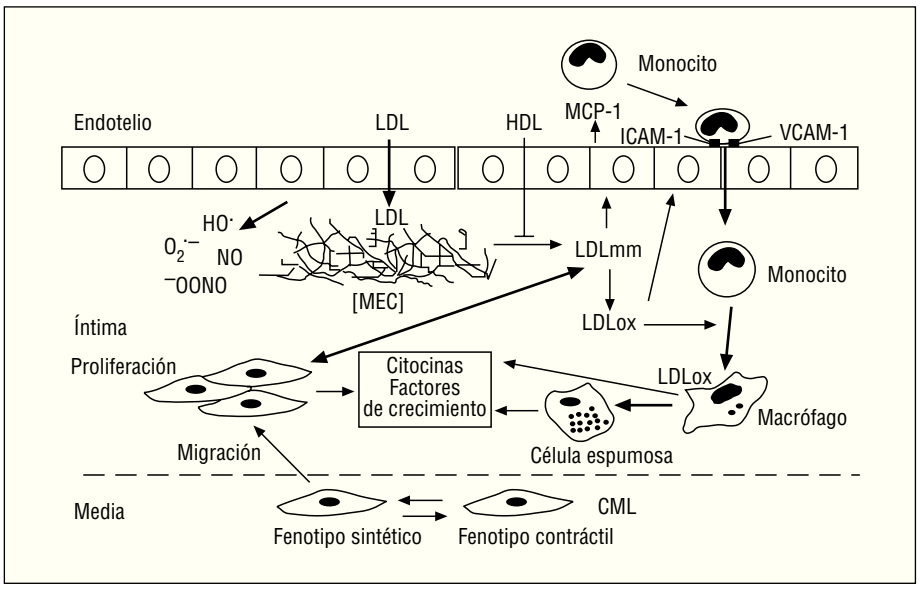

Fig. 2. Esquema de los mecanismos celulares y moleculares que dan origen al inicio y progresión de las lesiones ateroscleróticas. En zonas donde existe una disfunción endotelial que facilita la infiltración de LDL al espacio subendotelial, éstas penetran, interaccionan con proteínas de matriz extracelular [MEC] y sufren procesos de modificación. Primeramente se originan LDL mínimamente modificadas (LDLmm) y posteriormente LDL con mayor grado de oxidación (LDLox). Las LDLox alteran la producción de óxido nítrico (ON) y, con ello, perturban todas las funciones protectoras del ON sobre la pared vascular. Se indica el papel protector de las HDL frente a los procesos oxidativos de las LDL, y cómo los monocitos se adhieren al endotelio activado que sobrexpresa ICAM-I y VCAM-I. Los monocitos circulantes, atraídos por las LDLox retenidas en la pared y la producción incrementada de la proteína 1 quimiotáctica para monocitos (MCP-1), penetran en la pared y son activados a macrófagos, proceso en el que también intervienen las LDLox. Los macrófagos captan LDL modificadas y se transforman en células espumosas. Las células musculares lisas (CML) de la media activadas por citocinas y factores de crecimiento liberados en las lesiones se transforman a un fenotipo sintético, migran a la íntima atraídas por factores quimiatrayentes y proliferan contribuyendo a la evolución de las lesiones.

La hipercolesterolemia se asocia no sólo con un mayor depósito de lípidos en las lesiones sino que valores elevados de LDL alteran diferentes funciones tanto de las células endoteliales como de las CML y de los monocitos. Las LDL alteran la función endotelial: producen una respuesta disminuida de la dilatación dependiente de endotelio[11] y un incremento de las moléculas de adhesión, proteínas que se localizan en la membrana de las células endoteliales y funcionan como puntos de anclaje al endotelio de monocitos circulantes[12]. En células endoteliales en cultivo, concentraciones aterogénicas de LDL (> 160 mg/dl) provocan cambios en el metabolismo del ácido araquidónico[13]; alteran la producción de óxido nítrico (ON) y radicales libres[14,15]; incrementan la expresión de moléculas de adhesión *per se* y la inducida por citocinas, y aumentan la adhesión de monocitos[16]. En la figura 2 se esquematiza cómo la infiltración de las LDL en el espacio subendotelial y su retención por las proteínas de matriz extracelular alteran la homeostasis de la pared vascular.

La hipercolesterolemia activa la proliferación de CML y la expresión de la proteína-1 quimiotáctica de monocitos (MCP-1)[17]. Las CML en cultivo proliferan más rápidamente con suero procedente de pacientes hipercolesterolémicos que con suero de individuos normocolesterolémicos[18]. Además, recientemente nuestro grupo ha demostrado que el contenido de los ácidos grasos de la dieta, que se traduce en cambios en la composición de las LDL, influye en la capacidad del suero de inducir proliferación de las CML en cultivo, y que las dietas ricas en ácido oleico son las que resultan menos proproliferativas y, por tanto, potencialmente poseen un mayor poder cardioprotector[19]. Estos efectos podrían estar relacionados con la capacidad de las lipoproteínas de activar diferentes vías de transmisión de señal ligadas al estímulo mitogénico y de potenciar el efecto de los factores de crecimiento séricos.

Retención y modificación de las lipoproteínas de baja densidad en la íntima de la pared vascular

El sistema vascular se encuentra recubierto por una monocapa de células endoteliales que regulan la permeabilidad de la pared vascular a elementos celulares y macromoléculas como las LDL. El flujo de LDL a través del endotelio tiene lugar según un gradiente de concentración mediante un proceso de transcitosis que no está mediado por receptor. Ciertos factores de riesgo, como la hipertensión o la hipercolesterolemia, favorecen la penetración y la retención de las LDL en la íntima por proteoglicanos y glucosaminoglicanos, lo que favorece los procesos de modificación proteolíticos y oxidativos[20]. Los principales proteoglicanos implicados parecen ser de la familia de los versicanos. *In vitro,* el versicán puede formar distintos tipos de complejos con las LDL, desde complejos fácilmente disociables hasta agregados insolubles, ambos tipos de complejos han sido aislados a partir de lesiones humanas[21].

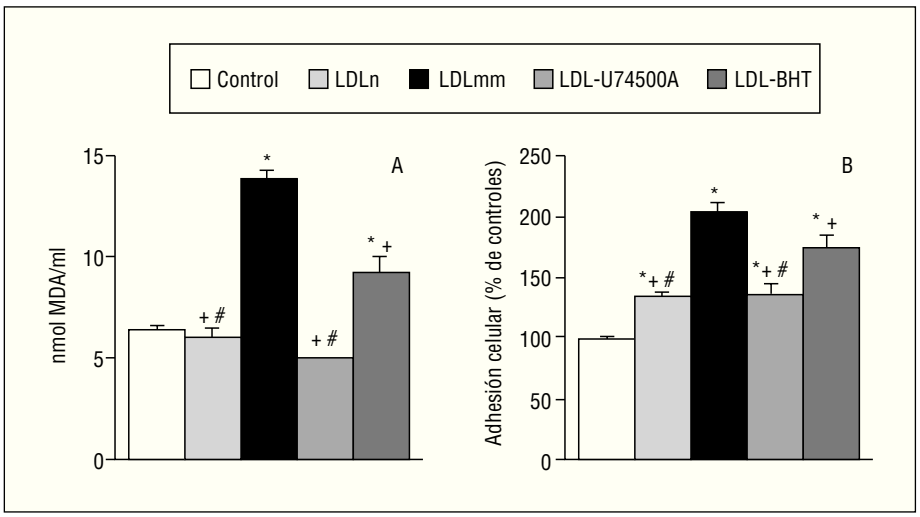

Fig. 3. Efecto de las LDL con diferente grado de oxidación sobre la adhesión de monocitos a células endoteliales en cultivo. Células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC) se expusieron durante 24 h a 180 mg/dl de LDL nativas (LDLn), LDL mínimamente modificadas por oxidación (LDLmm), o LDL sometidas al mismo proceso de modificación que las LDLmm, pero en presencia de un antioxidante (LDL-U74500A y LDL-BHT), y posteriormente se analizó la capacidad de adhesión de la línea monocítica U937 a estas células endoteliales. Se presentan los resultados de 5 experimentos independientes realizados en triplicado. Se observa que las LDL que poseen mayor grado de oxidación, LDLmm y LDL-BHT (proporcional al nivel de MDA/ml mostrado en A), inducen más adhesión de los monocitos a las células endoteliales (B). $p < 0,05$: +, frente a control; +, frente a HUVEC tratadas con LDLmm; #, frente a HUVEC tratadas con LDLBHT. (Modificada de Colomé et al, 2000.)

La retención de las LDL en la íntima favorece el ataque de diversas enzimas que modifican las LDL e incrementan su aterogenicidad. La modificación de las LDL de la que se tiene un mayor conocimiento es la oxidación[22], en la que intervienen, en un primer momento, las células endoteliales y, posteriormente, las CML y los macrófagos. En primer lugar se generan unas LDL, que se han denominado mínimamente modificadas (LDLmm), que presentan un grado de oxidación relativamente bajo, pero que activan el endotelio y poseen mayor capacidad que las LDL nativas de inducir la adhesión de monocitos[23,24]. En la figura 3 se observa que las LDLmm producen más adhesión de monocitos a las células endoteliales en cultivo que las LDL nativas. Varios sistemas enzimáticos, como la mieloperoxidasa y las lipooxigenasas, muy activos en los macrófagos, se han implicado en la oxidación de las LDL[25]. La oxidación de las LDL puede ser potenciada por procesos patológicos subyacentes como la diabetes, ya que concentraciones elevadas de glucosa promueven la glucosilación y aceleran la oxidación[26].

En los últimos años se han acumulado evidencias que indican que la oxidación de las LDL desempeña un papel clave en el proceso de acumulación de material lipídico en las placas[22]. Las LDLox intervienen prácticamente en todas las etapas del proceso de formación de lesiones: inducen la expresión de MCP-1[27] y de moléculas de adhesión como la molécula 1 de adhesión vascular (VCAM-1) y la P-selectina en células endoteliales, lo que facilita la unión de monocitos circulantes al endotelio[28]; provocan apoptosis de las células endoteliales[29] y alteran la producción de ON y radicales libres, con el consiguiente deterioro de la protección antiaterogénesis que ejerce el endotelio[30]. Recientemente se ha clonado un receptor para las LDLox denominado *lectin-like ox-LDL receptor*-1 (LOX-1), cuya expresión se encuentra aumentada en lesiones ateroscleróticas humanas y que podría mediar estos efectos[31].

Las LDLox tambien promueven la diferenciación de monocitos a macrófagos, y modulan la activación en estas células de factores como el factor nuclear kappa B (NF-κB)[32]. Además del estrés oxidativo, el NF-κB es activado por diversos estímulos inflamatorios como citocinas, patógenos microbianos y virus. La activación de este factor se ha detectado tanto en macrófagos como en células endoteliales y CML de lesiones ateroscleróticas[33]. A diferencia de otros factores de transcripción, la activación del NF-κB no requiere inducción de su expresión. Este factor se encuentra en forma de heterodímero inactivo en el citoplasma unido a proteínas inhibidoras denominadas genéricamente IκB. El heterodímero típico del NF-κB consiste en una subunidad p50 y otra p65. Cuando la célula es estimulada por alguno de los agentes mencionados anteriormente, IκB se fosforila y experimenta ubiquitinación, lo que sirve de «señal» para que sufra degradación proteolítica. Entonces, el dímero p50/p65 se transloca al núcleo, donde activa la transcripción de genes diana que poseen en su promotor elementos de respuesta κB (fig. 4). Entre los numerosos genes regulados por NF-κB se encuentran citocinas [factor necrosante de tumores (TNFα), interleucinas (IL)-1,-6 y -8], factores estimuladores de la formación de colonias de granulocitos/macrófagos (G-CSF, M-CSF, GM-CSF), MCP-1, el factor tisular, varias moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) y c-*myc*[34-36]. Por tanto, la activación del NF-κB parece ser un punto clave en la activación de múltiples efectos ligados al proceso aterosclerótico. Recientemente, su activación en leucocitos circulantes se ha asociado con la angina inestable y,

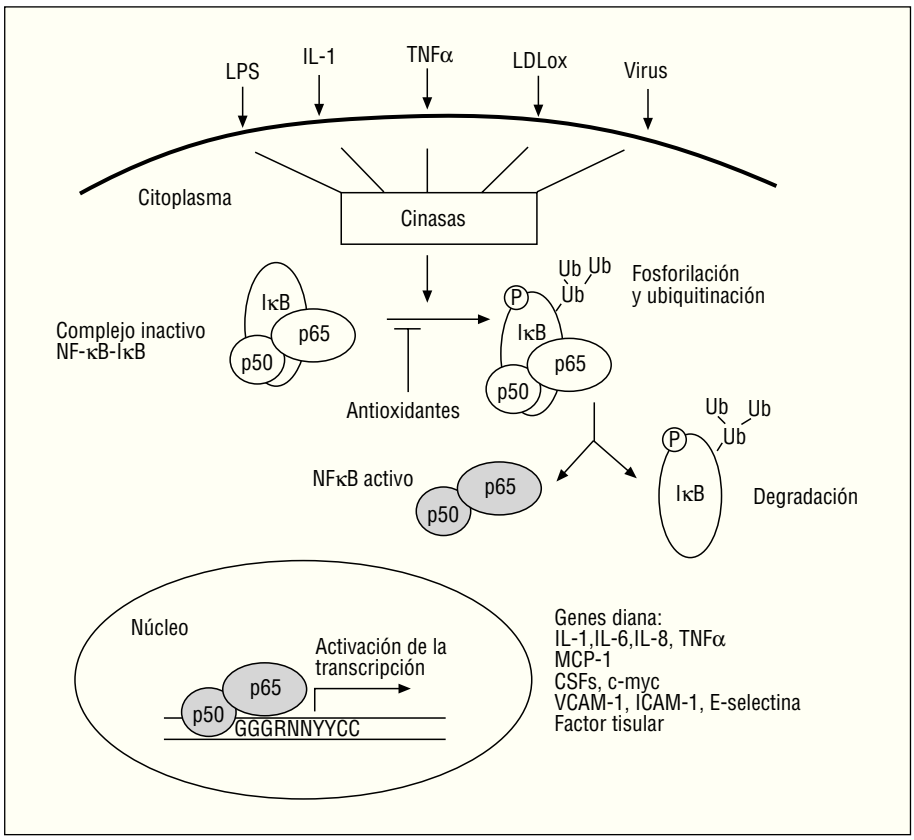

Fig. 4. Activación del factor NF-κB por diferentes agentes y modulación por dicho factor de la expresión de diferentes genes diana.

dado que dicha activación puede detectarse antes de un episodio clínico, se ha postulado que podría estar involucrado en la rotura de las placas que producen los síndromes coronarios agudos[37].

PAPEL DE LOS DISTINTOS TIPOS CELULARES DE LA PARED VASCULAR EN LA ATEROSCLEROSIS

Papel del endotelio: disfunción endotelial

El endotelio integra diversas funciones reguladoras que contribuyen a mantener la homeostasis de la pared vascular. Se ha denominado disfunción endotelial cualquier alteración de la fisiología del endotelio que produzca una descompensación de dichas funciones. El endotelio regula factores que, en algunos casos, operan antagónicamente. El endotelio regula el tono vascular mediante la producción de moléculas vasodilatadoras como el ON y la prostaciclina, y de sustancias vasoconstrictoras como la endotelina y la angiotensina II[38]. El endotelio posee también propiedades antitrombóticas gracias a que, en su cara luminal, el heparán se asocia a la antitrombina III y la activa, con lo que previene la activación de la trombina[39]. Por tanto, una disfunción endotelial puede producir una perturbación del balance entre los agentes vasoactivos o entre sus funciones pro y antitrombogénicas, con el consiguiente incremento de la adhesión de plaquetas. En la figura 5 se ilustra la alteración por concentraciones aterogénicas de LDL de los valores de expresión de la enzima NOS de células endoteliales (eNOS o NOS III), principal enzima reguladora de la producción de ON en el endotelio[40]. El endotelio expresa además proteínas de membrana que actúan como moléculas de adhesión para receptores específicos de monocitos y linfocitos T. Estas moléculas son selectinas como la E- y la P-selectina, denominadas así por su similitud estructural a las lectinas, y proteínas pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas como VCAM-1 y las moléculas 1, 2 y 3 de adhesión intercelular (ICAM-1, 2 y 3)[41]. El endotelio activado por agentes proinflamatorios expresa valores más elevados de estas moléculas de adhesión y de sustancias quimioatrayentes, lo que facilita la unión y migración de monocitos. El dominio extracelular de estas moléculas de adhesión puede fácilmente liberarse al torrente circulatorio; por ello, en la actualidad se evalúa la validez de los valores de los fragmentos solubles de estas moléculas como marcadores de evolución de las lesiones ateroscleróticas y procesos patológicos asociados[42,43].

Son múltiples los factores que pueden provocar una disfunción endotelial. Los más estudiados incluyen sustancias inmunorreguladoras como el TNF-α y la IL-1β, toxinas bacterianas como el lipopolisacárido y,

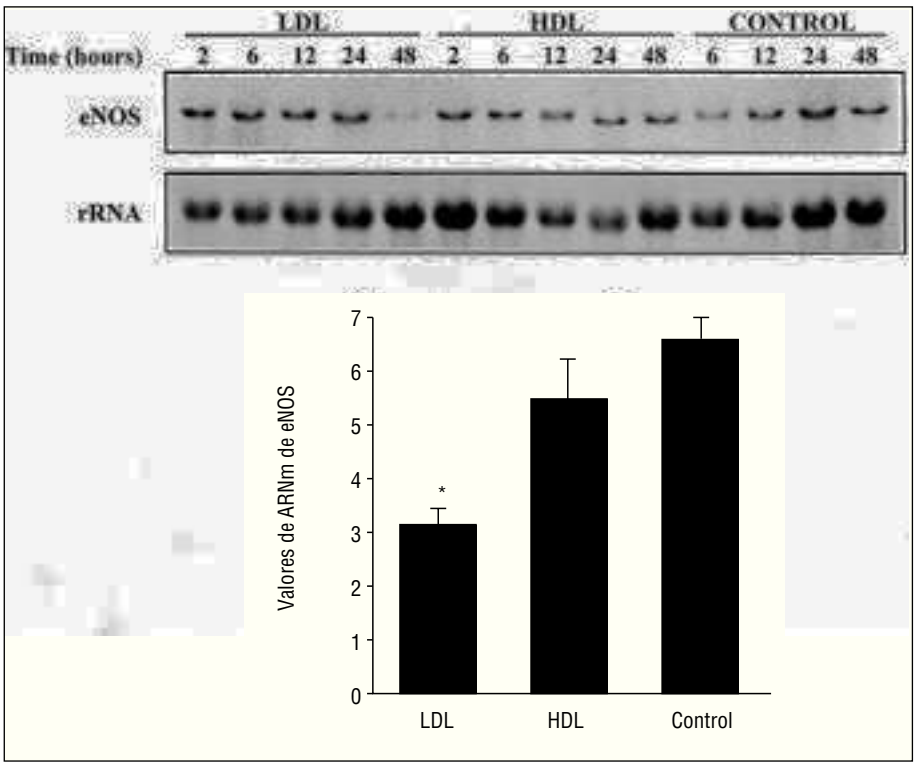

Fig. 5. Efecto de concentraciones crecientes de LDL nativas (mg/dl) sobre los valores de ARNm de eNOS de células endoteliales en cultivo, analizados mediante Northern blot. En la parte inferior, donde se presenta la tinción del gel con bromuro de etidio, se aprecian los valores de ARN ribosomal (rARN) 28S utilizados como control de carga del experimento. (Modificada de Vidal et al, 1997.)

sobre todo, el colesterol y las LDLox. En cultivos de células endoteliales se ha comprobado que las LDLox producen una disminución de la expresión de los títulos de mARN y de proteína de la enzima eNOS[29]. El ON liberado por el endotelio no sólo contribuye a mantener el tono arterial, sino que también evita la proliferación de las CML, disminuye la adhesión de monocitos y la agregación de plaquetas, y preserva de la oxidación a las LDL[44]. Por tanto, la disminución de la liberación de ON potencia el daño endotelial y facilita la proliferación de las CML inducida por mitógenos. En cambio, la sobreproducción de ON mediante un sistema experimental de transferencia génica *in vivo,* consistente en la sobrexpresión de la enzima eNOS mediante un vector adenovírico, bloquea eficazmente la formación de neoíntima inducida mediante dilatación con balón en el modelo porcino[45]. La importancia de esta enzima en la enfermedad cardiovascular la corroboran diferentes estudios que encuentran una asociación entre determinadas variantes polimórficas del gen de la eNOS, tanto en regiones codificantes como en la región promotora, con un mayor riesgo de enfermedad coronaria[46] o de espasmo coronario[47].

El endotelio también desempeña un papel clave en el proceso de angiogénesis que tiene lugar en las placas ateroscleróticas. En este proceso, se requieren la migración y proliferación de las células endoteliales para generar nuevos vasos en el interior de las lesiones. La angiogénesis es activada por diferentes factores, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF), cuya expresión aumenta en respuesta a ciertas condiciones desencadenantes del proceso como la hipoxia[48,49]. El VEGF es un factor angiogénico mitógeno para las células endoteliales, que aumenta la permeabilidad vascular y modula la trombogenicidad[50]. El VEGF estimula la liberación por parte de las células endoteliales de prostaciclina y ON, y a su vez el ON parece que actúa como un regulador endógeno que reduce la expresión del VEGF en la pared vascular[51]. Además de estos factores, que son generados *in situ* por las células que interaccionan en las lesiones ateroscleróticas, la trombina retenida por la matriz extracelular, donde permanece funcionalmente activa, parece desempeñar un papel clave en la regulación del proceso. La trombina posee actividad mitogénica para las células endoteliales[52] y modula la actividad de metaloproteasas que degradan la matriz extracelular y facilitan la migración celular[53].

Papel de los monocitos/macrófagos

Debido al carácter de respuesta inflamatoria-fibroproliferativa crónica del proceso aterosclerótico, los monocitos y linfocitos T tienen un papel clave tanto en su génesis como en la progresión de las lesiones. Uno de los episodios más tempranos en la formación de lesiones ateroscleróticas es la adhesión de monocitos circulantes al endotelio y su migración a la íntima[4]. El aumento de la unión de monocitos al endotelio parece

deberse a un incremento de la expresión, por parte del endotelio activado, de alguna de las moléculas de adhesión mencionadas anteriormente, que son inducidas por agentes proaterogénicos como citocinas o las LDLox. Los monocitos adheridos al endotelio penetran en la íntima, atraídos por las LDLox y otras sustancias quimiotácticas sintetizadas por el endotelio activado, como el MCP-1[26]. En la adhesión de los monocitos a la pared se ha propuesto un modelo según el cual una primera interacción lábil entre el monocito y el endotelio se produciría a través de las selectinas. En el endotelio activado, la sobrexpresión de VCAM-1 e ICAM-1 permitiría la unión más estable de los monocitos a través de receptores específicos. Por ejemplo, VCAM-1 se une específicamente a *very late antigen-4* (VLA-4) de los monocitos, que es un receptor perteneciente a la subfamilia b_1 de las integrinas. Posteriormente, el monocito atraviesa el endotelio a través de los espacios intercelulares donde participan otras proteínas especializadas como la molécula de adhesión plaquetar-1 (PECAM-1).

La activación en la íntima de los monocitos a macrófagos es estimulada por las LDL modificadas y diferentes moléculas producidas por los linfocitos T, las células endoteliales y las CML. Los linfocitos T producen interferón-γ (INF-γ) y TNF-α, que activan los monocitos, así como factores estimuladores de la formación de colonias como el GM-CSF, que estabilizan los macrófagos y estimulan su proliferación[4]. En ratones Knock-out para INF-γ se ha observado que la carencia de este gen protege contra la aterosclerosis. Los ratones deficientes en INF-γ presentan lesiones más ricas en colágeno y de menor contenido lipídico[54].

Captación de LDL modificadas: receptores scavenger

Uno de los procesos clave en el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas es la captación de LDL modificadas por los macrófagos. Los macrófagos poseen la capacidad de captar LDL modificadas en grandes cantidades y de convertirse en células espumosas[3]. La acumulación de células espumosas en la íntima conduce a la formación de la denominada estría grasa. La estría grasa corresponde a la lesión tipo II en la clasificación aceptada por la American Heart Association, que categoriza las lesiones ateroscleróticas en VIII fases o estadios[55].

La interacción de las LDL con los proteoglicanos de la íntima favorece los procesos de modificación y agregación de las LDL. En la agregación de las LDL parece que desempeñan un papel importante otros factores como la fuerza de cizalladura, y actividades enzimáticas como la fosfolipasa A_2 y la esfingomielinasa[56,57]. Las LDL agregadas (LDLag) aisladas de las lesiones ateroscleróticas son captadas ávidamente por macrófagos en cultivo mediante fagocitosis[58,59], mientras que las LDLox se captan a través de los receptores *scavenger*. Ninguno de estos mecanismos de captación de LDL está regulado por la concentración intracelular de colesterol, por lo que se produce acumulación de colesterol en los macrófagos y CML. Los receptores *scavenger* mejor caracterizados son los tipos I y II de la clase A, que han sido clonados en diferentes modelos animales y en humanos[60]. Estos receptores funcionan como proteínas de membrana homotriméricas. Cada monómero posee 6 dominios estructurales. Mediante estudios de mutagénesis dirigida se ha podido establecer que la región *colageno-like,* que posee una elevada carga positiva, constituye la región de unión a las LDLox. Además de la oxidación, cualquier modificación de las LDL que aumente su carga negativa posibilita su captación por este tipo de receptores, por ejemplo, la glucosilación no enzimática producida por concentraciones de glucosa en sangre asociadas a la diabetes[61]. En la tabla 1 se indican algunos de los receptores para lipoproteínas nativas y modificadas expresados por las células de la pared vascular sana y en las lesiones ateroscleróticas

TABLA 1. **Expresión de receptores lipoproteicos en arterias normales y ateroscleróticas**

	Arteria normal	Lesión aterosclerótica	Tipo celular
Receptores de la familia del LDL-R			
LDL-R	±	±	CML[62]
VLDL-R	+	++	EC, CML
LRP	++	+++	CML, MØ[62,63]
Receptores *scavenger*			
SR-AI y SR-AII	–	++	MØ, CML[62,63]
CD36	–	+	MØ
LOX-1	+	+	EC, CML[31]

Nivel de expresión: ±: ausente o bajo; +: moderado; ++: alto. CML: células musculares lisas de pared vascular; EC: células endoteliales: MØ: macrófagos; LDL-R: receptor de las LDL; VLDL-R: receptor de las VLDL; LRP: *low density lipoprotein receptor-related protein;* SR-AI y SR-AII: receptores *scavenger* de la clase A; CD36: receptor *scavenger* de la clase B; LOX-1: receptor del tipo lecitina que une LDL oxidada.

El colesterol libre es citotóxico, por lo que las células lo reesterifican por medio de la enzima aciltransferasa y lo acumulan, junto con triglicéridos y fosfolípidos, en el interior de vacuolas. Sin embargo, la capacidad de las células de acumular el colesterol es limitada. La formación de centros necróticos en las placas ateroscleróticas se atribuye precisamente a la lisis de células espumosas que han saturado su capacidad de neutralizar el colesterol libre por esta vía[64].

Degradación de la cubierta fibrosa por los macrófagos

La aterosclerosis puede contemplarse como un proceso inflamatorio crónico. Una característica fun-

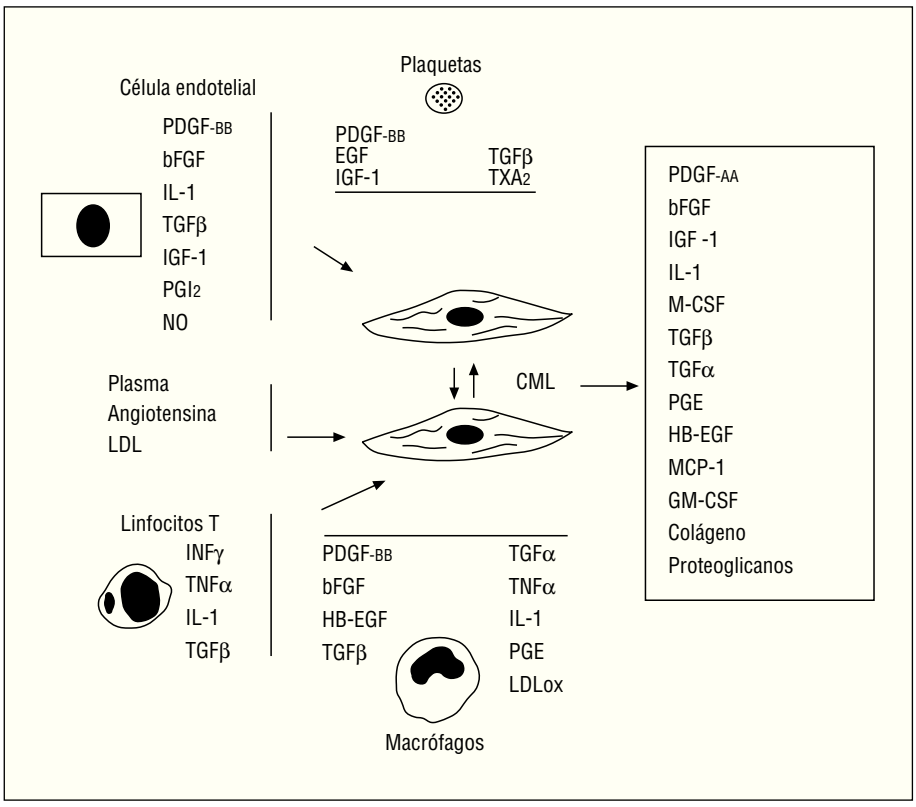

Fig. 6. Activación de las células musculares lisas (CML) por factores de crecimiento, citocinas y otras moléculas sintetizadas por diferentes células que participan en la aterogénesis (células endoteliales, plaquetas, células musculares lisas, linfocitos T y macrófagos). Se indican algunos de los factores de crecimiento, citocinas y macromoléculas cuya síntesis se ve afectada en el proceso de activación de las CML.

damental de cualquier respuesta inflamatoria es la actividad de enzimas con capacidad de degradar el tejido conectivo extracelular. En este proceso se atribuye un papel muy activo a los macrófagos que producen enzimas que degradan el tejido conectivo, como las metaloproteasas (colagenasa intersticial, gelatinasas y estromelisina)[65]. Las placas, de localización normalmente excéntrica, son más vulnerables a sufrir rotura o ulceración en las zonas de unión a la pared, región definida como el hombro de la placa[66]. Estas áreas contienen pocas CML; en cambio, en ellas abundan los macrófagos y linfocitos T, que secretan factores como TNF-α o IL-1β, los cuales activan la producción de metaloproteasas por parte de las CML y, sobre todo, los macrófagos[67]. La destrucción de la matriz extracelular por estas enzimas que degradan colágeno y proteoglicanos debilita la cápsula fibrosa de las placas y contribuye a su inestabilización y rotura.

En animales de experimentación se ha comprobado que, al disminuir las concentraciones plasmáticas de LDL mediante la dieta o fármacos hipolipemiantes, se reduce la cantidad de macrófagos en las lesiones y, por tanto, también disminuye la expresión de metaloproteasas que degradan la matriz extracelular[68] y otros marcadores de inflamación expresados por los macrófagos como la NOS inducible (iNOS o NOS II)[69-71], cuya expresión se ha asociado con un incremento del estrés oxidativo en las lesiones[72].

Papel de las células musculares lisas

Las CML son el componente celular mayoritario de las lesiones ateroscleróticas iniciales, donde puede alcanzar hasta el 90% del contenido celular[73], y también de la neoíntima de placas reestenóticas[74]. En cambio, en las lesiones avanzadas la fracción de CML que presenta marcadores de proliferación celular activa (p. ej., el antígeno nuclear de células proliferantes –PCNA–) es inferior al 1%[75]. En las lesiones avanzadas predomina la matriz extracelular sobre las CML, por lo que actualmente se cuestiona la relevancia de la proliferación de las CML en la aterosclerosis y se especula sobre el papel protector que pueden ejercer, sobre todo por la capacidad de las CML de sintetizar proteínas de matriz extracelular, principal componente de la cubierta fibrosa de las placas.

Las CML de la capa media son activadas por moléculas secretadas por el resto de células presentes en las lesiones ateroscleróticas[4], con lo que sufren una transformación fenotípica: CML de fenotipo contráctil no proliferativo se transforman en células que proliferan activamente, que migran atraídas por agentes quimiotácticos y que producen proteínas de matriz extracelular (colágeno, elastina y proteoglicanos). Esta transformación activa la expresión de genes que codifican receptores de membrana para factores de crecimiento como el PDGF. Además, se estimula la producción de factores de crecimiento

(PDGF, IGF-I, etc.) y citocinas (TGFβ, IL-1, etc.), a través de los cuales las CML modulan su propia actividad y la de otras células que intervienen en la aterogénesis. En la figura 6 se resumen algunos de los factores de crecimiento, citocinas y otras moléculas por medio de los cuales se modulan entre sí las actividades de las CML, células endoteliales y monocitos/macrófagos.

La rotura de una placa aterosclerótica espontánea, o provocada por una técnica de revascularización como la angioplastia, ocasiona la pérdida de los elementos antitrombóticos del endotelio, como el ON y la PGI_2, además de la exposición de estructuras de la pared que producen la formación de trombos[5]. Las plaquetas al agregarse liberan el contenido de sus gránulos ricos en mitógenos, como PDGF y el EGF, que inducen la migración y proliferación de las CML. Utilizando modelos animales, sobre todo el modelo porcino, se ha establecido que en los primeros días (1 a 4) se producen hipertrofia y cierta proliferación de las CML en la media. Posteriormente las CML migran a la íntima, donde proliferan activamente[76].

Activación de las células musculares lisas en la media y migración a la íntima

La migración de las CML es controlada de forma redundante por un conjunto de moléculas como el bFGF, PDGF, EGF, la trombina, la angiotensina II y otras[4]. Estos mitógenos inducen la expresión de proteasas que degradan la matriz extracelular, como la plasmina y metaloproteasas. La actividad de estas enzimas, cuya expresión se encuentra incrementada en las lesiones ateroscleróticas, facilita la migración de las CML. Por otra parte, el balance local entre la actividad del activador del plasminógeno tisular (t-PA) y del inhibidor-1 de dicho activador (PAI-1) puede repercutir en el proceso de migración de las CML y de síntesis/degradación de matriz extracelular y, por consiguiente, en la evolución de las lesiones. Los títulos de PAI-1 están incrementados en las placas ateroscleróticas, sobre todo debido a una producción aumentada por parte de las CML[77]. Una proteólisis mural aumentada puede potenciar la migración y proliferación de las CML. De hecho, al inducir lesiones intravasculares en animales deficientes en PAI-1, se observan un incremento de la migración de las CML y un mayor desarrollo de neoíntima, procesos que son inhibidos al sobrexpresar localmente PAI-1 mediante vectores adenovíricos[78]. Además, la plasmina participa en la activación de metaloproteasas que degradan la matriz extracelular[77] y del TGF-β, que es una citocina pluripotencial sintetizada en forma de zimógeno inactivo, que entre otras funciones estimula la producción de matriz extracelular [4].

Proliferación de las células muscualres lisas en la íntima y síntesis de matriz extracelular

Estudios realizados en diferentes modelos animales indican que el PDGF es clave en la proliferación de las CML en la íntima. La sobrexpresión de PDGF en la pared arterial, inducida *in vivo* con vectores plasmídicos, produce el engrosamiento extraordinario de la íntima[80]. Además, anticuerpos anti-PDGF bloquean la formación de neoíntima en el modelo de angioplastia en aorta de rata[81]. La pérdida del endotelio producida por una lesión vascular hace que persista, durante varias semanas, la interacción de plaquetas con la pared, lo que produce una liberación permanente de PDGF. Con la pérdida del endotelio, desaparece la inhibición que en condiciones normales ejerce el ON sobre la proliferación de las CML. Además del PDGF, otros agentes como la trombina y la angiotensina II promueven la proliferación de las CML. La trombina, que se genera en grandes cantidades en los focos de trombosis (< 130 nmol/l)[82], actúa como agente hipertrófico e induce la proliferación de las CML[83]. Los trombos murales pueden actuar como reservorio de trombina[84]; además, en las placas ateroscleróticas se ha detectado un aumento del número de receptores para la trombina en las CML y los macrófagos, lo que potencia su capacidad de respuesta[85]. La trombina y la angiotensina II también facilitan la acumulación de matriz extracelular, ya que activan la producción de PAI-1 y reducen la lisis de las proteínas de matriz por la plasmina[86].

El TGF-β, producido en lesiones ateroscleróticas sobre todo por los monocitos/macrófagos, induce la síntesis de matriz extracelular por las CML[4]. Se ha observado que la sobrexpresión de esta citocina en la pared vascular, mediante la transferencia de plásmidos de expresión encapsulados en liposomas, produce engrosamiento de la íntima por la acumulación masiva de colágeno secretado por las CML[87].

Inducción de genes ligados a la activación de las células musculares lisas

Tanto en las CML en cultivo como *in vivo* en modelos animales en los que se induce lesión en la pared, la proliferación de las CML no comienza hasta transcurridos 1 o 2 días de la exposición a mitógenos o inducción de lesión. Sin embargo, los mecanismos moleculares que activan las CML tienen lugar de forma inmediata[76]. Los mitógenos inducen la expresión de genes que se expresan débilmente o no se expresan en las CML en estado quiescente (no proliferativo), y cuyo mensaje es necesario para completar el ciclo celular. En primer lugar (transición de fase G_0/G_1), se induce la expresión de los llamados «genes de respuesta inmediata», que incluyen protooncogenes como c-*fos*, c-*jun* y c-*myc*[88]; la ciclooxigenasa-2, que es un gen marcador de respuesta inflamatoria[89], y otros como el

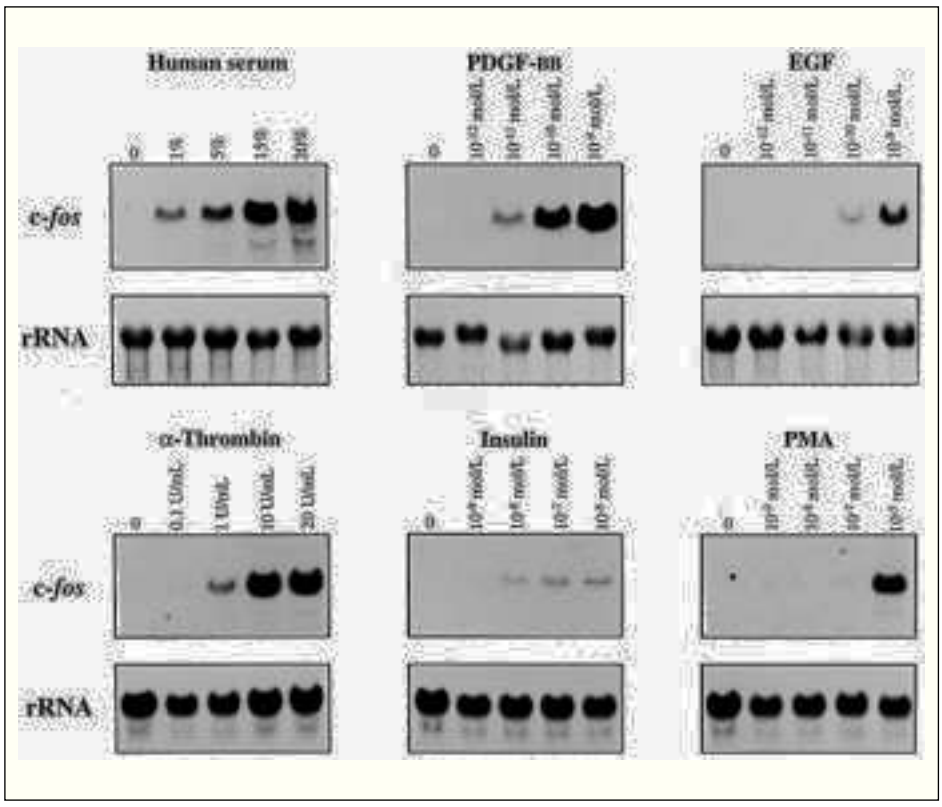

Fig. 7. Inducción de la expresión de c-*fos* en CML humanas en cultivo a los 30 min de estímulo con concentraciones crecientes de diferentes inductores. Los valores de mARN de c-*fos* y del ARN ribosomal (rRNA) utilizados como control se analizaron mediante la técnica de Northern blot. PDGF-BB: dímero BB del factor de crecimiento derivado de plaquetas; EGF: factor de crecimiento endotelial; PMA: 4-β-forbol-12-miristato-13-acetato (éster de forbol). (Modificada de Martínez-González et al 1997.)

MCP-1, que actúa como sustancia quimioatrayente para monocitos, o la trombospondina[90]. A medida que las CML progresan en el ciclo celular, se inducen otros genes como el PCNA, que es una apoproteína que actúa como cofactor del ADN polimerasa delta, enzima necesaria para la síntesis de ADN, y c-*myb* otro protooncogén homólogo al gen transformador del virus de la mieloblastosis aviar[91]. La expresión máxima de la mayoría de los genes de inducción temprana se alcanza entre las 2 y las 6 h posteriores a la inducción, tanto en células en cultivo como en experimentos *in vivo* en el modelo porcino[92]. En el caso de c-*fos*, la expresión es más transitoria, alcanza un máximo entre 30 y 45 min, y al cabo de 2 h sus valores descienden a los basales. En la figura 7 se presenta el efecto del tiempo en la inducción de c-*fos* en CML humanas estimuladas con distintos factores de crecimiento potencialmente implicados en la aterogénesis.

El número de genes vinculados a la activación de las CML es, en realidad, más amplio y aumenta a medida que la tecnología del ADN recombinante se ha aplicado sistemáticamente para aislar genes involucrados en este proceso. Recientemente, nuestro grupo ha comunicado el aislamiento y caracterización de un nuevo gen *(Nor-1)* que se induce, en las CML estimuladas con suero, PDGF y trombina[93]. Este gen se ha implicado en procesos de apoptosis y migración celular en otros sistemas celulares[94,95], por lo que potencialmente podría estar involucrado en la regulación de la población de CML en lesiones ateroscleróticas, proceso que resulta clave tanto en la evolución como en la estabilización de las lesiones.

Para que se produzca la inducción de la expresión de los genes ligados a la activación de las CML, es necesario que el estímulo que aporta el mitógeno en la membrana celular se transmita a la maquinaria que regula la transcripción en el núcleo. La mayor parte de los factores de crecimiento actúan sobre las CML a través de receptores específicos pertenecientes a la familia de receptores tirosincinasa que activan la vía de las cinasas dependientes de mitógenos (MAP cinasas) a través de Ras[96]. Los receptores tirosincinasa poseen un dominio extracelular que confiere la especificidad de ligando; un dominio transmembrana, y un dominio citoplasmático con actividad tirosincinasa. Cuando se une un factor de crecimiento a su receptor, éste se autofosforila en residuos de tirosina del dominio citoplasmático. Estos residuos tirosina fosforilados son un blanco para proteínas citoplasmáticas como Grb2, que actúa como conector con Sos, que es una molécula que estimula el intercambio de nucleótidos de Ras. Ras es una proteína que se une a la membrana plasmática mediante grupos isoprenoides (farnesilo) y que, en estado inactivo, está unida a GDP. La unión Grb2-Sos activa Ras mediante el intercambio de GDP por GTP. Ras activado desencadena una cascada de fosforilación a través de Raf, que transmite la señal, mediante la vía de las MAP cinasas hasta el núcleo, donde se promueve

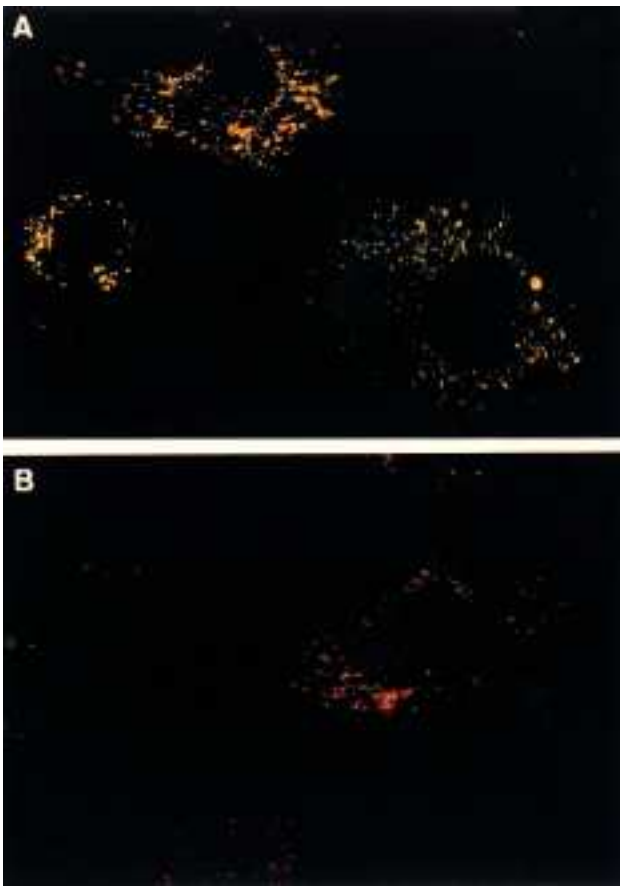

Fig. 8. Colocalización de LDL modificada por agregación y *low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP) en células musculares lisas (CML). Fotografías de microscopia confocal de CML incubadas con anticuerpos anti-LRP (cadena β) (en verde) y con 50 µg/mL de LDL agregadas (A) o nativas (B) marcadas con el marcador fluorescente 1,1'-dioctadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI) (en rojo) (magnificación ×5.000). (Modificada de Llorente-Cortés et al, 2000.)

la expresión de factores de transcripción que controlan el proceso de proliferación celular. El proceso es en realidad más complejo, porque normalmente se activan vías paralelas en las que participan otras proteínas; sin embargo, la vía común en la que confluyen diferentes señales parece ser la vía de las MAP cinasas dependientes de Ras[97]. En el sistema cardiovascular esta vía es activada, además de por mitógenos, por citocinas y por inductores de estrés e hipertrofia[98].

Formación de células espumosas a partir de células musculares lisas

Las CML que proliferan activamente tienen una gran capacidad de sintetizar proteoglicanos que, al interaccionar con las LDL, favorecen su agregación y captación por las CML y macrófagos[99,100]. Las CML activadas expresan receptores *scavenger* a través de los cuales captan LDL modificadas[101] y dan origen a células espumosas[59]. Nuestro grupo ha demostrado que las CML también captan las LDLag a través del *low density lipoprotein receptor-related protein* (LRP)[102] y acumulan cantidades significativas de ésteres de colesterol, considerados un marcador de formación de célula espumosa[103]. En la figura 8A se observa la colocalización en las CML de LDLag marcadas con un producto fluorescente y LRP marcado con un anticuerpo específico. LRP es un receptor endocítico multifuncional de 600 kDa que pertenece a la familia de los receptores de LDL y que es altamente expresado en las CML de pared vascular (tabla 1). El receptor activo consta de dos cadenas: una de unión a ligandos (cadena α) y otra de anclaje en la membrana (cadena β)[104]. El LRP une distintos ligandos que incluyen lactoferrina, trombospondina, distintas lipoproteínas plasmáticas tales como VLDL, LpL, complejos LpL-lipoproteínas ricas en triglicérido y Lp (a). Puesto que el LRP está altamente expresado en CML y que este receptor no está regulado por las concentraciones intracelulares de colesterol, el LRP puede considerarse un mecanismo de alta capacidad/baja especificidad que permite la captación por las CML de una gran cantidad de LDLag. Las LDL modificadas *in vitro* por agregación son similares en estructura a las que se han encontrado en las lesiones ateroscleróticas[105,106]. La retención y agregación de la LDL subendotelial son procesos clave en la aterogénesis y, puesto que el LRP está altamente expresado en las lesiones ateroscleróticas[62,63,107], la captación de LDL modificada por agregación a través del LRP podría tener un papel significativo en la acumulación intracelular de lípido en CML en placas ateroscleróticas.

BIBLIOGRAFÍA

1. 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: 242-250.
2. 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: 310-318.
3. Brown MS, Goldstein JL. Lipoprotein metabolism in the macrophage: implications for cholesterol deposition in atherosclerosis. Annu Rev Biochem 1983; 52: 223-261.
4. Ros R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. Nature 1993; 362: 801-808.
5. Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi. Circulation 1992; 86 (Supl III): 74-85.
6. Group SSSS. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patiens with coronary heart disease: Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). Lancet 1994; 344: 1383-1389.
7. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW et al. Prevention of coronany heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. N Engl J Med 1995; 33: 1301-1307.
8. Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG et al, for the Cholesterol and recurrent Events Trial In-

vestigators. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. N Engl J Med 1996; 335: 1001-1009.
9. The Long-term Intervention with Pravastatin in Patients with Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. N Engl J Med 1998; 339: 1349-1357.
10. Downs JR, Clearfield M, Weis S, Whitney E, Shapiro DR, Beere PA et al. Primary prevention of acute coronary events with lovastatin in men and women with average cholesterol levels: results of AFCAPS/TexCAPS. Air Force/Texas Coronary Atherosclerosis prevention Study. JAMA 1998; 279: 1615-1622.
11. Zeiher AM, Drexler H, Wollschlager H, Just H. Modulation of coronary vasomotor tone in humans. Progressive endothelial dysfunction with different early stages of coronary atherosclerosis. Circulation 1991; 83: 391-401.
12. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherosclerosis. Science 1991; 251: 788-791.
13. Pritchard KA Jr, Wong PY, Stemerman MB. Atherogenic concentrations of low-density lipoprotein enhance endothelial cell generation of epoxyeicosatrienoic acid products. Am J Pathol 1990; 136: 1383-1391.
14. Vidal F, Colomé C, Martínez-González J, Badimon L. Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins downregulate nitric-oxide-synthase mRNA and protein levels in endothelial cells. Eur J Biochem 1998; 252: 378-384.
15. Pritchard KA Jr, Groszek L, Smalley DM, Sessa WC, Wu M, Villalon P et al. Native low-density lipoprotein increases endothelial cell nitric oxide synthase generation of superoxide anion. Circ Res 1995; 77: 510-518.
16. Smalley DM, Lin JHC, Curtis ML, Kobari Y, Stemerman MB, Prichard KA. Native LDL increases endothelial cell adhesiveness by inducing intercellular adhesion molecule-1. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16: 585-590.
17. Yu X, Dluz S, Graves DT, Zhang L, Antoniades HN, Hollander W et al. Elevated expression of monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 89: 6953-6957.
18. Koschinsky T, Bünting CE, Rütter R, Gries FA. Increased growth stimulation of human vascular cells by serum from patients with primary hyper-LDL-cholesterolemia. Atherosclerosis 1987; 63: 7-13.
19. Mata P, Varela O, Lahoz C, Alonso R, de Hoya M, Badimon L. Monounsatured and polyunsatured n-6 fatty acid-enriched diets modify LDL oxidation and decrease human coronary smooth muscle cell DNA synthesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 2088-2096.
20. Camejo G, Hurt-Camejo E, Olsson U, Böndjers G. Proteoglycans and lipoproteins. Curr Opin Lipidol 1993; 4: 385-391.
21. Camejo G, Hurt E, Romano M. Properties of lipoprotein complexes isolated by affinity chromatography from human aorta. Biochem Biophys Acta 1985; 44: 389-401.
22. Steinberg D, Lewis A. Conner memorial lecture. Oxidative modification of LDL and atherogenesis. Circulation 1997; 95: 1062-1071.
23. Parhami F, Fang ZF, Fogelman AM, Andalibi A, Territo MC, Berliner JB. MM-LDL induced inflammatory responses in endothelial cells are mediated by cAMP. J Clin Invest 1993; 92: 471-478.
24. Colomé C, Martínez-González J, Vidal F, De Castellarnau C, Badimon L. Small oxidative changes in atherogenic LDL concentrations irreversiblely regulate adhesiveness of human endothelial cells. Effect of the lazaroid U74500A. Atherosclerosis 2000; 149: 295-302.
25. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expresed in human atherosclerotic lesions. J Clin Invest 1994; 94: 437-444.
26. Kawamura M, Heinecke JW, Chait A. Pathophysiological concentrations of glucose promote oxidative modification of low density lipoprotein by a superoxide-dependent pathway. J Clin Invest 1994; 94: 771-778.
27. Navab M, Imes SS, Hama SY. Monocyte transmigration induced by modification of low density lipoprotein in cocultures of human aortic wall cells is due to induction of monocyte chemotactic protein 1 synthesis and is abolish by high density lipoprotein. J Clin Invest 1991; 88: 2039-2046.
28. Vora DK, Fang Z, Parhami F, Fogelman A, Territo M, Berliner J. P-selectin induction by mmLDL and its expression in human atherosclerotic lesons. Circulation 1994; 90: 1-83.
29. Sata M, Walsh K. Oxidized LDL activates Fas-mediated endothelial cell apoptosis. J Clin Invest 1998; 102: 1682-1689.
30. Liao JK, Shin WS, Lee WY, Clark SL. Oxidized low-density lipoprotein decreases the expression of endothelial nitric oxide synthase. J Biol Chem 1995; 270: 319-324.
31. Kataoka H, Kume N, Miyamoto S, Minami M, Moriwaki H, Murase T et al. Expression of lectinlike oxidized low-density lipoprotein receptor-1 in human atherosclerotic lesions. Circulation 1999; 99: 3110-3117.
32. Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R et al. Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. J Clin Invest 1996; 97: 1715-1722.
33. Brand K, Eisele T, Kreusel U, Page M, Page S, Haas M et al. Dysregulation of monocutic nuclear factor-kB by oxidized low.density lipoprotein. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 1901-1909.
34. Baeuerle PA, Henkel T. Function and activation of NFkB in the immune system. Annu Rev Immunol 1994; 12: 141-179.
35. Thanos D, Maniatis T. NF-kB: a lesson in family values. Cell 1995; 80: 529-532.
36. Bourcier T, Sukhova G, Libby P. The nuclear factor k-B signaling pathway participates in dysregulation of vascular smooth muscle cells in vitro and in human atherosclerois. J Biol Chem 1997; 272: 15817-15824.
37. Ritchie ME. Nuclear factor-kB is selectively and markedly activated in humans with unstable angina pectoris. Circulation 1998; 98: 1707-1713.
38. Moncada S, Vane JR. Arachidonic acid metabolites and the interactions between platelets and blood-vessel walls. N Engl J Med 1979; 300: 1142-1147.
39. Jackson RL, Busch SJ, Cardin AD. Glycosaminoglycans. molecular properties, protein interactions and role in physiological processes. Physiol Rev 1991; 71: 481-539.
40. Vidal F, Colomé C, Martínez-González J, Badimon L. Atherogenic concentrations of native low density lipoproteins modulates niric oxide synthase gene expression in endothelial cells. Eur J Biochem 1998; 252: 374-384.
41. Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. J Am Coll Cardiol 1994; 24: 1591-1601.
42. Ikeda H, Takajo Y, Ichiki K, Ueno T, Maki S, Noda T et al. Increased soluble form of P-selectin in patients with unstable angina. Circulation 1995; 92: 1693-1696.
43. Frijns CJM, Kappelle LJ, Van Gijn J, Nieuwenhuis HK, Sixma JJ, Fijnheer R. Soluble adhesion molecules reflect endothelial cell activation in ischemic stroke and in carotid atherosclerosis. Stroke 1997; 28: 2214-2218.
44. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthase: roles, tolls and controls. Cell 1994; 78: 915-918.
45. Varenne O, Pislaru S, Gillijns H, Pelt NV, Gerard RD, Zoldhelyi P et al. Local adenovirus-mediated transfer of endothelial nitric oxide synthase reduces luminal narrowing after coronary angioplasty in pigs. Circulation 1998; 98: 919-926.
46. Hingorani AD, Liang CF, Fatibene J, Lyon A, Monteith S, Parsons A et al. A common variant of the endothelial nitric oxide synthase (Glu^{298} (Asp) is a major risk factor for coronary artery disease in the UK. Circulation 1999; 100: 1515-1520.

47. Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki Y, Kugiyama K, Ogawa H et al. $T^{-786} \rightarrow C$ mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. Circulation 1999; 99: 2864-2870.
48. Brogi 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: 649-652.
49. Chen CH, Henry PD. Atherosclerosis as a microvascular disease: impaired angiogenesis mediated by suppressed basic fibroblast growth factor expression. Proc Assoc Am Physicians 1997; 109: 351-361.
50. 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: 2108-2116.
51. Goligorsky MS, Budzikowski AS, Tsukahara h, Noiri E. Cooperation between endothelium and nitric oxide in promoting endothelial cell migration and angiogenesis. Clin Exp Pharmacol Physiol 1999; 26: 269-271.
52. Herbert JM, Dupuy E, Laplace MC, Zini J-M, Bar-Shavit R, Toberlem G. Thrombin induces endothelial cell growth via both a proteolitic and a non-proteolitic pathway. Biochem J 1994; 303: 227-231.
53. Duhamel-Clérin 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: 1931-1938.
54. Gupta S, Pablo AM, Jiang XC, Wang N, Tall AR, Schindler C. IFN-γ potenciates atherosclerosis in apoE Knock-out mice. J Clin Invest 1997; 99: 2752-2761.
55. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glasgov S, Insull W et al. A definition of advances types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the committee on vascular lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation 1995; 92: 1355-1374.
56. Öörni K, Hakala JK, Annila A, Ala-korpela M, Kovanen PT. Sphingomyelinase induces aggregation and fusion, but phospholipase A_2 only aggregation, of low density lipoprotein (LDL) particles. J Biol Chem 1998; 44: 29127-29134.
57. Maor I, Aviram M. Macrophage released proteoglycans are involved in cell-mediated aggregation of LDL. Atherosclerosis 1999; 142: 57-66.
58. Heinecke JW, Suits A, Aviram M, Chait A. Phagocytosis of lipase agreggated low density lipoprotein promotes macrophage foam cell formation: sequencial morphological and biochemical events. Arterioscler Thromb 1991; 11: 1643-1651.
59. Vijayagopal P, Glancy L. Macrophages stimulate cholesteryl ester accumulation in cocultured smooth muscle cells incubated with lipoprotein-proteoglycan complex. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16: 1112-1121.
60. Freeman MW. Macrophage scavenger receptors. Curr Opin Lipid 1994; 5: 143-148.
61. Bucala R, Makita Z, Vega G, Grundy S, Koschinsky T, Cerami A et al. Modification of low density lipoprotein by advances glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insuficiency. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 9441-9445.
62. Timo PH, Luoma JS, Nikkari T, Ylä-Herttuala S. Expression of LDL receptor, VLDL receptor, LDL receptor-related protein, and scavenger receptor in rabbit atherosclerotic lessions. Circulation 1998; 97: 1079-1086.
63. Luoma J, Hiltunen T, Särkioja T, Moestrup SK, Gliemann J, Kodama T et al. Expression of α2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein and scavenger receptor in human atherosclerotic lesions. J Clin Invest 1994; 93: 2014-2021.
64. Guyton JR, Klemp KF. Development of the lipid-rich core in human atherosclerosis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1996; 16: 4-11.
65. Shah PK, Falk E, Badimon JJ, Fernández-Ortiz A, Mailhac A, Villareal-Levy G et al. 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 1995; 92: 1565-1569.
66. Fuster V. Elucidation of the role of plaque instability and rupture in acute coronay events. Am J Cardiol 1995; 76: 24C-33C.
67. Rajavashisth TB, Xu XP, Jovinge S, Maisel S, Xu XO, Chai NN et al. Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques. Circulation 1999; 99: 3103-3109.
68. Aikawa M, Rabkin E, Okada Y, Voglic SJ, Clinton SK, Brinckerhoff CE et al. Lipid lowering by diet reduces matrix metalloproteinase activity and increases collagen content of rabbit atheroma: a potential mechanism of lesion stabilization. Circulation 1998; 97: 2433-2444.
69. Bustos C, Hernández-Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Pérez F et al. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. J Am Coll Cardiol 1998; 32: 2057-2064.
70. Alfon J, Guasch JF, Berrozpe M, Badimon L. NOS II gene expression correlates with atherosclerotic intimal thickening. Preventive effects of HMG-CoA reductase inhibitors. Atherosclerosis 1999; 145: 325-331.
71. Alfon J, Palazón CP, Royo T, Badimon L. Effects of statins in thrombosis and aortic lesion development in a dyslipemic rabbit model. Thromb Haemost 1999; 81: 822-827.
72. White CR, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D et al. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. Proc Natl Acad Sci USA 1994; 91: 1044-1048.
73. Wissler RW, Vesselinovitch D, Komatsu A. The contribution of studies of atherosclerotic lesions in young people to future research. Ann NY Acad Sci 1990; 598: 418-434.
74. Ip JH, Fuster V, Badimon L, 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.
75. Gordon D, Reidy MA, Benditt EP, Schwartz SM. Cell proliferation in human coronary arteries. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 87: 4600-4604.
76. Fuster V, Falk E, Fallon JT, Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. The three processes leading to post PTCA restenosis: dependence on the lesion substrate. Thromb Haemostasis 1995; 74: 552-559.
77. Schneider Dj, Ricci MA, Taatjes DJ, Baumann PQ, Reese JC, Leavitt BJ et al. Changes in arterial expresion of fibrinolytic system proteins in atherogenesis. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 3294-3301.
78. Carmeliet P, Moons L, Lijnen R, Janssens S, Lupu F, Collen D et al. Inhibitory role of plasminogen activator inhibitor-1 in arterial wound healing and neointima formation: a gene targeting and gene transfer study in mice. Circulation 1997; 96: 3180-3191.
79. Lee E, Vaughan DE, Parikh SH, Grodzinsky AJ, Libby P, Lark MW et al. Regulation of matrix metalloproteinases and plasminogen activator inhibitor-1 synthesis by plasminogen in cultured human vascular smooth muscle cells. Circ Res 1996; 78: 44-49.
80. Nabel EG, Liptay S, Yang ZY, Liptay S, San H, Gordon D et al. r-PDGF gene expression in porcine arteries induces intimal hyperplasia *in vivo*. J Clin Invest 1993; 91: 1822-1829.
81. Ferns AA, Raines EW, Sprugel KH, Motani AS, Reidy MA, Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. Science 1991; 253: 1129-1132.
82. Walz DA, Anderson GF, Ciaglowski RE, Aiken M, Fenton II JW. Thrombin-elicited contractile responses of aortic smooth muscle. Proc Soc Exp Biol Med 1985; 180: 518-526.

83. Varela O, Martínez-González J, Badimon L. The response of smooth muscle cells to a-thrombin depends on its arterial origin: comparison among different species. Eur J Clin Invest 1998; 28: 313-323.
84. Meyer BJ, Badimon JJ, Mailhac A, Fernández-Ortiz A, Chesebro JH, Fuster V et al. Inhibition of growth of thrombus on fresh mural thrombus: targeting optimal therapy. Circulation 1994; 90: 2432-2438.
85. Nelken NA, Soiler J, O'Keefe J, Vu TK, Charo I, Coughlin S. Thrombin receptor expression in normal and atherosclerotic human arteries. J Clin Invest 1992; 90: 1614-1622.
86. Noda H, Fuji S, Sobel B. Induction of vascular SMC expression of PAI-1 by thrombin. Circ Res 1993; 72: 36-43.
87. Nabel EG, Shum L, Pompili VJ, Yang Z-Y, San H, Shu HB et al. Direct gene transfer of TGF-β1 intheearterial wall stimulates fibrocellular hyperplasia. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90: 10759-10764.
88. Martínez-González J, Viñals M, Vidal F, Llorente-Cortes V, Badimon L. Mevalonate deprivation impairs IGF-I/insulin signaling in human vascular smooth muscle cells. Atherosclerosis 1997; 135: 213-223.
89. Viñals M, Martínez-González J, Badimon JJ, Badimon L. HDL-induced prostacyclin release in smooth muscle cells is dependent on cyclooxynase-2 (Cox-2). Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 3481-3488.
90. Patel MK, Lymn JS, Clunn GF, Hughes AD. Thrombospondin-1 is a potent mitogen and chemoattractant for human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1997; 17: 2107-2114.
91. Brown KE, Kindy MS, Sonenshein GE. Expression of the c-*myb* proto-oncogene in bovine vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 1992; 267: 4625-4630.
92. Badimon L, Alfon J, Royo T, Berrozpe M, Martínez-González J, Vidal F et al. Cell biology of restenosis post-angioplasty. Z Kardiol 1995; 84: 145-149.
93. Castello A, Cases C, Martínez-González J, Badimon L. A nuclear hormone receptor gene is up-regulated by thrombin in smooth muscle cells. Eur Heart J 1999; 30: 357.
94. Ohkura N, Hijikuro M, Miki K. Antisense oligonucleotide to NOR-1, a novel orphan nuclear receptor, induces migration and neurite extension of cultured forebrain cells. Mol Brain Res 1996; 35: 309-313.
95. Cheng LE, Chan FK, Cado D, Winoto A. Functional redundancy of the Nur77 and Nor-1 orphan steroid receptors in T-cell apoptosis. EMBO J 1997; 16: 1865-1875.
96. Van deer Geer P, Hunter T. Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. Annu Rev Cell Biol 1994; 10: 251-337.
97. Davis R. The mitogenic-activated protein kinase signal transduction pathway. J Biol Chem 1993; 268: 14553-14556.
98. Bogoyevitch MA. Signalling via stress-activated mitogen-activated protein kinases in the cardiovascular system. Cardiovasc Res 2000; 45: 826-842.
99. Tertov VV, Orekhov AN, Sobenin ZA, Gabbasov A, Popov EG, Yaroslavov AA et al. Three types of naturally ocurring modified lipoproteins induce intracellular lipid accumulation due to lipoprotein aggregation. Circ Res 1992; 71: 218-228.
100. Tabas I, Yueqing L, Brocia RW, Wen Xu S, Swenson TL, Williams KJ. Lipoprotein lipase and sphingomyelinase sinergistically enhance the association of atherogenic lipoproteins with smooth muscle cells and extracellular matrix. J Biol Chem 1993; 268: 20419-20432.
101. Inaba T, Gotoda T, Shimano H, Shimada M, Harda K, Kozaki K et al. Platelet-derived growth factor induces c-*fms* and scavenger receptor genes in vascular smooth muscle cells. J Biol Chem 1992; 267: 13107-13112.
102. Llorente-Cortés V, Martínez-González J, Badimon L. Low density lipoprotein receptor-related protein mediates the uptake of aggregated low density lipoprotein in human vascular smooth muscle cells. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2000 (en prensa).
103. Llorente-Cortés V, Martínez-González J, Badimon L. 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 1998; 18: 738-746.
104. Herz J, Kowal RC, Goldstein JL, Brown MS. Proteolytic processing of the 600 Kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. EMBO J 1988; 9: 1769-1776.
105. Guyton JR, Klemp KF, Mims MP. Altered ultrastructural morphology of self-aggregated low density lipoproteins: coalescence of lipid domains forming droplets and vesicles. J Lipid Res 1991; 32: 953-961.
106. Tamminen M, Mottino G, Qiao JH, Breslow JL, Frank JS. Ultrastructure of early lipid accumulation in apoE-deficient mice. Arterioscler Thromb Vasc Biol 1999; 19: 847-853.
107. Berrozpe M, Llorente V, Badimon L. Expression of low density lipoprotein receptor-related protein in human coronary atherosclerotic plaques. Kardiovasckuläre Medizin 1999; 2: 75.