



Efectes protectors de dues estratègies de control de risc cardiovascular sobre la paret vascular

Francesc Xavier Duran Sanmartí

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
FACULTAT DE BIOLOGIA
UNIVERSITAT DE BARCELONA

EFECTES PROTECTORS DE DUES ESTRATÈGIES DE
CONTROL DE RISC CARDIOVASCULAR
SOBRE LA PARET VASCULAR

FRANCESC XAVIER DURAN SANMARTÍ
MAIG 2010

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR
UNIVERSITAT DE BARCELONA
PROGRAMA DE DOCTORAT DE BIOMEDICINA, BIENNI 2001-2003
MEMÒRIA DE FRANCESC XAVIER DURAN SANMARTÍ, LLICENCIAT EN BIOLOGIA,
PER OPTAR AL GRAU DE DOCTOR PER LA UNIVERSITAT DE BARCELONA

L'interessat

Francesc Xavier Duran Sanmartí

Vist i plau del director i tutor



Dra. Lina Badimon Maestro
Directora de tesi

Dra. Roser Iglesias Coll
Tutora de tesi

Per tu, Laia

AGRAIMENTS

Sense cap mena de dubte puc dir que la realització d'aquesta tesi doctoral ha sigut l'experiència acadèmica més llarga de la meua vida. Tan llarga com enriquidora. He après moltes coses importants; el valor del companyerisme, els límits de la paciència, que existeix realment l'esperit de superació, i la perseverança, que les cèl·lules en cultiu no tenen horaris,.... Més enllà de l'estrictament científic i tècnic, puc dir que ha sigut tot un repte!

Totes aquestes experiències, però, no haguessin sigut possibles sense la presència i l'ajuda de tota la gent que ha compartit amb mi aquest temps. En primer lloc, vull agrair a la Dra. Lina Badimon l'oportunitat que em va donar de poder entrar al seu grup i poder gaudir de la realització d'aquesta tesi doctoral. La ciència és una matèria que té vida pròpia però no s'escapa de la rigorositat dels convencionalismes dels homes. El treball en equip i l'experiència dels companys més veterans han sigut un bon salvavides a l'hora de salvar les "rigorositats". Moltes gràcies, Gemma, per la teua paciència i el teu saber fer. Han sigut de gran ajuda! Vicenta, gràcies també pels consells i la paciència al principi de la meua tesi.

Especialment, al principi, em quedo amb l'ensenyament i amistat de la Nuri, que dia a dia em va fer veure el laboratori com la meua segona casa. La Sònia, amb qui vaig compartir les batalletes dels primers experiments i a qui dec bona part del que és aquesta tesi avui dia, gràcies. Pablo, amic, aquesta tesi no hagués sigut la mateixa sense el teu suport i els teus ànims! El lema "tesi, tesi" ha sigut definitiu! Rosa i Marta (Otero), gràcies per donar vida al dia a dia. Oriol (Llampayes), qui ho anava a dir que compartiríem el que vam compartir! Una part d'aquesta tesi és teua, ningú te la pren.... Judith! Quant més trist que hagués sigut aquesta tesi sense tu! No canviis! Albert, gràcies per deixar-me compartir amb tu el teu entusiasme i, sobretot, els moments més "explosius", en tots els sentits, d'aquest temps! Una altra part d'aquesta tesi també és ben teua. Mari, qui t'anava a dir que durant aquest temps troberies al Dani. Un plaer haber-lo compartit amb vosaltres! Els consells i les xerrades "didàctiques" de la Maribel i la Carme em van donar idees i força per tirar endavant, moltes gràcies! I també agrair, a la resta de companys del CSIC, l'ajuda del dia a dia a, Vanessa, Sandra, Marta (Miguel), Laura, Nia.

No em vull oblidar de la gent del "Sant pau" (antic pabelló 10), on vaig començar les primeres setmanes. L'Olga que va haver de fer el "sacrifici" d'ensenyar-me la seva feina més preuada per continuar-la fent després, gràcies. Oriol (Juan), quina sort haver-

te conegut! Quantes coses bones que m'has ensenyat i les que em queden per aprendre, Un bon tros d'aquesta tesi també és teva! Itziar, gràcies per ensenyar-me els secrets de les ELISAs. I al Jordi, Javi (crespo), Berta, Cristina, Sílvia (Aguiló), Javi (Fernández), Lluís i Pepe, l'haver estat allà.

Tampoc m'oblido dels companys que vaig tenir al ICCC i dels petits grans moments amb cadascun d'ells: M^o José (Pastor), Mónica (Carabias), M^o Àngels, Paula -Viva Utah y puxa Xixón!-, Laura (Nasarre) -Olé Barbastro-, Sonia (Veiga) -Galicia de mis amores!-, Sonia (Huertas), Blanca (Molins) -encantat, doctora!-, Blanca (Oñate), Mónica (pescador) -hoy rubia, mañana...-, Mònica (Tous), Mònica (Barco), Gemma (Arderiu), Maria (Borrell), Marta (Sánchez), Valentina, Rodrigo, José Luís, Montse, Judit (cubedo), Maisa, Ester, Raquel, Loli, Teresa, Rosa (Suàdez), Vinyet, Maria (González), Anna (Guadall), Mauricio, Olivier, Rosa (ledo), Pablo (Fuentes), Maria (Corral), Elena, Mar, David, Jordi (Farré), Marta (Vilalta), Jerónimo, Núria (Rubio), Juli, Norma, Ana (Luque), Ana (Koetzova) -Un placer haberte conocido-, Diego -Gracias por comprobar que mi corazón estaba "dentro de la normalidad"!-, Chema! Ànims que tu pots! Tan de bo hi hagués més gent com tu! Un plaer haver treballat amb tu!

També donar les gràcies a la secció administració, comunicació i manteniment, que sense vosaltres la nostra feina seria impossible! Sílvia (Morató), Pepi, M^a José (Bartolomé), Núria (Nadal), Montserrat, Maria (martínez), Judit (Calleja), Alba, Raül, Marga -grans cardiocurts!-, Fabio i Roger.

Y no por ser el último (no me olvido de ti), no creas que eres el menos importante... ¡Al revés! Amigo Javier, me quito el sombrero y te doy las gracias por todo lo que has hecho por mi. Un placer y una suerte haber conocido una persona como tu. ¡Todo un ejemplo a seguir!

Mare, Pare, una part d'aquesta tesi és vostra, per tot el que meu donat, gràcies de tot cor. Àvia i avi, els vostres ànims literals i espirituals m'han ajudat a seguir fins el final. Jordi i Ramon, ja la tenim aquí, per fi! Alicia, Lluís, Sergi i Mireia, gràcies per creure en mi. Jose, quantes vegades m'has recordat que cada vegada faltava menys per acabar, gràcies!

I finalment, si estic escrivint aquestes últimes línies de la tesi, és gràcies a tu, Laia, amor meu. Sense el teu suport, la teva paciència, la teva immensa comprensió i el teu

amor sincer i autèntic, no m'hauria sigut possible arribar fins al final. Aquesta tesi és, en essència, tant teva com meva. Des del fons del meu cor, gràcies per ser una persona extraordinària.

ABREVIATURES

AA	Àcid araquidònic
AC	Adenilciclasa
Ach	Acetilcolina
ADN	Àcid desoxiribonuclèic
ADP	Adenosina difosfat
Ang II	Angiotensina II
AKT	Proteïna quinasa B
AMPc	Adenosina monofosfat cíclica
Apo E	Apolipoproteïna E
ARNm	Àcid ribonuclèic missatger
ASA	Àcid acetilsalicílic
ATP	Adenosina trifosfat
Cdk	Cinases depenents de ciclins
CML	Cèl·lules musculars llises
COX-1	Ciclooxigenasa-1
COX-2	Ciclooxigenasa-2
DAG	Diacilglicerol
ecto-ADPase	Ectoadenosina difosfatasa
EGF	Factor de creixement epidermal
eNOS	Òxid nítric sintasa endotelial
ERK 1 / 2	Cinases regulades per senyals extracel·lulars 1 i 2
FAD	Flavina adenina dinucleòtid
FAS	Membre 6 de la superfamília de receptors del factor de necrosi tumoral
FasL	Ligand del membre 6 de la superfamília de receptors del factor de necrosi tumoral
FGF-2	Factor de creixement dels fibroblasts 2
FMN	Flavina mononucleòtid
GMP	Guanosina ciclina monofosfat
GMPc	Guanosina 3,5 monofosfat cíclica
GSNO	S-nitrosoglutatió
H4B	Tetrahidrobiopterina
HDL	Lipoproteïnes d'alta densitat
HTA	Hipertensió arterial
HTB	Àcid 2-hidroxi-4-trifluorometil-benzoic
ICAM	Molècula d'adhesió intercel·lular

IFN- γ	Interferó-gamma
IGF-1	Factor de creixement de la insulina 1
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-18	Interleucina 18
iNOS	Òxid nítric sintasa induïble
IP ₃	Inositol trifosfat
LDL	Lipoproteïnes de baixa densitat
MCP-1	Proteïna quimioatracent de monòcits 1
MEC	Matriu extracel·lular
MMP	Metaloproteïnases
NADPH	Lactaldehid reductasa
NF- κ B	Factor nuclear κ B
nNOS	Òxid nítric sintasa neuronal
NO	Òxid Nítric
NO ₂	Nitrit
NO ₃	Nitrat
NOS	Òxid nítric sintasa
NSAID	Fàrmacs antiinflamatoris no esteroideus
oxLDL	Lipoproteïnes de baixa densitat oxidades
PAI-1	Inhibidor de l'activador del plaminogen 1
PAR	Receptor de proteases activades
PDGF	Factor de creixement derivat de les plaquetes
PGA2	Prostaglandina A2
PGB2	Prostaglandina B2
PGC2	Prostaglandina C2
PGF2	Prostaglandina F2
PGG2	Prostaglandina G2
PGH2	Prostaglandina H2
PGI ₂	Prostaciclina
PI-3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PIP ₂	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfat
PKC	Proteïna cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
pRb	Proteïna retinoblastoma
RGD	Pèptid arginina-glicina-aspartic
ROS	Espècies reactives de l'oxigen

SNAP	S-nitroso-penicilamina
SNO	S-nitrosotiol
SR-BI	Receptor de proteïna classe B
TF	Factor tissular
TGF	Factor de creixement tumoral
TNF	Factor de necrosi tumoral
t-PA	Activador tissular del plasminogen
TXA ₂	Tromboxà A2
TXB2	Tromboxà B2
VCAM	Molècula d'adhesió cel·lular vascular
αIIbβ3	Glicoproteïna IIb/IIIa

ÍNDEX

AGRAIMENTS.....	VII
ABREVIATURES.....	XIII
ÍNDEX.....	XIX
INTRODUCCIÓ.....	1
ATEROSCLEROSI.....	3
1.- ESTRUCTURA D'UNA ARTÈRIA.....	7
1.1.- Íntima.....	7
1.2.- Media.....	7
1.3.- Adventícia.....	7
2.- ENDOTELI.....	8
3.- SUBENDOTELI.....	10
4.- PROGRESSIÓ DE LA PLACA ATEROSCLERÒTICA. IMPLICACIÓ DE LES CÈL·LULES MUSCULARS LLISES (CML).....	13
5.- COMPLICACIÓ DE LA PLACA ATEROSCLERÒTICA.....	15
6.- ACTIVACIÓ DE LES PLAQUETES.....	15
6.1.- Les plaquetes en l'homeòstasi primària.....	16
6.1.1.- Activació de les plaquetes.....	16
6.1.2.- Agonistes, receptors , i efectors sistèmics en l'activació de les plaquetes.....	18
6.2.- Les plaquetes i el desenvolupament de lesions ateroscleròtiques.....	20
6.2.1.- Mediadors de la inflamació derivats de plaquetes.....	20
6.2.2.- Les espècies reactives d'oxigen i l'activació de les plaquetes.....	22
6.2.3.- Les plaquetes en l'aterogènesi en humans.....	23
6.3.- Les plaquetes i la trombosi arterial.....	23
6.3.1.- L'activació de les plaquetes en el síndrome coronari agut.....	24
6.3.2.- L'activació de les plaquetes en l'embòlia isquèmica aguda.....	25
7. FACTORS DERIVATS DE L'ENDOTELI.....	25
7.1.- La prostaciclina i el tromboxà A ₂	25
7.2.- L'òxid nítric (NO).....	27
7.2.1. L'òxid nítric i la fosforil·lació oxidativa.....	28
7.2.2. L'òxid nítric i el sistema cardiovascular.....	28
8.- APOPTOSI.....	32

8.1.- Apoptosi de les cèl·lules endotelials vasculars.....	33
8.2.- Apoptosi dels macròfags.....	34
8.3.- Apoptosi de les cèl·lules musculars llises.....	35
9.- CICLE CEL·LULAR.....	37
9.1.- Regulació del cicle cel·lular.....	37
10.- RESTENOSI I HIPERPLÀSIA INTIMAL.....	39
11.- ESTRATÈGIES.....	42
11.1.- Inhibició de la ciclooxigenasa.....	42
Via de la ciclooxigenasa.....	42
Actuació de la ciclooxigenasa.....	43
TRIFLUSAL.....	44
Farmacocinètica.....	44
Farmacodinàmica.....	44
Farmacologia Clínica.....	47
11.2.- DONADORS DE NO (agents antiisquèmics).....	48
11.2.1.- Nitrats.....	48
11.2.2.- Nitrosotriols.....	49
OBJECTIUS.....	51
Primer objectiu, article primer: Fàrmac estudiat: Triflusal.....	53
Segon objectiu, article segon: Fàrmac estudiat: Donadors de NO.....	54
MÈTODES.....	55
1.- MODEL ANIMAL I L'ADMINISTRACIÓ DELS FÀRMACS DONADORS DE NO.....	57
2.- MODEL ANIMAL I EL PROTOCOL EXPERIMENTAL DE LA FORMACIÓ DEL TROMBE SECUNDARI EN PRESÈNCIA D'INHIBIDORS DE LA CICLOOXIGENASA.....	57
3.- MARCATGE DE PLAQUETES.....	60
4.- OBTENCIÓ DE CÈL·LULES MUSCULARS LLISES DE LES CAPES ÍNTIMA I MÈDIA DE L'ARC AÒRTIC DE PORC, MITJANÇANT LA TÈCNICA D'EXPLANTS.....	61
4.1.- Transport i elaboració dels explants.....	61
4.2.- Incubació dels explants.....	61
5.- OBTENCIÓ DE CÈL·LULES ENDOTELIALS D'AORTA PORCINA.....	62
5.1.- Preparació dels cultius primaris.....	62
5.1.1.- Extracció i preparació de l'aorta.....	62

5.1.2.- Digestió amb col·lagenasa classe II.....	62
5.1.3.- Preparació dels cultius.....	62
5.2.- Cultiu in vitro de les cèl·lules endotelials de porc.....	63
5.3.- Tripsinització de les cèl·lules.....	63
6.- EXTRACCIÓ DEL ARN, L'ADN I LA PROTEÏNA AMB EL PROTOCOL DEL TRIPURE.....	64
6.1.- Procediment general.....	64
6.2.- Aïllament del ARN.....	65
6.3.- Aïllament del ADN.....	65
6.4.- Aïllament de la proteïna.....	66
7.- DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNA.....	67
8.- DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ I INTEGRITAT DEL ARN.....	68
9.- WESTERN BLOT.....	68
10.- PROCESSAMENT DEL ARN I PCR A TEMPS REAL.....	70
11.- PROTOCOL D'EIA PER LA DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE 6-KETO PGF-1- α	71
11.1.- Preparació de les solucions.....	71
11.2.- Disposició de la placa multipouets.....	72
11.3.- Revelat de la placa.....	74
11.4.- Anàlisi dels resultats.....	74
ANNEX 1: MEDIS DE CULTIU.....	75
ANNEX 2: OBTENCIÓ DE SÈRUM DE PORC.....	76
DISCUSSIÓ GLOBAL DELS RESULTATS OBTINGUTS.....	77
CONCLUSIONS.....	85
BIBLIOGRAFIA.....	89
PUBLICACIONS.....	109
1.-RESUMS.....	111
2.- PUBLICACIONS.....	117
3.- INFORME DE CONTRIBUTIÓ I FACTOR D'IMPACTE.....	133
ANNEX. Altres Publicacions.....	137

INTRODUCCIÓ

L'aterosclerosi és una malaltia inflamatòria multifactorial²⁰. El procés d'aterogènesi ha estat considerat per molts, en gran part, una acumulació de lípids a la paret arterial; encara que, és molt més que tot això. Malgrat canvis en el tipus de vida i en l'ús de nous enfocaments farmacològics per disminuir les concentracions de colesterol en el plasma^{1,2}, les malalties cardiovasculars continuen sent la principal causa de mort als Estats Units, Europa i gran part d'Àsia^{3,4}.

De fet, les lesions ateroscleròtiques representen una sèrie de respostes cel·lulars i moleculars altament específiques que es poden descriure millor si enfoquem l'aterosclerosi com una malaltia inflamatòria⁵⁻⁹.

Les lesions ateroscleròtiques ocorren principalment en artèries elàstiques i musculars de gran i mitja calibre, i poden conduir cap a la isquèmia del cor, cervell o extremitats, acabant en infart. Es poden donar al llarg de la vida de les persones. De fet, les lesions més primerenques, anomenades estries grasses, les quals són comunes en infants i nois joves¹⁰, són lesions inflamatòries pures, que consisteixen només en la presència de macròfags derivats de monòcits i limfòcits T¹¹. En persones amb hipercolesterolèmia, la presència d'aquestes cèl·lules és a causa de la deposició extracel·lular de lípids amorfs^{10,12}.

Per entendre el procés de desenvolupament de la lesió vascular, ens hem de fixar en la base on es desenvolupa, el vasos sanguinis. Aquests vasos estan formats per diverses capes cel·lulars especialitzades (veure secció 1). Començant per la llum del vas o lumen trobem la primera capa de cèl·lules, l'endoteli. Es tracta d'una monocapa, on les cèl·lules endotelials altament especialitzades actuen com a barrera selectiva entre el teixit vascular i el medi extern que representa la llum del vas. És en aquesta capa quan falla algun component on es dona el primer pas pel desenvolupament de la malaltia i s'anomena disfunció endotelial⁵ (Figura 1). Aquesta disfunció endotelial porta a les cèl·lules endotelials a canviar el seu patró d'expressió gènica, que alteren entre altres les propietats homeostàtiques normals de l'endoteli. Això, incrementa l'adhesivitat de l'endoteli respecte els leucòcits o les plaquetes, així com la seva permeabilitat. També s'indueix l'endoteli a tenir propietats procoagulants en comptes d'anticoagulants i a expressar molècules vasoactives, citoquines i factors de creixement. Si la resposta inflamatòria no es neutralitza eficaçment o no s'elimina l'agent danyós, aquest estat pot continuar indefinidament. En aquest cas, la resposta inflamatòria estimula la migració i proliferació de les cèl·lules musculars llises (CML) desde la capa mitjana de la

musculatura vascular, formada bàsicament per CML, fins al subendoteli, format bàsicament per glucoproteïnes. D'aquesta manera es forma una lesió intermitja. Si aquesta resposta continua ininterrompudament, les CML poden espessir la paret arterial, la qual cosa és compensada per una gradual dilatació mantenint-se així el lumen inalterat¹³. Aquest fenomen es coneix amb el terme de "remodeling" o remodelat, formant-se l'estria grassa (Figura 2). De les cèl·lules inflamatòries que intervenen i regulen el procés de l'aterogènesi, les que es troben en totes les fases, són els macròfags derivats de monòcits i un subtipus específic de limfòcits T^{14,15}; en canvi, els granulòcits rarament s'hi detecten al llarg de la malaltia¹⁶.

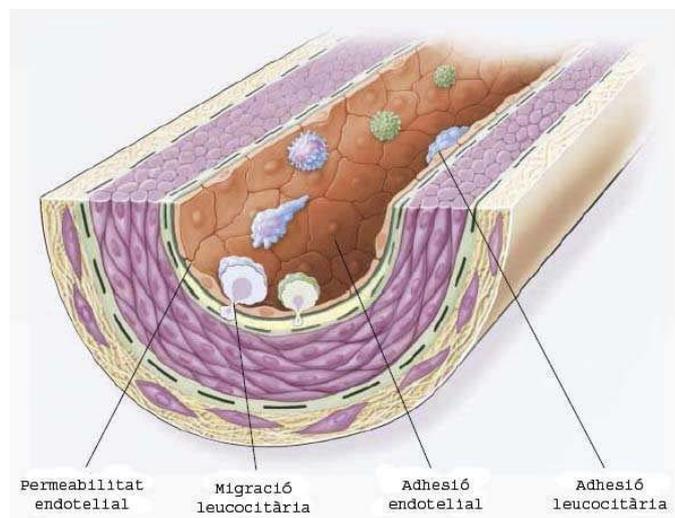


Figura 1. Disfunció endotelial. La disfunció endotelial promou d'adhesió i entrada de leucòcits a l'espai subendotelial. A més també s'augmenta la permeabilitat de l'endoteli al pas de mecròmòlecules tals com les lipoproteïnes. Adaptat de Ross R. 1999.

Una inflamació prolongada farà augmentar el número de macròfags i limfòcits en la lesió. L'activació d'aquestes cèl·lules portarà a una alliberació d'enzims hidrolítics, citoquines, quimioquines i factors de creixement^{17,18}, les quals poden augmentar el dany i produir necrosis locals¹⁹. Amb tot això, es comença a formar el que s'anomena placa d'ateroma o placa ateroscleròtica mitjançant varis cicles d'acumulació de cèl·lules mononuclears, la migració i proliferació de les cèl·lules musculars llises i la formació de teixit fibrós

que condueixen a una reestructuració i engruiximent de la lesió. A més, apareix la formació del cap fibrós que cobreix el nucli lipídic i el teixit necrosat. Aquesta situació tan avançada, s'anomena lesió complicada (figura 3). Arribats a aquest punt, l'artèria pot no arribar a compensar per dilatació i pot fer que la lesió es comenci a introduir cap al lumen alterant el fluxe de sang. Això pot ser el principi dels símptomes o manifestacions clíniques de la malaltia, poden desenvolupar en la ruptura d'aquesta placa i la posterior obturació del lumen del vas sanguini per la formació d'un trombus. En el cas del cor, aquest estat s'anomena infart si la oclusió del vas és total o angina si és parcial.

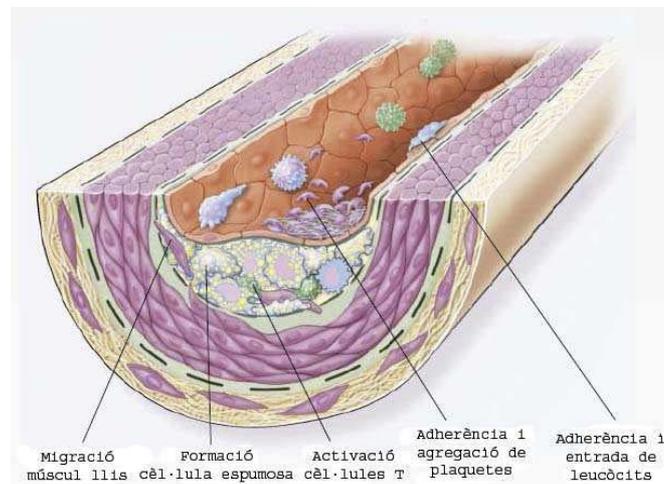


Figura 2. Formació de l'estria grassa. L'acumulació de macròfags i CML poden ocasionar un engruiximent de la paret arterial conegut com a estria grassa. Aquest fet juntament amb la disfunció endotelial subjacent poden afavorir l'adhesió de les plaquetes, fet que contribuirà a la progressió de la lesió. Adaptat de Ross R. 1999.

Existeixen varis factors de risc coneguts que contribueixen al desenvolupament d'aquesta malaltia. La majoria de les estratègies de prevenció estan enfocades a la disminució d'aquests riscos i entre les més conegudes hi ha el control dels nivells de colesterol LDL en sang, la hipertensió, la diabetes, l'estrès oxidatiu i el consum de tabac. A més hi ha altres factors que ajuden a la prevenció de la malaltia com són portar una dieta equilibrada (entre elles la dieta mediterrània) i efectuar un mínim d'esport.

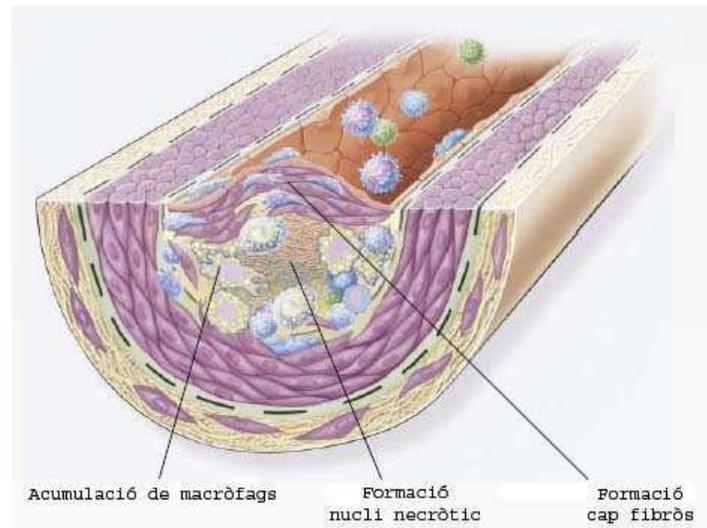


Figura 3. Formació d'una lesió ateroscleròtica avançada. En una agressió continuada en el vas i sota diferents estímuls es produeix un augment del nombre de macròfags i cèl·lules espumoses que poden acabar morint i constituir el nucli necròtic, ric en colesterol i altament protrombòtic. Al voltant d'aquest nucli, les CML sintetitzen una coberta fibrosa que dona estabilitat mecànica a la placa ateroscleròtica. Adaptat de *Ross R. 1999*.

L'aterosclerosi i la seva evolució depèn de la capacitat de les diferents cèl·lules de l'organisme a tornar-lo a l'homeostasi, a més de disminuir l'agent causant de la inflamació, però si un dels components cel·lulars falla per algun motiu, la malaltia es desenvoluparà, començant per l'endoteli.

1.- ESTRUCTURA D'UNA ARTÈRIA

L'estructura de la paret arterial es repeteix en tots els tipus d'artèries, variant la proporció d'alguns dels elements de la mateixa (làmines elàstiques i CML) depenent si són artèries musculars o elàstiques. Es compon bàsicament de tres capes concèntriques: íntima, mitja i adventícia (Figura 4).

1.1.- ÍNTIMA

La túnica íntima està formada per l'endoteli i el subendoteli o capa basal, que limita amb la làmina elàstica interna. L'endoteli està format per una monocapa de cèl·lules endotelials que revesteixen la llum del vas. El subendoteli és la làmina basal, constituïda per una tènue capa de teixit conjuntiu; sota, es troba la làmina elàstica interna, formada per una xarxa compacta d'elastina amb fenestracions distribuïdes regularment.

1.2.- MEDIA

La túnica mitjana és la de major grossor. Està formada per CML disposades circularment o helicoidalment respecte l'eix del vas, formen capes que s'alternen amb capes elàstiques. Aquesta túnica està limitada exteriorment per la làmina elàstica externa i internament per la làmina elàstica interna. Aquestes làmines són fulles de fibres elàstiques amb fenestracions que permeten el pas de substàncies i de cèl·lules en ambdues direccions.

1.3.- ADVENTÍCIA

La túnica adventícia està formada per teixit conjuntiu amb fibres de colagen, fibres elàstiques i fibroblasts, juntament amb algunes CML. Aquest teixit conjuntiu es prolonga gradualment, relacionant-se amb les estructures veïnes. Per aquest teixit conjuntiu perivascular discorre una xarxa de vasos de molt petit calibre, anomenats vasa vasorum, que ocasionalment penetren a la mitja i sembla que la funció està relacionada amb el metabolisme de la paret (oxígen, nutrients, drenatge, etc.).

També trobem una xarxa de fibres nervioses amielíniques que acaben en les cèl·lules musculars de la túnica mitjana (nervis vasomotors) i algunes fibres mielíniques que arriben fins a la íntima, fibres sensibles dels vasos.

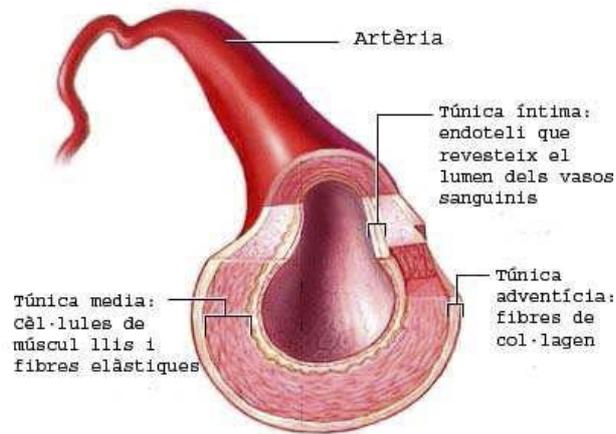


Figura 4. Estructura de les capes d'una artèria. Es diferencien les capes o túniques íntima, mitjana i adventícia, les quals estan separades entre elles per làmines elàstiques. La separació entre la íntima i la mitjana s'anomena làmina elàstica interna, i la separació entre la mitjana i l'adventícia rep el nom de làmina elàstica externa. Adaptada de la web: <http://www.juntadeandalucia.es/averroes/~29701428/salud/circu.htm>

2. ENDOTELI

L'endoteli és el recobriment interior dels vasos sanguinis (arterials i venosos), els vasos limfàtics, les cavitats cardíaques i els cossos cavernosos. La seva formació s'inicia aviat a l'embriogènesi i és el responsable de la circulació del torrent sanguini, la fluïdesa de la sang, el to vascular i de mecanismes de defensa de l'organisme tan importants com el fenomen inflamatori i la resposta immune. L'endoteli, per la seva localització estratègica, separa el medi exterior agressiu de l'interstici tissular complint una funció de defensa de l'hoste a nivell del tegument mucocutani, el pulmó, el tracte gastrointestinal i el sistema cardiovascular. L'endoteli és capaç de sintetitzar, emmagatzemar i alliberar molècules específiques que incideixen en el funcionament normal d'òrgans diferents. L'endoteli també compleix una funció "d'esponja" al emmagatzemar molècules produïdes per ell mateix i substàncies no endotelials. Actualment s'està investigant intensament en el seu sistema de caveoles que segurament estan relacionades amb una funció d'emmagatzematge i senyalització cel·lular.

En efecte, l'endoteli intervé en processos d'embriogènesi, histogènesi, organogènesi, cicatrització, angiogènesi i metàstasi. Es pensa que l'endoteli pot activar-se de forma comparable a la dels macròfags o cèl·lules polimorfonucleades i que el seu tràfic molecular i les seves interaccions cèl·lula-cèl·lula són dinàmiques i immediates. La capa endotelial proveeix una superfície activa per l'intercanvi de gasos, aquós i molecular i pel tràfic cel·lular. L'endoteli té una organització única, serveix d'aduana entre el medi exterior, que pot ser agressiu i el medi interior que s'ha de protegir. L'endoteli constitueix una capa unicel·lular continua que serveix d'interfase estructural i funcional entre el torrent circulatori i la paret vascular. Per la seva localització especial, capta senyals químiques, físiques i immunològiques i d'acord amb aquestes senyals compleix funcions específiques en l'homeòstasi i l'enfermetat.

Concretament, en l'homeostasi del sistema vascular, proporciona una superfície no trombogènica i no adherent pels leucòcits. Contribueix al manteniment del to vascular mitjançant el balanç de producció i alliberació de substàncies vasodilatadores, com l'òxid nítric (NO) (veure secció 2 de la introducció) i la prostaciclina (PGI₂) (veure secció 3 de la introducció), i vasoconstrictores, com l'endotelina, el tromboxà A₂ (TXA₂) i l'angiotensina II (AII). A més pot modular el to i el creixement de les cèl·lules musculars llises (CML), així com la coagulació, la fibrinolisi i l'adhesió de cèl·lules sanguínees a la paret vascular,²¹⁻²³ mitjançant diversos factors promotors i inhibidors del creixement, moduladors de la inflamació (molècules d'adhesió) i factors hemostàtics i trombolítics, com l'activador tissular del plasminogen (t-PA) i l'inhibidor del t-PA tipus 1 (PAI-1).²⁴ En condicions normals existeix un equilibri entre les accions d'aquests factors, però en presència de factors de risc cardiovasculars tals com hiperlipidèmia, tabac, hipertensió arterial, diabetis, infeccions, hiperhomocisteïnèmia i altres, aquest equilibri es veu alterat provocant respostes anormals de l'endoteli.

Llavors, la proliferació del múscul llis, la vasoconstricció, l'activitat trombòtica i l'adhesió de les cèl·lules sanguínees passen a ser fenòmens predominants.^{21,8}

La hipercolesterolèmia actua sobre les cèl·lules endotelials produint alteracions de la funció vascular. De fet, la disfunció de la resposta vasomotora endotelial precedeix inclús al desenvolupament ateroscleròtic i està relacionada amb nivells anormalment elevats de lípids plasmàtics. Això s'ha demostrat en varis estudis en els que es va observar que la vasodilatació depenent de l'endoteli estava disminuïda en animals i en

pacients hipercolesterolèmics sense la presència d'alteracions estructurals vasculars evidents.^{25,26}

La velocitat de cisalla del fluxe sanguini sobre l'endoteli és també un factor important en la disfunció endotelial, ja que estimula l'alliberació de substàncies vasoactives, provoca canvis en l'expressió de certs gens, del metabolisme cel·lular i de la morfologia cel·lular.^{27,28} S'ha demostrat que algunes àrees de l'arbre arterial sotmeses a freqüents canvis de velocitats de cisalla i fluxe no laminar presenten disfunció endotelial. Aquestes condicions de fluxe es produeixen en els punts de bifurcació arterial i provoquen el desenvolupament de lesions ateroscleròtiques.

A partir del moment en què l'endoteli presenta alteracions de la seva funcionalitat homeostàtica, es produeix l'entrada de monòcits, lípids plasmàtics i proteïnes dins la paret arterial, així com l'activació de fenòmens inflamatoris que donen lloc a la formació de l'estria grassa, primer pas per la formació de la placa ateroscleròtica.

3. SUBENDOTELI

La disfunció endotelial està considerat el primer pas cap al desenvolupament de la malaltia, però aquesta es desenvoluparà en el subendoteli de la paret vascular.

Les cèl·lules endotelials formen una monocapa continua que tapissa la cara luminal interna de les artèries, les venes, els capil·lars i els vasos limfàtics, amb una estructura molt organitzada que assegura l'acoblament funcional entre elles. A l'endoteli podem trobar dues zones especialitzades, l'apical o luminal i la basal que interacciona amb les proteïnes de la matriu extracel·lular (MEC) de la làmina basal a la que està fortament adherida, anclant les cèl·lules al subendoteli.

La MEC està composta fonamentalment per glucoproteïnes (laminina, fibronectina, vitronectina, trombospondina, entactina, heparan sulfat i factor de Von Willebrand, entre altres).

Les glicoproteïnes o glucoproteïnes són molècules compostes per una proteïna unida a un o varis hidrats de carboni, simples o compostos.

El terme glicoproteïna s'usa en general per referir-se a una molècula de dimensions específiques, integrada normalment per un o més oligosacàrids units de forma covalent a cadenes laterals específiques de polipèptids. Solen tenir un major percentatge de

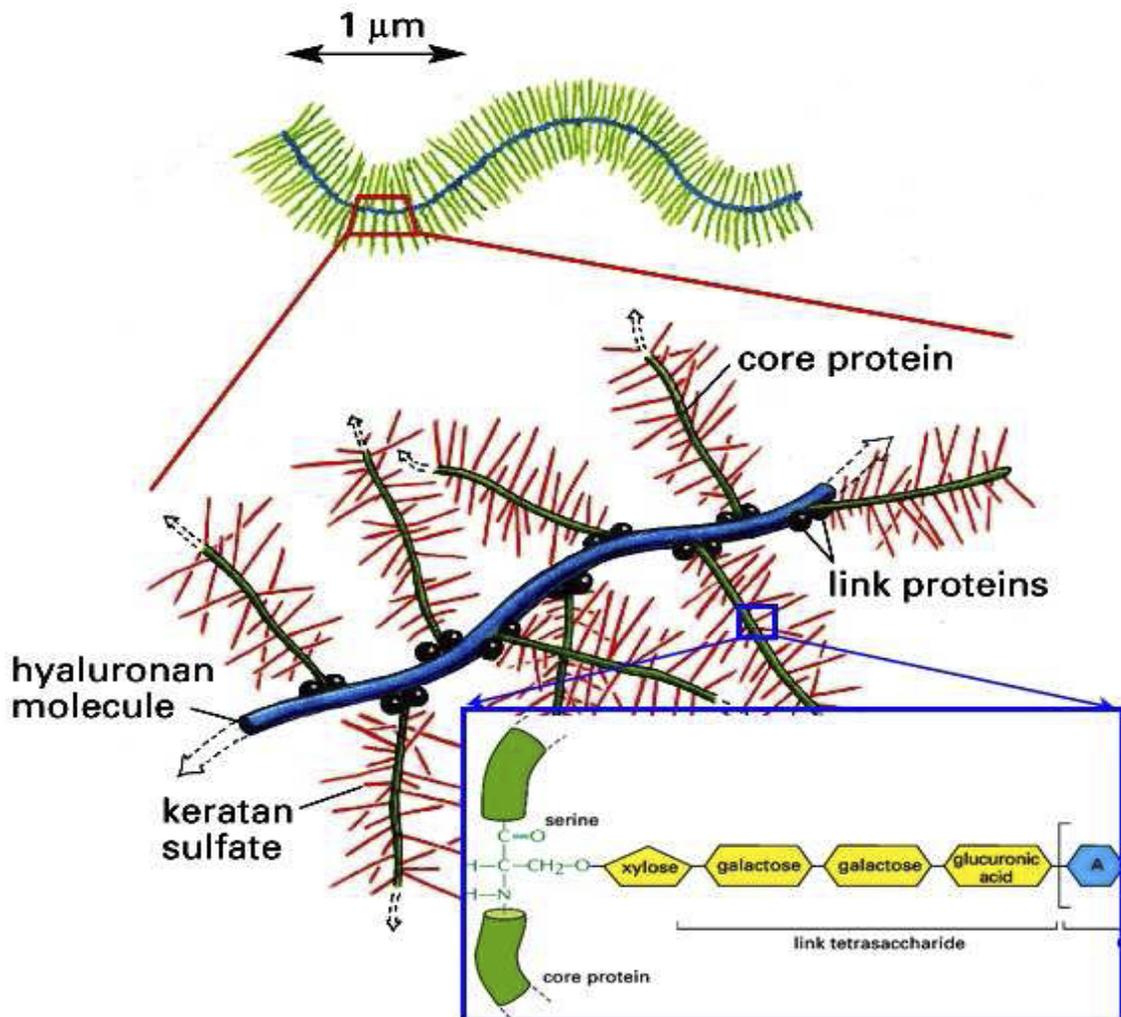
proteïnes que de carbohidrats. En canvi, els termes proteoglicà i pèptidoglicà designen agregats massius formats per carbohidrats i proteïnes o sèptims pèptids, pels quals la paraula molècula no té cap significat precís. Les partícules de proteoglicans tenen un major percentatge de carbohidrats que de proteïnes. Avui en dia també s'anomenen glucosaminoglicans (GAGs).

Els GAGs són polisacàrids formats per unitats repetitives de disacàrids sense ramificar on un dels sucres és una hexosamina (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina) i l'altre és un àcid urònic (sucre carboxilat); aquests carbohidrats generalment estan sulfatats i el seu elevat grau de carboxilació i sulfatació aporta gran quantitat de cargues negatives al llarg de tota la molècula.

Són molècules relativament rígides a causa del tipus d'enllaç entre els seus sucres i a la gran quantitat de cargues negatives que l'obliguen a adoptar una configuració desplegada. Aquesta disposició molecular és especialment prominent en medis hidrofílics.

Els glucosaminoglicans són molècules altament hidrofíliques que retenen grans quantitats d'aigua, essent els principals responsables del manteniment de la viscositat de la matriu extracel·lular, de la turgència dels teixits i de mantenir hidratat l'entorn cel·lular.

L'estructura dels proteoglicans està formada per un component central que és protèic i s'anomena proteïna "core"; i després per unes extensions filamentoses laterals que són glicosaminoglicans units covalentment a l'eix protèic.



Exemple de proteoglicà que consta de:

- Una proteïna core
- 100 molècules de condroitin sulfat.
- 130 molècules de keratà sulfat.

La presència de la disfunció endotelial, al augmentar la permeabilitat de l'endoteli a les LDL, determina la formació de l'estria grassa, ja que permet que les LDL s'internalitzin i s'uneixin als proteoglicans que formen la MEC.²⁹ Els proteoglicans, tenen una alta capacitat de produir l'alteració i la formació de l'estria grassa.³⁰ La presència de major

estrès oxidatiu, associat a la disfunció endotelial, afavoreix la modificació de les LDLs retingudes a l'espai subendotelial.³¹ Les LDL oxidades, altament inflamatòries i citotòxiques, expressen antigens de superfície que motiven l'activació d'una resposta inflamatòria que provoca l'atracció de cèl·lules leucocitàries (monòcits i limfòcits-T) cap a la lesió. L'acumulació de LDL oxidades a l'espai subendotelial juntament amb l'endoteli activat indueixen l'expressió de receptors i molècules que faciliten la unió dels monòcits a l'endoteli i mèdien la seva internalització a l'espai extravascular a través de la monocapa endotelial.³³ Aquestes citocines quimiotàctiques i/o receptors inclouen la molècula d'adhesió intercel·lular (ICAM), molècules d'adhesió cel·lular vascular (VCAM), la E-seletina i el MCP-1. Una vegada a la íntima vascular els monòcits es diferencien a macròfags²⁰ els quals captaran àvidament les LDL oxidades transformant-se en cèl·lules espumoses. La perpetuació d'aquest procés derivarà en col·leccions focals de cèl·lules espumoses, observades microscòpicament com a estries grasses a la superfície de la íntima.

4. PROGRESSIÓ DE LA PLACA ATEROSCLERÒTICA. IMPLICACIÓ DE LES CÈL·LULES MUSCULARS LLISES (CML).

L'estria grassa pot progressar fins a la formació de la placa, encara que no totes les estries grasses progressaran. Hi ha dos factors claus en la progressió de la lesió: Per una banda, la perpetuació de la resposta inflamatòria amb l'acumulació de macròfags i lípids, i per l'altre, la proliferació de les cèl·lules musculars llises (CML).

L'evolució de la inflamació, amb el reclutament de macròfags derivats dels monòcits infiltrats, limfòcits T^{34,35} i unes poques cèl·lules cebades³⁶ poden lesionar l'endoteli adjacent i per això amb freqüència es troben àrees focalment denudades, sovint amb plaquetes adherides al teixit subendotelial exposat.³⁷ A continuació, les plaquetes i els microtrombus contribueixen al creixement de la placa mitjançant l'estimulació de cèl·lules adjacents de l'interior de la placa i/o la seva incorporació a la lesió.³⁸ Els productes de degranulació de les plaquetes (factor de creixement derivat de les plaquetes: PDGF), la trombina i la fibrina (fibrinogen), tenen propietats quimiotàctiques i mitogèniques;³⁹ per això són probablement decisives per l'evolució de les plaques madures. Existeixen també altres factors mitogènics derivats de la sang i l'ateroma, com la interleucina-1, els factors α i β dels fibroblasts, la serotonina, la trombospondina i també neurotransmissors (catecolamines) i hormones (angiotensina)⁴⁰ que contribueixen al creixement de la lesió.

S'ha postulat que les metaloproteïnases (MMP) derivades dels macròfags internalitzats a la paret vascular⁴¹ són les responsables de l'eliminació de la barrera de la làmina basal, facilitant així la consegüent interacció de les CML amb els components de la MEC (col·lagen tipus I i fibronectina).⁴² Aquesta interacció indueix un canvi fenotípic de les CML, de manera que les CML de la media, amb fenotip contràctil, (responsables de la vasoactivitat arterial) es desdiferencien al fenotip sintètic. Aquest canvi fenotípic confereix a les CML major activitat funcional: capacitat per migrar, dividir-se i sintetitzar matriu extracel·lular (MEC) (col·làgens, proteoglicans, elastina, etc),⁴³ la qual cosa porta a la invasió de la lesió i l'elaboració de la capa fibrosa de la placa ateroscleròtica. Existeixen evidències inequívocues que demostren que les CML procedents de lesions ateroscleròtiques humanes i de lesions miointimals d'animals d'experimentació (després d'una lesió vascular) tenen un fenotip diferenciat quan es comparen amb les CML d'un vas normal.^{44,45} Aquest procés de desdiferenciació es caracteritza per canvis significatius en l'aparença morfològica de les cèl·lules, tals com una reducció de miofilaments i un increment del reticle endoplasmàtic rugós i el complex de golgi (orgànuls sintètics). Mostren, a més, nivells reduïts d'una varietat de proteïnes característiques de les CML diferenciades, tals com l'actina, la cadena pesada de la miosina, la H-caldesmon, la vinculina i la desmina. Les CML, al igual que els macròfags, també capten i acumulen LDL modificades transformant-se en cèl·lules espumoses.^{46,47}

La MEC està constituïda per fibres de col·lagen i fibres elàstiques en un gel viscoelàstic format per proteoglicans, hialurà, glucoproteïnes i aigua. Tots aquests components interactuen entre ells i s'entrecreuen formant un polímer reticular actiu, que confereix a la paret les seves propietats biomecàniques. També presenta la capacitat d'unir lipoproteïnes plasmàtiques, factors de creixement, citocines i altres enzims presents a l'espai intimal. La MEC (sobretot el col·lagen que és el seu component majoritari) juga un paper fonamental en les lesions avançades, ja que forma la coberta fibrosa (cap fibrós) al voltant del nucli lipídic que contribueix a l'estabilitat de les plaques ateroscleròtiques.⁴⁸ Per altra banda, la interacció de la MEC amb les cèl·lules vasculares la fa partícip en el desenvolupament de la placa ateroscleròtica, ja que contribueix a la regulació de l'adhesió, migració i proliferació de les cèl·lules vasculares.

Els glucosaminoglicans⁴⁹ i les fibres d'elastina són importants per la captació de lípids i contribueixen significativament a la calcificació de la placa ateroscleròtica.⁵⁰ Encara que es desconeixen els mecanismes moleculars que regulen la calcificació vascular,

diversos estudis postulen que, al igual que ocorre a l'osteogènesi, hi ha un balanç entre inductors i inhibidors de la calcificació (proteïna Gla, osteocalcina, osteonectina, osteopontina, els glucosaminoglicans i la proteïna monogenètica de l'òs tipus 2)⁵¹ que a més es veu afavorit pel retorn al fenotip contràctil de les CML.⁵¹ S'ha descrit, que els canvis en les CML miointimals semblen ser reversibles respecte a l'expressió de proteïnes contràctils, ja que aquestes augmenten en les CML de les lesions cròniques en models animals. Per tant, els canvis poden ser un requisit en el procés de reparació amb una disminució inicial, reflexant un canvi a un estat menys diferenciat, caracteritzat per un retorn al seu estat contràctil.⁵²

5. COMPLICACIÓ DE LA PLACA ATEROSCLERÒTICA

Hi ha tres mecanismes principals pels quals es pot generar un procés trombogènic a la placa:^{53,54}

- Una manera és que es produeixi una descamació de l'endoteli, la qual deixi exposades a la llum del vas proteïnes trombogèniques com ara el col·lagen o el factor de Von Willebrand. En les plaques ateroscleròtiques aquest procés és més greu, ja que poden expressar molècules protrombòtiques com el factor tissular, les quals ocasionaran la producció del trombus corresponent.
- En les plaques ateroscleròtiques es generen petits vasos per angiogènesi. Aquests són fràgils i tenen predisposició a trencar-se i produir microhemorràgies, les quals ocasionaran la producció del trombus corresponent.
- El tercer mecanisme és que es trenqui la coberta fibrosa de la placa, deixant al descobert el nucli lipídic ric en substàncies trombogèniques. Aquest és el cas més greu i pot ocasionar l'oclusió del vas pel coàgul que es formi. Encara que en altres casos pot ser que no ocasioni cap simptomatologia clínica, si que tindrà efectes importants en el remodelat de la placa.

6. ACTIVACIÓ DE LES PLAQUETES

Les plaquetes són essencials per l'homeòstasi primària i la reparació de l'endoteli, però també juguen un paper important en el desenvolupament del síndrome coronari agut i contribueix als esdeveniments cerebrovasculars. A més a més, participen en el procés

de formació i extensió de les plaques ateroscleròtiques. L'aterosclerosi és un procés inflamatori crònic,²⁰ que és un important component del síndrome coronari agut.⁵⁵ La relació entre la inflamació crònica i aguda no és clara, però les plaquetes són una font de mediadors inflamatoris,⁵⁶ i l'activació de les plaquetes per desencadenants inflamatoris pot ser un component crític de l'aterotrombosi.⁵⁷

6.1.- LES PLAQUETES EN L'HOMEOSTASI PRIMÀRIA

Les plaquetes són produïdes pels megacariòcits com a cèl·lules anucleades a les quals els hi manca el ADN genòmic⁵⁸ però que contenen ARN missatger (ARNm) provinent dels megacariòcits i la maquinària transcripcional i traduccional necessària per la síntesi de proteïnes.⁵⁹ "L'splicing" del preARNm, una típica funció que es dona en els nuclis de les cèl·lules, ha estat detectat també en el citoplasma de les plaquetes.⁶⁰ El transcriptoma de les plaquetes conté aproximadament de 3000 a 6000 transcrits. L'anàlisi del proteoma de les plaquetes és bastant més complex.⁶¹⁻⁶⁴ Després de deixar el moll de l'ós, les plaquetes circulen durant uns 10 dies. La seva principal funció és parar l'hemorràgia després d'un dany en un teixit o una lesió vascular.

6.1.1.- Activació de les plaquetes

La unió inicial de les plaquetes als llocs amb lesió vascular està mediada per la glicoproteïna Ib/V/IX, un receptor únic estructuralment complex que s'expressa en els megacariòcits i les plaquetes. El factor de von Willebrand és el principal lligand per un dels components d'aquest complex, la glicoproteïna Ib, i l'absència d'aquest factor pot causar defectes en l'homeòstasi primària i la coagulació.⁶⁵ A més de la glicoproteïna Ib, també, uns quants receptors de col·lagen amb funció de lligar van ser trobats a la superfície de les plaquetes, sobretot la glicoproteïna VI i la glicoproteïna Ia, membres de la superfamília de les immunoglobulines.⁵⁷

Després de l'adhesió inicial de les plaquetes a la matriu extracel·lular, el procés de reparació requereix una ràpida resposta de mediadors autocrins i paracrins, incloent adenosina difosfat (ADP), trombina, epinefrina, i tromboxà A₂. Aquests mediadors amplifiquen i mantenen la resposta inicial de les plaquetes, i a més, recluten les plaquetes circulants en el flux sanguini per formar un creixent tap homeostàtic. La majoria dels agonistes que activen les plaquetes operen a través dels receptors units a proteïnes G.⁶⁶ El pas final per tots els agonistes és l'activació de la integrina de plaquetes, la glicoproteïna IIb/IIIa (αIIbβ3), el principal receptor per l'adhesió i l'agregació.⁶⁷ El fenotip de ratolins que els hi falta la integrina β3 s'assembla al que

tenen els pacients amb trombastènia de Glanzmann, en els quals les plaquetes no es poden agregar i tenen en gran mesura reduïda la resposta del fibrinogen.⁶⁸

Uns quants substrats adhesius s'uneixen a la glicoproteïna IIb/IIIa.^{68,69} El fibrinogen juga un paper important en el manteniment de l'estabilitat del trombus, fent ponts entre les plaquetes mitjançant la integrina glicoproteïna IIb/IIIa. El factor de von Willebrand és necessari per facilitar els ponts interplaquetars a altes velocitats de cisalla, *in vitro*. Les plaquetes quiescents contenen el preARN de la molècula anomenada factor tissular, que és el principal iniciador de la cascada de coagulació que condueix a la conversió de protrombina a trombina i fibrinogen a fibrina.⁷⁰ El "splicing" depenent de senyal del preARN del factor tissular permet la síntesi de la proteïna bioactiva del factor tissular i això permet propagar i estabilitzar el trombus a les plaquetes.⁷⁰

L'endoteli vascular controla la reactivitat de les plaquetes mitjançant tres vies: La via de l'àcid araquidònic, la via de la L-arginina i l'òxid nítric, i la via de l'ectoadenosina difosfatasa (ecto-ADPase).⁷¹ Les cèl·lules endotelials converteixen l'àcid araquidònic a prostaciclina amb l'ajuda de la ciclooxigenasa-1 o la ciclooxigenasa-2 (COX-1 o COX-2) i la prostaciclina sintasa. La COX-2 sembla ser important en la síntesi de la prostaciclina, com s'ha demostrat a través dels inhibidors selectius de la COX-2 en l'excreció dels metabòlits de la prostaciclina.⁷²⁻⁷⁴ La prostaciclina inhibeix la funció de les plaquetes mitjançant l'augment dels nivells intracel·lulars del AMP cíclic.⁷⁵

L'òxid nítric difon a dins les plaquetes, estimula la producció de la guanosina ciclina monofosfat (GMP), i regula les proteïnes quinases dependents de GMP, causant de forma secundària una disminució del fluxe de calci intracel·lular. Aquesta reducció dels nivells de calci intracel·lular suprimeix el canvi conformacional de la glicoproteïna IIb/IIIa que és necessària per la unió de les integrines al fibrinogen, així disminueix el nombre i afinitat dels llocs d'unió al fibrinogen de la superfície de les plaquetes.⁷⁵

La Ecto-ADPase, un component integral de la superfície de les cèl·lules endotelials, limita els nivells en plasma dels nucleòtids (ADP i ATP) i és activada per substrat. L'activitat d'aquest enzim anul·la la fase crítica de captació de la reactivitat de les plaquetes, perquè treu els nucleòtids del medi.⁷⁶

6.1.2.- Agonistes, receptors , i efectors sistèmics en l'activació de les plaquetes

L'activació de les plaquetes és induïda per la interacció de varis agonistes amb receptors expressats a la membrana de les plaquetes (Figura 5). El Tromboxà A_2 (TXA_2) és sintetitzat per plaquetes activades a partir de l'àcid araquidònic (AA) i a través de la via de la ciclooxigenasa (COX). Una vegada format, el TXA_2 és alliberat i activa altres plaquetes. En les plaquetes, hi ha dos variants de receptors del TXA_2 : el $TP\alpha$ i el $TP\beta$, els quals difereixen en les seves cues citoplasmàtiques. El $TP\alpha$ i el $TP\beta$ s'emparellen a les proteïnes G_q i G_{12} o G_{13} , tot activant la fosfolipasa C (PLC). Aquest enzim degrada els fosfoinositols de la membrana (el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfat [PIP_2]), alliberant així els missatgers secundaris, el inositol trifosfat (IP_3) i el diacilglicerol (DAG). El DAG activa la proteïna cinasa C (PKC) intracel·lular, la qual causa fosforilació en les proteïnes. L'alliberació del IP_3 incrementa els nivells citoplasmàtics de calci, el qual és alliberat des del reticle endoplasmàtic. El ADP és alliberat per les plaquetes i les cèl·lules vermelles. Les plaquetes expressen almenys dos receptors pel ADP, el $P2Y_1$ i el $P2Y_{12}$, els quals interactuen amb el G_q i el G_i , respectivament. L'activació del $P2Y_{12}$ inhibeix l'adenilat ciclasa, causant una disminució en els nivells del AMP cíclic, i l'activació del $P2Y_1$ causant un increment en els nivells de calci intracel·lular. El receptor $P2Y_{12}$ és el major receptor capaç d'amplificar i mantenir l'activació de les plaquetes en resposta al ADP. La trombina és ràpidament generada als llocs amb dany vascular a partir de la protrombina circulant i, a més fa de mediador en la formació de fibrina, representant el més potent activador de plaquetes. La resposta de les plaquetes a la trombina està mediada a través de receptors de proteases activades (PARs) units a proteïnes G, els quals són activats després del trencament dels seus exodomini N-terminals mitjançant la trombina. Les plaquetes humanes expressen PAR1 i PAR4. PAR1 s'uneix a membres de la família de $G_{12/13}$, G_q i G_i . La subunitat α de G_{12} i G_{13} s'uneixen a factors de canvi del nucleòtid guanina de Rho (Rho GEFs), proporcionant respostes del citoesquelet mediades per Rho que estan probablement involucrades en els canvis de forma de les plaquetes. El pas senyalitzant de G_q i G_i condueix a un increment del calci citoplasmàtic i a una disminució dels nivells del AMP cíclic, respectivament. Els efectes dels agonistes mediats per una disminució dels nivells del AMP cíclic i un increment dels nivells de calci intracel·lular porten a l'agregació de les plaquetes a través del canvi en les propietats d'unió a lligand de la glicoproteïna IIb/IIIa ($\alpha IIb\beta 3$), la qual adquireix l'habilitat d'unir-se a proteïnes d'adhesió soluble tals com el fibrinogen i el factor de von Willebrand. L'alliberació de ADP i TXA_2 indueixen més activació i agregació de plaquetes. La seqüència del petit pèptid arginina-glicina-aspartic (RGD) de les proteïnes d'adhesió s'uneix al receptor de la

glicoproteïna IIb/IIIa. El fibrinogen conté dues seqüències RGD a la seva cadena alfa, una a la regió N-terminal i l'altre a la regió C-terminal. L'estudi de ratolins deficientes (-/-) pel fibrinogen ha mostrat que el factor de Von Willebrand per si sol no és suficient per aconseguir l'agregació estable de les plaquetes, donant suport a la hipòtesi que la unió concurrent del factor de von Willebrand a la glicoproteïna IIb/IIIa i a la glicoproteïna Iba permeten un contacte inicial entre les plaquetes, mentre que el fibrinogen és necessari per una unió permanent a la glicoproteïna IIb/IIIa activada de les plaquetes adjacents per assegurar la formació estable de l'agregat de plaquetes.

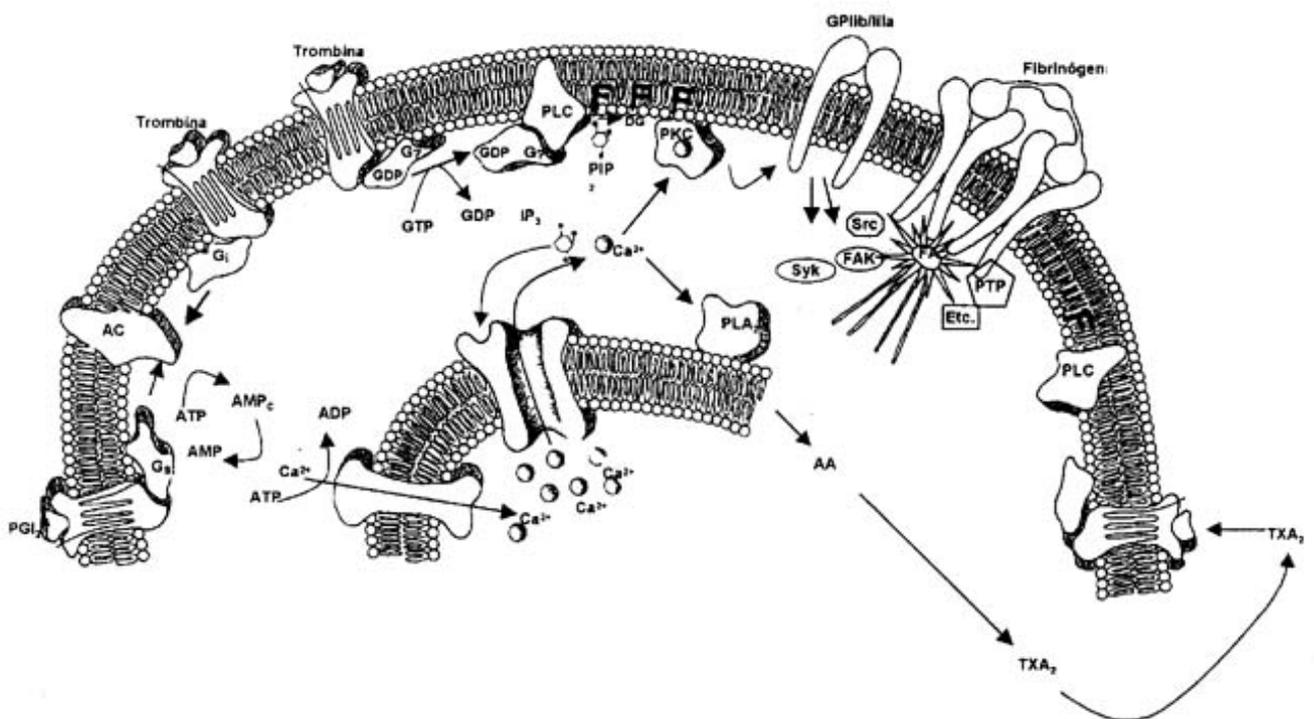


Figura 5. Transducció del senyal durant l'activació de la plaqueta. La unió de l'agonista al receptor (Rec) inicia la cascada de segons missatgers intracel·lulars incloent el inositol 1,4,5-trifosfat (IP3) i el diacilglicerol (DAG). El IP3 induïx l'alliberació de Ca^{2+} del sistema tubular dens. El DAG activa la proteïna cinasa C (PKC), la qual determina l'activació de la integrina $\alpha IIb\beta 3$ (complexe IIb/IIIa), la unió del fibrinogen, l'agregació i transmissió de senyals a través de la integrina. L'augment de la concentració de Ca^{2+} citosòlic facilita la formació de l'àcid araquidònic (AA) per acció de la fosfolipasa A2 (PLA2). El AA és metabolitzat a TXA_2 que difon a l'exterior de la cèl·lula i interactua amb receptors de la membrana amplificant l'activació de la plaqueta. Durant el procés d'activació resulten activades les tirosina cinases Syk i FAK de la família del Src. L'activació de FAK és dependent de la unió del fibrinogen a la $\alpha II\beta 3$ i l'agregació plaquetària. A les plaquetes, les proteïnes G regulen la hidròlisi dels fosfoinositids i la formació del AMPc. L'adenilciclasa (AC) és estimulada per Gs i inhibida per Gi.

6.2.- LES PLAQUETES I EL DESENVOLUPAMENT DE LESIONS ATEROSCLERÒTIQUES

Les plaquetes que s'adhereixen a la paret dels vasos als llocs d'activació de les cèl·lules endotelials contribueixen al desenvolupament de lesions ateroscleròtiques cròniques, i quan aquestes lesions es trenquen, provoquen el començament de la trombosi arterial aguda. Les plaquetes s'adhereixen a l'endoteli de les artèries caròtides en ratolins deficients per apolipoproteïna E (apoE)^{-/-} abans que les lesions ateroscleròtiques fossin visibles.⁷⁷ El factor de von Willebrand, quan és secretat en grans quantitats per les cèl·lules endotelials en resposta a estímuls inflamatoris, pot reclutar plaquetes al lloc; la interacció entre la glicoproteïna Ib i el factor de von Willebrand permeten a les plaquetes rodar cap a les cèl·lules endotelials. Les lesions ateroscleròtiques en ratolins deficients en el factor de von Willebrand^{-/-} són més petites que les lesions amb ratolins amb el factor de von Willebrand⁷⁸, d'acord amb estudis previs en porcs deficients en VWF^{78a,78b, 78c, 78d, 78e}.

L'acceleració de l'aterogènesi pel tromboxà depenent de COX-1 en ratolins deficients en el receptor de lipoproteïnes de baixa densitat (LDLreceptor)^{-/-} suggereix que l'activació de les plaquetes incrementa la proporció de formació de placa.⁷⁹ La inhibició de la síntesi del tromboxà de les plaquetes,⁸⁰ així com l'antagonisme⁸¹ o deleció⁸² del receptor del tromboxà, retrassa l'aterogènesi en models amb ratolins.

Les plaquetes activades poden també influenciar en la progressió de la formació de la placa mitjançant l'alliberació de lligands d'adhesió, com la P-selectina, que és expressada a la membrana de les plaquetes i media les interaccions entre l'endoteli i les plaquetes.⁵⁷ Les senyals de la P-selectina estimula els monòcits i els macròfags a produir factors quimioatracients o de creixement. A més, la unió per P-selectina del lligand 1 (PSL1) a la superfície dels monòcits inicia la formació dels agregats plaqueta-monòcit i la senyal fora-dins que indueix la transcripció de COX-2.⁸³ La prolongada senyal depenent d'adhesió promou l'expressió de la interleucina-1 β . Aquesta citocina accelera l'estabilitat del ARN missatger de la COX-2, així es promou la síntesi de l'enzim.⁸³ Les plaquetes activades exacerben l'aterosclerosi en ratolins deficients en apoE^{-/-} de forma depenent de la P-selectina.⁸⁴

6.2.1.- Mediadors de la inflamació derivats de plaquetes

Les plaquetes activades alliberen mediadors inflamatoris i mitogènics dins el microambient local, així alteren les propietats quimiotàctiques i adhesives de les cèl·lules endotelials.⁸⁵ Aquestes alteracions de la funció cel·lular endotelial induïdes per

les plaquetes ajuden la quimiotaxi, l'adhesió, i la transmigració dels monòcits a les zones amb inflamació.

El lligand CD40 (CD40L) alliberat per les plaquetes indueix una resposta inflamatòria a l'endoteli.⁸⁶ Aquest lligand, originalment identificat en cèl·lules T activades, és una proteïna trimèrica transmembrana de la família dels factors de necrosi tumoral. El lligand CD40 és emmagatzemat al citoplasma de les plaquetes circulants i ràpidament apareix a la superfície després de l'activació de les plaquetes.⁸⁷ A la membrana de les plaquetes, el lligand CD40 sofreix un trencament per damunt d'un període de minuts o hores, generant un fragment soluble funcional. El lligand CD40 derivat de plaquetes pot induir les cèl·lules endotelials a produir espècies reactives d'oxigen (ROS),⁸⁸ l'adhesió de molècules, quimiocines,⁸⁶ i el factor tissular,⁸⁹ tots ells com a components de la resposta inflamatòria. El bloqueig de la via de senyalització CD40-CD40L inhibeix de forma remarcable la formació de la placa ateroscleròtica i la deposició del lípid a les artèries en ratolins deficients en el receptor de les LDL^{-/-}.⁹⁰ Un estudi prospectiu de la salut de la dona va trobar que els nivells alts en plasma del lligand CD40 estaven associats amb el increment del risc d'episodis vasculars.⁹¹ A més, varis factors de risc cardiovascular, incloent el fumar cigarrets⁹² i la diabetis mellitus de tipus 2,⁹³ estan associades amb l'activació de les plaquetes i al increment d'alliberació del lligand de plaquetes CD40 i el factor tissular derivat dels monòcits.⁹⁴

En contrast al lligand CD40, el qual s'emmagatzema al citoplasma de les plaquetes, la interleucina-1 β és sintetitzada amb l'activació de les plaquetes.^{60,95} La quantitat de interleucina-1 β que sintetitzen les plaquetes activades, per la via de senyalització depenent de la translació del ARN missatger de la interleucina-1 β , és suficient per induir a les cèl·lules endotelials a expressar gens que intervenen en l'adhesió dels leucòcits.⁶⁰ La interleucina-1 β és un important mediador de l'activació de les cèl·lules endotelials induïda per les plaquetes, això els hi causa un increment en l'alliberació de quimiocines i augmenta les molècules que promouen l'adhesió de neutròfils i monòcits a l'endoteli.⁸⁵

L'estimulació de les plaquetes per forts agonistes poden causar la pèrdua de petites vesícules de membrana de la superfície de les plaquetes.⁹⁵ A llocs amb dany vascular, l'expressió de P-selectina per cèl·lules endotelials o plaquetes activades poden provocar el reclutament de micropartícules que continguin el lligand 1 de la

glicoproteïna P-selectina i el factor tissular.⁹⁵ Les micropartícules també poden estar involucrades en l'augment de la formació de prostanoids depenents de COX-2 en monòcits i cèl·lules endotelials, involucrant el metabolisme transcel·lular de l'àcid araquidònic.^{96,97}

Les plaquetes activades o les micropartícules de les plaquetes també alliberen quimiocines que poden provocar el reclutament de monòcits⁹⁸ o promoure la seva diferenciació a macròfags.^{99,100} El factor 4 de les plaquetes (PF4), una quimiocina específica de plaquetes alliberada per activació de les plaquetes, induïx l'expressió de la E-selectina per les cèl·lules endotelials.¹⁰¹ Les plaquetes activades també alliberen enzims que degraden la matriu tals com les metaloproteïnases 2 i 9.⁸⁵ Les plaquetes són un font rica en estimuladors i inhibidors de l'angiogènesi i juga un paper important en aquest procés.¹⁰²

6.2.2.- Les espècies reactives d'oxigen i l'activació de les plaquetes

L'alliberament augmentat de les espècies reactives de l'oxigen (ROS) (ex, O_2^-) des de la paret vascular (on les cèl·lules endotelials i les musculars llises expressen un seguit d'enzims que generen aquestes espècies) indirectament afecta l'activació de les plaquetes perquè les espècies capturen l'òxid nítric (NO).¹⁰³ Les plaquetes també poden generar espècies reactives de l'oxigen. El metabolisme de l'àcid araquidònic per mitjà de la via de la COX-1 contribueix a la producció d'espècies reactives de l'oxigen a les plaquetes activades. Agonistes que induïxen l'activació de les plaquetes també activen la isoforma de la NADPH oxidasa de les plaquetes.¹⁰⁴ La producció de O_2^- per les plaquetes a través de la via depenent d'aquestes oxidases augmenta la incorporació de plaquetes al trombus creixent.¹⁰⁵

El O_2^- és un rellevant i funcional segrastador de l'òxid nítric i regula les ectonucleotidases redox-sensibles a la membrana de les plaquetes i les cèl·lules endotelials.^{103,106} La captació de l'òxid nítric per les espècies reactives de l'oxigen evita la seva participació en l'última desagregació d'un trombus. A més, la supressió accelerada de l'òxid nítric pot produir-se a través de la seva reacció amb productes derivats de l'activitat de COX-1.¹⁰⁷

La generació augmentada d'espècies reactives de l'oxigen pot induïr l'augment de la peroxidació dels lípids dels fosfolípids de la membrana de les cèl·lules o les LDL circulants, que conduirà a un increment de la generació de F_2 -isoprostans, una família

de isòmers de prostaglandines produïdes a partir de l'àcid araquidònic per un mecanisme catalitzat per radicals lliures.^{108,109} Els F₂-isoprostans poden modular les reaccions d'adhesió i activació de les plaquetes induïdes per un baix nivell d'altres agonistes.¹¹⁰

La consistent relació entre la proporció de formació de F₂-isoprostans i el tromboxà en dones obeses¹¹¹ i en pacients amb hipercolesterolèmia,¹¹² diabetis mellitus tipus 2,¹¹³ o homocistinúria homozigòtica¹¹⁴ suggereix que a baixos graus d'estats inflamatoris associats amb aquests desordres metabòlics poden ser el principal desencadenant de l'activació de les plaquetes per la via del tromboxà que està mediada, al menys en part, per un augment de la peroxidació dels lípids.

6.2.3.- Les plaquetes en l'aterogènesi en humans

L'evidència del rol de les plaquetes en l'aterogènesi en els humans és limitada i bastant indirecte. Vàries citocines i factors de creixement derivats de les plaquetes són detectables a les plaques ateroscleròtiques.^{62,115} A més l'activació de les plaquetes està associada amb un augment de l'espessor de la paret de l'artèria caròtida¹¹⁶ i amb el progressiu espessiment de l'artèria en pacients amb diabetis mellitus tipus 2.¹¹⁷ L'activació persistent de les plaquetes, com a reflex de l'increment de l'excreció de metabòlits del tromboxà, ha estat publicat amb associació amb un major nombre de factors de risc cardiovascular que acceleren l'aterogènesi.¹¹⁸⁻¹²² Aquests estudis suggereixen que l'activació de les plaquetes uneix diverses anormalitats metabòliques i hemodinàmiques cap a una accelerada aterogènesi.¹²³ Donada l'edat avançada dels subjectes participants i la naturalesa dels punts finals vasculars, els estudis de l'aspirina no van conduir a afirmar aquesta hipòtesi.¹²⁴ La mateixa consideració es podria aplicar als estudis clínics dels inhibidors selectius de la COX-2.^{125,126b}

6.3.- LES PLAQUETES I LA TROMBOSI ARTERIAL

L'aterosclerosi sense trombosi amb restricció de flux és una malaltia de progressió lenta. El mecanisme habitual responsable de la transició sobtada d'una malaltia estable, sovint clínicament silenciosa, a condicions simptomàtiques d'amenaça per la vida és l'erosió i desgast de la superfície endotelial o el trencament de la placa seguida de trombosi.¹²⁶ L'activació de les plaquetes es produeix en els llocs vulnerables, on la prima capa fibrosa que separa el nucli ric en lípids de la placa del lumen es desintegra, es trenca o s'estripa.¹²⁶ La majoria d'aquestes lesions agudes vasculars es resolen espontàniament a través d'un fenomen de reparació semblant a l'homeòstasi.

L'hemorràgia dins la placa fisurada i el taponament de la superfície trencada mitjançant les plaquetes contribueix a la impredecible, i no lineal progressió de les lesions coronàries.¹²⁶ Tanmateix, en una substancial proporció d'episodis simptomàtics del trencament agut de la placa coronària, l'activació de les plaquetes progressa cap a una persistent trombosi intraluminal en l'absència d'un tractament antitrombòtic.¹²⁷

6.3.1.- L'activació de les plaquetes en el síndrome coronari agut

Models animals de trombosi arterial^{128,129} han demostrat que la mecànica, la fotoquímica, o el dany tèrmic dels vasos sans exposen la matriu extracel·lular, així com el desencadenament de la formació del trombus a través de mecanismes dependents del col·lagen i la trombina.¹²⁹ Hi ha, tanmateix, diferències entre els sistemes hemostàtics de ratolins i d'humans, incloent un considerable nombre més alt de plaquetes circulants en els ratolins.¹³⁰ La ruptura espontània de la placa i la trombosi secundària han estat descrites en ratolins apoE^{-/-} i LDLR^{-/-},¹³¹ però aquests esdeveniments sempre ocorren en ratolins vells després d'una prolongada ingesta amb una dieta rica en grasses, i el trombus oclusiu intraluminal ocorre molt rarament. Han estat descrits varis mètodes de desencadenament de la ruptura de la placa en ratolins apoE^{-/-},¹³² però no semblen tenir un fenotip semblant a aquests pacients.

L'evidència més convincent de la participació de les plaquetes en la trombosi arterial en humans ve des d'estudis d'activació de plaquetes en pacients amb síndrome isquèmica aguda i d'estudis de fàrmacs antiplaquetars. Augments transitoris en l'excreció de metabòlits de tromboxà han estat descrits en pacients amb síndrome coronària aguda.^{133,134} La naturalesa episòdica de l'activació de les plaquetes és consistent amb el concepte de trombosi coronària com a un procés dinàmic, en el qual episodis repetits de formació de trombus i fragmentació ocorren en el trencament d'una placa.¹²⁶ El tractament amb aspirina o Streptocinasa, iniciat 24 hores després del començament del suposat infart agut de miocardi, va reduir la mortalitat 5 setmanes després, aproximadament en un 25%.¹³⁵ Aquesta descoberta ens indica clarament el concepte que repetits episodis d'activació de les plaquetes sobre la persistent superfície trombogènica d'una placa trencada és un important factor que contribueix al risc de mort per causes coronàries.¹³⁶ El descobriment de la reducció d'un 50% en el risc d'infart de miocardi o mort per causes vasculars entre pacients amb angina inestable els quals prenen aspirina¹²⁷ ens fa adonar de la importància del tromboxà A₂ com a mecanisme mediat per les plaquetes de creixement i estabilització d'un trombus coronari intraluminal.

6.3.2.- L'activació de les plaquetes en l'embòlia isquèmica aguda

L'activació de les plaquetes és també important en pacients amb embòlia isquèmica,¹³⁷ tal com suggereixen mesures bioquímiques^{138,139} i estudis d'inhibidors de plaquetes.¹³⁷ L'increment d'episodis en la biosíntesi del tromboxà han estat descrits en la fase aguda de l'embòlia isquèmica,^{138,139} encara que amb una més baixa freqüència i una durada més curta que el síndrome coronari agut.^{133,134} Aquesta diferència pot reflectir l'heterogeneïtat dels mecanismes responsables de l'embòlia isquèmica – una trombosi en les artèries llargues compte per només una fracció dels esdeveniments isquèmics.¹³⁷ L'efecte de la teràpia de l'aspirina, començada 48 hores després dels símptomes d'una embòlia isquèmica aguda, en índexs a curt termini de mort i resultats no fatals¹³⁷ és bastant més petit que el benefici vist en la fase aguda de l'infart de miocardi.¹³⁵

7. FACTORS DERIVATS DE L'ENDOTELI

7.1.- La prostaciclina i el tromboxà A₂

La prostaciclina (figura 6) és un vasodilatador prostanoid que inhibeix l'activació de les plaquetes en resposta a una varietat d'agonistes.⁷⁵ En un model de ratolí de dany de la caròtida induït per un catèter, la proliferació vascular i l'activació de les plaquetes van ser augmentades en ratolins amb el receptor de la prostaciclina silenciats^{-/-} però inhibides en ratolins amb el receptor del tromboxà A₂ silenciats^{-/-}.¹⁴⁰ La resposta augmentada al dany vascular va ser abolida en ratolins deficients en els dos receptors.¹⁴⁰ Aquests descobriments suggereixen que la prostaciclina modula les interaccions vasculars amb les plaquetes, especialment, limita la resposta al tromboxà A₂. Baixes dosis d'aspirina redueixen la producció de tromboxà A₂ procedent de les plaquetes d'un 97 a un 99% en humans,¹²⁷ i que aquesta reducció ha estat imitada en un model de ratolí amb al·lels hipomòrfics de COX-1 (COX-1 “Knockdown”).¹⁴¹ La disminució del 97% en la producció de tromboxà A₂ de les plaquetes en aquests ratolins disminueix l'agregació de les plaquetes i prevé contra la trombosi arterial induïda per dany fotoquímic.

En ratolins, la inhibició selectiva, l'eliminació o la mutació del gen COX-2 o la deleció del receptor de la prostaciclina accelera l'oclusió trombòtica de l'artèria caròtida induïda per dany fotoquímic.¹⁴² Els efectes de la deleció del receptor de la prostaciclina van ser dependents del número dels al·lels afectats: un fenotip trombòtic està associat amb la deleció de només una còpia del gen.¹⁴² Ni la interrupció de la COX-2 ni la deleció del receptor de la prostaciclina van conduir a una trombosi espontània, però les dues van

augmentar la resposta a estímuls trombogènics.¹⁴² Aquests efectes van ser atenuats, però no suprimits, amb l'emascament de COX-1.¹⁴²

L'aspirina és un antitrombòtic amb una àmplia gamma de dosis diàries, que van des de 30 mg a 1500 mg.¹²⁴ Tanmateix, han estat publicades en comparacions indirectes (per exemple, comparacions del rang de les dosis amb el placebo) i un nombre limitat d'avaluacions normalitzades, una aparent relació inversa entre la dosi d'aspirina i el seu benefici clínic cardiovascular.¹²⁷ Aquest descobriment és consistent amb la inhibició dosi-dependenta de la biosíntesi de prostaciclina per l'aspirina a voluntaris sans.¹⁴³ La importància funcional de la prostaciclina frenant la resposta del tromboxà A₂ és a més seguit d'aproximadament un augment del doble de risc d'infart de miocardi associat amb l'ús d'inhibidors selectius de la COX-2 en pacient amb baix risc per l'aterotrombosi.¹²⁵

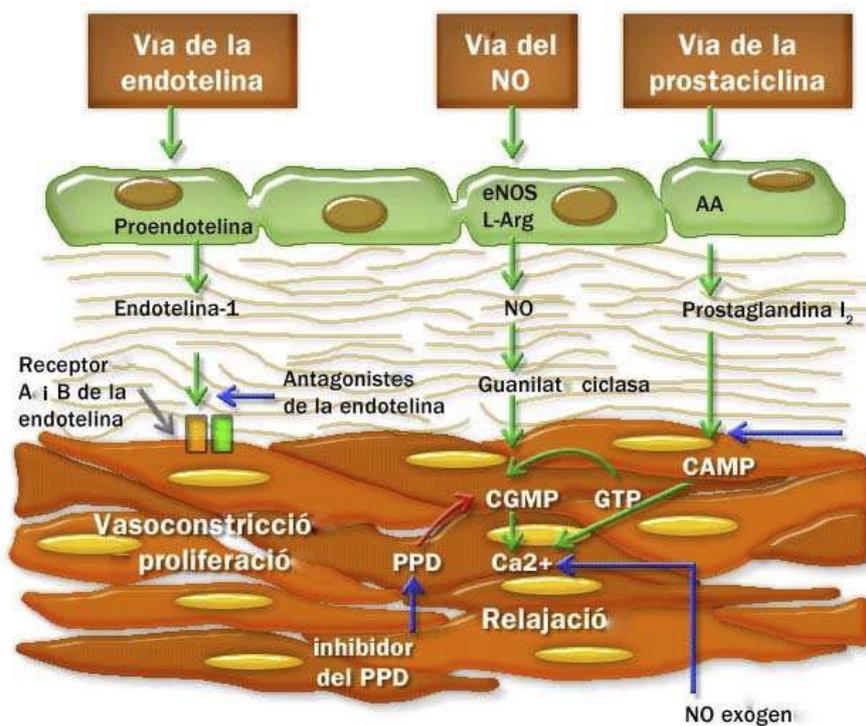


Figura 6. Factors derivats de l'endoteli. Vies de la prostaciclina, òxid nítric i endotelina. Entre aquests factors també hi ha el tromboxà que actua sinèrgicament amb l'endotelina. Adaptada de la web: <http://www.antioxidantes.com.ar/Art247.htm>.

7.2.- L'Òxid nítric (NO)

D'entre tots els factors derivats de l'endoteli, el NO (figura 6) sembla desenvolupar un paper fonamental a través de les seves accions relaxants, antiproliferatives, antitrombòtiques i antioxidants. Per totes les seves funcions es considera la molècula antiaterogènica per excel·lència.¹⁴⁴

La molècula endògena és lipofílica, es forma a partir del grup guanidina de l'aminoàcid semiessencial L-arginina en la seva conversió a L-citrulina gràcies a l'acció de l'enzim òxid nítric sintetasa (NOS);¹⁴⁵ per la seva síntesi es requereix la presència de cofactors com: la flavina mononucleòtid (FMN), la flavina adenina dinucleòtid (FAD), la tetrahidrobiopterina (H4B) i el NADPH.^{146,147} S'han identificat tres isoformes de NOS; dos constitutives: l'endotelial (eNOS) i el neuronal (nNOS) i un induïble (iNOS). Els enzims es codifiquen a partir dels gens localitzats als cromosomes 7, 12 i 17 respectivament.¹⁴⁸ Les formes constitutives i la seva expressió és dependent del calci,¹⁴⁸ la forma induïble és expressada principalment en condicions d'inflamació o infecció i és independent del calci.¹⁴⁸ L'enzim endotelial està ubicat a la membrana cel·lular i en algunes ocasions al citoplasma; el nNOS és fonamentalment citosòlic.¹⁴⁹

El NO s'allibera de manera pulsàtil, és molt làbil, posseeix un electró no aparellat i té una vida mitja molt curta, aproximadament de 6 segons.¹⁴⁸ Pot ser un radical lliure, ja que és una molècula inestable que aconsegueix estabilitzar-se al unir-se a altres espècies paramagnètiques com l'oxigen formant nitrits (NO₂) i nitrats (NO₃).¹⁵⁰

A nivell intracel·lular, el NO activa la guanil ciclasa soluble, produeix un canvi conformacional en el lloc catalític i permet la conversió de guanosina 5 trifosfat a guanosina 3,5 monofosfat cíclica (GMPc). Aquesta acció incrementa la concentració de GMPc cel·lular fins a 100 vegades¹⁵¹ i redueix la quantitat de calci intracel·lular permetent la relaxació muscular mediada per la proteïna cinasa dependent de GMPc.¹⁵¹

En el múscul llis vascular, els efectes del GMPc són mediat a través de proteïnes cinases,¹⁵¹ canals iònics i fosfodiesterases.¹⁵² El GMPc hiperpolaritza la membrana cel·lular inhibint el influx de calci i disminuint la sensibilitat dels miofilaments al mateix.¹⁵² El múscul esquelètic posseeix nNOS i eNOS, el primer localitzat a la regió subsarcolèmica i a la unió neuromuscular; i el segon distribuïda a les fibres musculars i la paret dels vasos; l'exercici estimula la producció de NO per una via independent del consum de glicogen.¹⁵³ En estudis experimentals s'ha demostrat que la síntesi de NO es

produceix per altres mecanismes moleculars intracel·lulars diferents de les concentracions de calci, entre aquests s'inclouen l'activació de la proteïna cinasa B i l'activació de la fosfolipasa C.¹⁴⁷

7.2.1. L'òxid nítric i la fosforil·lació oxidativa

La fosforilació oxidativa mitocondrial és la major font intracel·lular d'espècies reactives d'oxigen (ROS): superòxid, peròxid i radicals hidroxil; produïts a la cadena de transport d'electrons, i són conseqüència inevitable del metabolisme aeròbic.¹⁵⁴ A nivell intracel·lular existeixen sistemes antioxidants que protegeixen contra el dany dels ROS; complexos enzimàtics com el superòxid dismutasa, catalasa i glutatió, disminueixen els ROS i activen sistemes de reparació endògena si s'esdevé algun grau de dany cel·lular. En certes condicions el sistema és inadequat i l'elevació dels ROS produeix citotoxicitat per la disrupció de la regulació del calci intracel·lular per la iniciació de l'apoptosi.¹⁵⁴

El NO al combinar-se amb radicals superòxid genera molècules com el peroxinitril disminuint així la seva disponibilitat.¹⁴⁹ El peroxinitril, igual que tots els ROS indueix l'apoptosi, produeix nitració irreversible de proteïnes, la inactivació enzimàtica, el dany del ADN, la disrupció de la integritat mitocondrial i d'altres components de la microarquitectura cel·lular ja sigui per contacte directe o per peroxidació lipídica.^{149,154}

7.2.2. L'òxid nítric i el sistema cardiovascular

L'endoteli és un òrgan dinàmic que secreta substàncies biològicament actives. Permet el intercanvi de biomolècules entre el plasma i els teixits, regula el tò vascular, els processos inflamatoris, el metabolisme lipídic, el creixement i remodelació vascular, el control de coagulació i la fibrinòlisi.¹⁴⁸

La paret endotelial aconsegueix la relaxació muscular a través dels receptors muscarínics de l'acetilcolina (Ach) per acció del NO,¹⁴⁸ altres productes de la inflamació i agregació plaquetària (serotonina, histamina, bradiquina, purines i trombina) també exerceixen tota o part de la seva acció a través del NO.¹⁵⁵ L'alteració en la producció del NO ha estat implicada en enfermetats com l'aterosclerosi, la hipertensió, el vasoespasme cerebral, el vasoespasme coronari i el dany en isquèmia per reperfusió.¹⁵⁵ S'han identificat inhibidors de la producció de NO derivats de la L-arginina (AMDA i SMDA) a concentracions elevades en el plasma de pacients amb enfermetats com la

sepsi, HTA, diabetis, hipercolesterolèmia, aterosclerosi, preeclàmpsia i microangiopatia trombòtica.¹⁴⁸

Canvis en la viscositat sanguínia produeixen estímuls sobre la paret vascular que indueixen la producció de NO gràcies a l'acció del eNOS, per activació dels canals iònics que permeten un augment de les concentracions de calci intracel·lular. S'ha demostrat una via d'activació de la seva síntesi independent de la concentració de calci, a l'activar la serina/treonina proteïna quinasa que fosforil·la i activa el eNOS, incrementant fins a 6 vegades la seva concentració després d'una hora d'exposició de l'endoteli a l'estrès hemodinàmic. A la llarga, l'activitat enzimàtica està regulada per la transcripció gènica via el fosfatidil inositol 3 cinasa (PI-3K) i el AKT cinasa.¹⁵⁶

Els nivells elevats de lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) disminueixen l'apoptosi endotelial i juguen un paper important en la vasorelaxació mitjançant l'increment de l'alliberació de NO i prostaciclina a través de l'expressió i activació del eNOS, l'acoblament de la ciclooxigenasa 2 i la síntesi de prostaciclina.¹⁵⁷ En les primeres etapes de la hipercolesterolèmia la producció i activitat del NO es veu disminuïda, inclús abans que es facin evidents els canvis estructurals de la paret vascular. En la patologia ateroscleròtica es troben nivells elevats de lipoproteïnes de baixa densitat (LDL), la seva oxidació consumeix el NO i produeix la seva acumulació a l'espai subendotelial de la paret endotelial.¹⁴⁸ Aquestes LDL interactuen amb els ROS i les espècies reactives del nitrogen produïdes a les cèl·lules endotelials i als macròfags; l'augment de l'estrès nitrooxidatiu indueix la disfunció endotelial per inactivació del eNOS. La disminució en la producció del NO promou l'adhesió plaquetària, la inflamació, la trombosi i la proliferació de les cèl·lules del múscul llis.¹⁵⁸ En la hipertrigliceridèmia s'incrementa la producció de superòxid pels leucòcits. Altres factors aterogènics com els àcids grassos lliures i les concentracions baixes de lipoproteïnes d'alta densitat (HDL) incrementen encara més l'estrès oxidatiu, contribuint a reduir la disponibilitat del NO.¹⁴⁸

Les HDL produeixen efectes positius cardiovasculars i poden disminuir el risc d'enfermetat cardiovascular. Molts estudis han il·lustrat que les HDL poden estimular la producció del NO. Les HDL s'uneixen al seu receptor de proteïna classe B, anomenat SR-BI, l'acoblament produeix l'activació del AKT cinasa que indueix la síntesi del eNOS i la posterior generació del NO.¹⁵⁹

La presència d'hipertensió arterial (HTA) es troba associada a una alteració de la relaxació muscular relacionada amb una reducció del NO. No està clar si la disminució

de la resposta vasodilatadora mediada pel NO causa HTA o si la disminució del NO és secundària a la patologia.¹⁴⁸ Sembla ser que l'angiotensina II pot activar el NADPH oxidasa i a través del seu receptor AT1 estimula les tirosines cinases que fosforil·len residus de tirosina de proteïnes via el ERK 1 / 2 (cinases regulades per senyals extracel·lulars 1 and 2) que produeixen la proliferació cel·lular i estimulen la presència de metaloproteinases a la matriu extracel·lular. Això anterior i l'augment de PAI-1 (inhibidor de l'activador del plaminogen 1), afavoreixen l'estat protrombòtic de la disfunció endotelial.¹⁶⁰

La capacitat del NO d'unir-se a l'hemoglobina fa que actui com a vasodilatador perifèric, modificant el tò vascular en un lloc distant al de la seva producció. El NO que reacciona amb el grup hemo forma el nitrat o nitrosil de ferro, aquests S-nitrosotiols (SNOs) són derivats estables del NO i mantenen les seves propietats vasodilatadores. L'alliberació de S-nitrosotiols des de les cèl·lules sanguínies a teixits amb concentracions baixes d'oxigen, és la responsable de la vasodilatació hipòxica en el lit vascular sistèmic, que augmenta el flux microvascular i l'aport d'oxigen. En altres condicions, per la seva vida mitja curta, no es produiria l'efecte vasodilatador del NO en aquests teixits.¹⁵²

En els diabètics, la funció endotelial està alterada; el grau d'hiperglucèmia, l'acumulació de productes finals de glicosilació, la concentració d'insulina i la presència de complicacions com la neuropatia són determinants essencials en la disfunció vascular.¹⁶¹ Encara que no està clar en quin grau l'enfermetat altera els senyals del NO. Se sap que els pacients diabètics de tipus 2 posseeixen una resposta vasodilatadora disminuïda.¹⁶² En estadis primaris com en el de la resistència a la insulina ja es presenta l'alteració en la producció del NO.¹⁶³ El dèficit del cofactor essencial H4B, que es presenta en els pacients fumadors i en aquells amb resistència a la insulina, produeix l'alteració de la relaxació muscular per la disminució del NO. L'ús d'insulina prevé l'efecte danyós de la hiperglucèmia i sembla ser que incrementa l'expressió dels NOS, la qual cosa millora la producció del NO.¹⁶²

Langouche i els seus col·laboradors proposen que les baixes concentracions del NO, normalment generades pel eNOS són beneficioses per la funció d'òrgans específics, mentre que les seves altes concentracions, generades en condicions fisiopatològiques pel iNOS contribueixen a la disfunció endotelial, l'excessiva vasodilatació, la fuga vascular i el dany tissular.¹⁶⁴ A nivell intestinal, per exemple, en condicions

patològiques l'expressió del iNOS pot relacionar-se amb la reparació de l'epiteli, però a mesura que s'eleva els nivells del NO la permeabilitat intestinal s'incrementa i s'observen efectes tòxics cel·lulars directes per la presència de productes nitrats.¹⁶⁵

El NO prevé l'agregació plaquetària, la proliferació de les cèl·lules musculars llises i l'adhesió dels leucòcits a l'endoteli. Quan existeix una exposició de l'endoteli als ROS s'altera el balanç homeostàtic atenuant l'alliberació del NO i incrementant la producció de citokines proinflamatòries promovent la formació de les plaques ateroscleròtiques.¹⁶⁶ En la falla cardíaca crònica existeix un desequilibri entre les molècules vasodilatadores derivades de l'endoteli i les substàncies vasoconstrictores com l'endotelina-1. La sensibilitat de la cèl·lula endotelial al NO es redueix en relació directa amb el grau de severitat de l'enfermetat.¹⁴⁸

8. APOPTOSI

L'Apoptosi és una forma de suïcidi cel·lular regulada genèticament i conservada al llarg de l'evolució que és essencial pel normal desenvolupament dels organismes multicel·lulars. Primer de tot, es va descriure com un mecanisme de mort cel·lular morfològicament diferent de la necrosi.¹⁶⁷ Les cèl·lules apoptòtiques estan caracteritzades per presentar una membrana plasmàtica encongida, condensació citoplasmàtica i nuclear, fragmentació cel·lular i l'engulliment dels cossos apoptòtics per les cèl·lules veïnes.¹⁶⁷ Les evidències bioquímiques per l'apoptosi van ser establides a la dècada del 80s i els posteriors estudis han demostrat que l'activació i el trencament de polipèptids cel·lulars específics (anomenats caspases) juguen un paper molt important en l'inici i l'execució de l'apoptosi.^{168,169} Una vegada activades, les caspases de forma proteolítica trenquen una sèrie de proteïnes involucrades en els processos intracel·lulars que medien la supervivència de la cèl·lula i així contribueixen als canvis morfològics i bioquímics observats durant l'apoptosi.

Fins ara han estat descrites dues vies (figura 7) que condueixen a l'activació de les caspases:

1.- La via extrínseca, la qual és mediada pels "receptors de la mort" els quals són membres de la superfamília de receptors del factor de necrosi tumoral (TNF). La via del receptor de la mort FAS. La unió del lligand FAS (FASL) amb el receptor FAS inicia el reclutament del domini de la mort associat a FAS (FADD) a la cua citoplasmàtica del FAS i és seguida per l'activació de caspases (caspases 8 o 10). El trencament d'aquestes caspases instiga l'activació de les caspases efectores (caspases 3, 6 i 7), que portaran a una mort cel·lular irreversible.

2.- La via intrínseca, consisteix en la translocació de factors proapoptòtics de la família del Bcl-2 tals com Bad i Bax a la mitocondria, on interaccionaran amb membres de la família antiapoptòtica del Bcl-2 (Bcl-X_L i el propi Bcl-2), alterant el potencial de la membrana mitocondrial i donant com a resultat l'alliberació del citocrom c. La unió del citocrom c a APAF-1 i la procaspasa 9 genera la formació d'un complex (l'apoptosoma) que donarà lloc a l'inici de la cascada de les caspases.

Es donen molts entrecreuaments entre les vies extrínseca i intrínseca. Per exemple, en alguns tipus de cèl·lules, l'activitat de la caspasa 8 és insuficient per activar la caspasa 3 i, de pas, trenca la proteïna proapoptòtica Bid per iniciar la via mitocondrial de l'apoptosi.

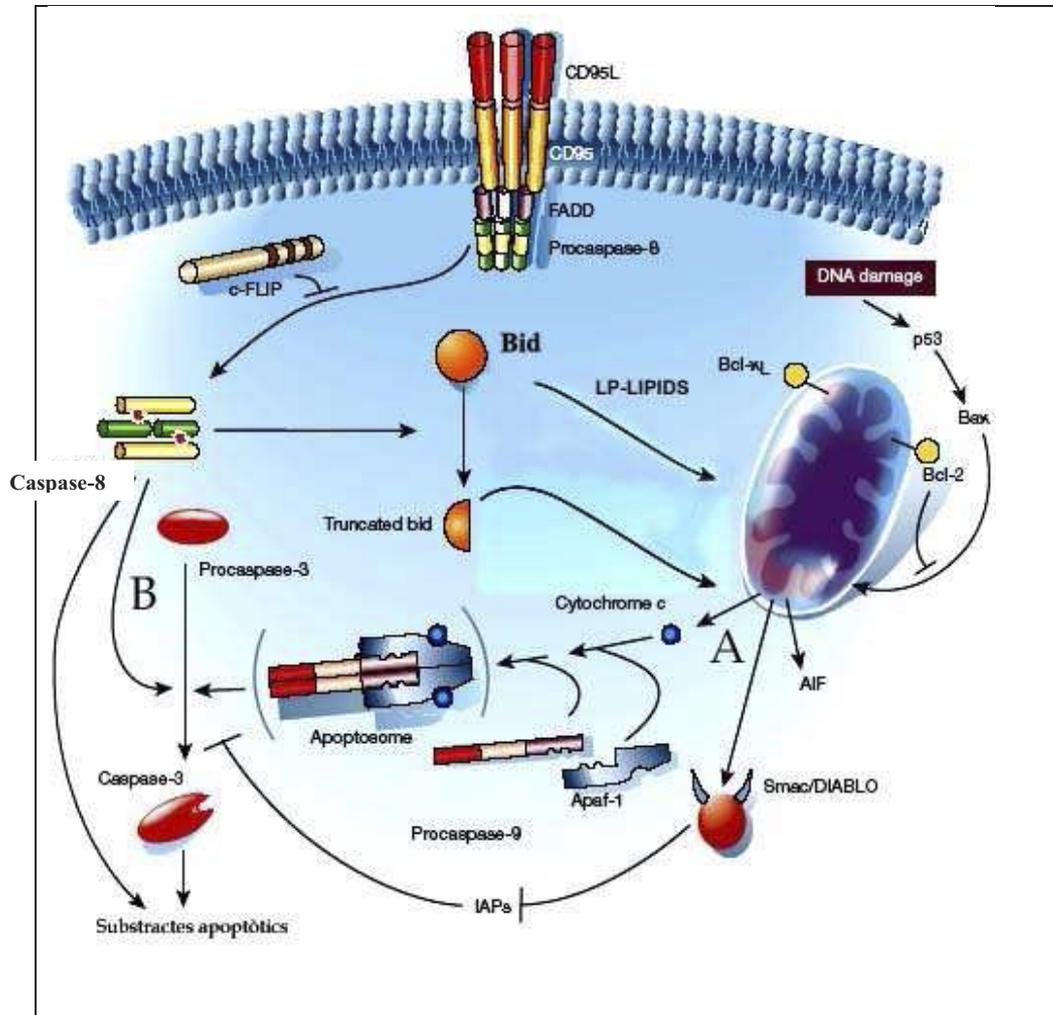


Figura 7. Apoptosi cel·lular. Amb la lletra A es representa la via intrínseca de l'apoptosi, la qual es dona mitjançant la despolarització de la membrana interna de la mitocondria alliberant el citocrom C que permetrà la formació de l'apoptosoma. D'altra banda amb la lletra B es representa la via extrínseca de l'apoptosi que s'inicia en el receptor FAS que transmet l'estímul a la caspasa 8. Adaptada de la web: <http://profs.sci.univr.it/~crimi/recent97-00.html>

8.1.- Apoptosi de les cèl·lules endotelials vasculares

L'apoptosi de les cèl·lules endotelials en les lesions ateroscleròtiques poden ser per tant responsables de l'estat de vulnerabilitat de les plaques.¹⁷⁰ Un anàlisi quantitatiu de 13 plaques examinades *in situ* per apoptosi van revelar un increment en la mort de les cèl·lules endotelials en els segments d'entrada a les plaques. Aquestes àrees tenen un

fluxe lent i un baix esforç de cisalla en comparació amb les parts altes dels segments.¹⁷¹ Tricot et al. han proposat que un fluxe de sang més lent en les seccions hipòxiques de les plaques ateroscleròtiques poden conduir a l'apoptosi de les cèl·lules endotelials les quals poden influir a la inestabilitat de la placa i a la formació d'un trombus. Un estudi recent, ha demostrat que una apoptosi incrementada de les cèl·lules endotelials del cordó umbilical seguida d'una incubació amb sèrum derivat dels propis pacients amb síndromes coronaris aguts, suggereix un correlació entre l'apoptosi incrementada de les cèl·lules endotelials i les lesions coronàries complexes. Així, els factors proapoptòtics trobats en el sèrum dels pacients amb síndrome agut de miocardi poden desenvolupar apoptosi endotelial i contribuir a la inestabilitat de la placa,¹⁷⁰ suggerint que el focus en la lesió simple inestable, així com els processos sistèmics, poden ser massa simplistes.^{172,173}

A banda de la seva habilitat per promoure la inflamació en les plaques, les lipoproteïnes de baixa densitat oxidades (oxLDL) també s'ha trobat que indueixen apoptosi a les cèl·lules endotelials.¹⁷⁴⁻¹⁷⁶ Tot i que les cèl·lules endotelials expressen FasL, també tenen una petita expressió de FAS i generalment són considerades resistents a la mort cel·lular mediada per FasL.¹⁷⁵ Sata and Walsh¹⁷⁴ no obstant això van demostrar que l'apoptosi induïda per les oxLDL en cèl·lules endotelials cultivades i en l'endoteli d'explants d'arteria poden requerir la via del Fas/FasL, podent bloquejar l'apoptosi usant anticossos neutralitzants del FasL.¹⁷⁴ A més, a partir del cultiu d'endoteli de ratolins FasL^{-/-} i Fas^{-/-} es va veure una reducció de l'apoptosi de les cèl·lules endotelials exposades a les oxLDL.¹⁷⁴

8.2.- Apoptosi dels macròfags

Els macròfags secreten proteases de matriu que poden promoure la mort de la matriu extracel·lular procedent de les cèl·lules musculars, així contribuint a l'aprimament del cap fibrós de la placa. Per això, la pèrdua de macròfags per apoptosi ha estat generalment percebuda com una estabilització de la placa durant els estadis primaris del desenvolupament de la lesió.¹⁷⁷ Hi ha alguna controvèrsia pel que fa a això ja que la mort de macròfags també ha estat detectada als llocs amb ruptura de la placa,^{178,179} i un augment en l'apoptosi dels macròfags a aquests llocs està actualment considerat que contribueix a l'ateroprogessió. De fet, la mort apoptòtica dels macròfags (cèl·lules espumoses) poden contribuir a la formació d'un alevat nucli lipídic trombogènic¹⁸⁰ i així ajudar a un increment de la inestabilitat de la placa.¹⁸¹ Els macròfags moribunds poden alliberar proteases que poden degradar l'estabilització del col·lagen essencial que manté

la força de tensió, contribuint a la inestabilitat de la placa ateroscleròtica.¹⁸² Tot i això la causa de la mort dels macròfags encara roman limitada, estudis recents suggereixen que les citocines produïdes per les cèl·lules inflamatòries juguen un paper clau, ja que poden regular un gran nombre de processos entre els quals hi ha la proliferació de les cèl·lules, el metabolisme lipídic i la producció de matriu extracel·lular. Una citocina de les quals és el interferó-gamma (IFN- γ). El IFN- γ produït per limfòcits-T activats ha estat identificat en lesions ateroscleròtiques,¹⁸³ i Inagaki et al.,¹⁸⁴ van trobar que el IFN- γ disminuïa significativament la síntesi de DNA de la línia de macròfags THP-1. Aquests resultats van ser correlacionats amb un increment en l'apoptosi de macròfags.¹⁸⁴

Altres factors que també s'ha demostrat que poden induir apoptosi en els macròfags són la IL-18, l'acumulació de colesterol lliure o la seva cristallització i la desestabilització del lisosoma.¹⁸⁵⁻¹⁸⁸

8.3.- Apoptosi de les cèl·lules musculars llises

L'Apoptosi de les CML en les regions vulnerables de la placa poden contribuir a la seva desestabilització i la seva potencial ruptura.¹⁸⁹ Moltes evidències sostenen que les CML estan involucrades en l'avanç de l'aterosclerosi incloent un reduït índex proliferatiu¹⁹⁰ i una sensibilitat augmentada per l'apoptosi en les CML derivades del teixit de la placa comparades amb les cèl·lules d'aorta normal,¹⁹¹ i a més un increment de l'apoptosi de les CML provinents d'una angina inestable en front d'una estable.¹⁹² La majoria de la mort apoptòtica s'ha vist que ocorre en les proximitats del nucli necròtic ric en lípid,¹⁹³ una regió d'alta vulnerabilitat.

Una de les vies que dirigeix les cèl·lules musculars llises a la mort cel·lular és el sistema FasL/Fas i hi ha evidències que aquesta via de mort juga un paper clau en la inestabilitat de la placa. En primer lloc, el FAS és expressat en ambdues, les cèl·lules inflamatòries i les CML,¹⁹⁴ i l'expressió de FAS en les CML ha estat localitzada majoritàriament a la íntima de les plaques¹⁹⁴ coincidint amb el TUNEL positiu per CML en les regions que contenen cèl·lules T positives en CD3 i macròfags positius en CD68.¹⁹⁵ En segon lloc, el FasL, ben expressat per macròfags i limfòcits T, infiltra les lesions vasculares.¹⁹⁶ A més, el marcatge del FasL ha estat localitzat a les CML de la íntima en 34 de 34 plaques de caròtida examinades.¹⁹⁷

L'evidència més clara del paper del FasL en la mort de les cèl·lules musculars llises la van proporcionar Sata et al.,¹⁹⁸ els quals van inhibir la formació de la neointima després

del dany per angioplàstia usant un adenovirus codificant per FasL (adeno-FasL). L'Adeno-FasL va induir l'apoptosi de les cèl·lules musculars llises les quals també van ser marcades positivament per FAS.¹⁹⁸ A més, nivells elevats de FasL soluble van ser identificats en el plasma de pacients amb infart agut de miocardi i angina inestable de pit¹⁹⁹ i pacients amb hipertensió.²⁰⁰ Les regions inflamàtores de les plaques ateroscleròtiques en pacients amb estenosi en la caròtida també van mostrar nivells elevats de FasL, factor nuclear kappa B i caspasa-9.²⁰¹ Finalment, es va demostrar que la immunopositivitat del FasL estava limitada a les plaques ateroscleròtiques de caròtida humana localitzada a la α -SM actina²⁰² coincident amb el marcatge per factors proapoptòtics, el PHC- ζ (Thr410)^{202,203} i el Sp1²⁰³. Ambdues expressions de PHC- ζ (Thr410) i FasL es van localitzar a les cèl·lules que havien experimentat apoptosi (TUNEL⁺).

El balanç entre la proliferació i l'apoptosi de les cèl·lules musculars llises pot també estar influenciat per la infiltració de cèl·lules del sistema immunitari a la lesió. Per exemple, els macròfags i els limfòcits T produeixen citocines inflamàtores incloent el factor de necrosi tumoral (TNF) i el IFN- γ . La producció d'òxid nítric (NO) per aquestes citocines poden induir l'apoptosi de les cèl·lules musculars llises *in vitro*. El NO indueix l'apoptosi majoritàriament actuant per la via del peroxinitrit.²⁰⁴ Els mediadors finals que indueixen l'apoptosi via el NO no són del tot coneguts, però inclouen el GMP cíclic,²⁰⁵ el gen supressor de tumors p53,²⁰⁶ i el receptor de la mort cel·lular FAS (CD95).²⁰⁷ Per tant, la citocina IL-1 β pot induir la síntesi de NO en les CML, la qual cosa augmentarà l'expressió de p53, que a més activa transcripcionalment a FAS. L'òxid nítric també pot disminuir l'expressió de Bcl-2, el qual normalment protegeix contra l'apoptosi²⁰⁸ i augmentar l'expressió de Bax, el qual promou l'apoptosi, possiblement per la inducció del p53.²⁰⁶ Així, el NO altera el ratio Bcl-2/Bax a favor de l'apoptosi.

Per contra, el NO pot directament inhibir l'apoptosi mitjançant la inhibició de l'activitat de components de la cascada de les caspases.²⁰⁹ Això sembla que ho fa a través d'una S-nitrosilació específica de la Cisteïna Cys 163, un aminoàcid funcionalment essencial conservat en les proteases tipus caspasa.²⁰⁹ El NO també redueix el nivell de glutatió intracel·lular i l'activitat del NO per regular l'apoptosi o nitrosilar caspases pot ser revertit per antioxidants tals com el glutatió,²¹⁰ indicant que l'apoptosi induïda per NO pot estar sota la influència de l'estat redox cel·lular. Així no és sorprenent com el NO modula els estats redox dels tiols intracel·lulars i l'estat redox dels tiols de les cèl·lules influencien en la producció del NO. El fet que les caspases siguin el pas comú de

finalització per moltes (sino totes) vies de mort apoptòtica indica que el NO pot ser un inhibidor de l'apoptosi sigui quin sigui l'estímul.²¹¹ El paper dual del NO a induir o a protegir contra l'apoptosi es veu emfatitzat per la troballa que diferents concentracions de NO poden incrementar o disminuir la unió del p53 al DNA (i així controla l'activitat transcripcional de gens que indueixen l'apoptosi via la p53 tals com el Bax).²¹² Encara que, s'ha d'anar amb compte a l'hora d'interpretar els estudis publicats en la regulació de l'apoptosi pel NO. Actualment, el rol fisiològic del NO mitjançant l'apoptosi de les CML in vivo no està totalment establert. A més, molts dels estudis in vitro publicats utilitzen una combinació de donadors de NO o mètodes per generar NO que poden tenir efectes sobre altres vies no detectades pel NO.

9.- CICLE CEL·LULAR

El cicle cel·lular és ubicu, un procés complex involucrat en el creixement i la proliferació de les cèl·lules, el desenvolupament dels òrgans, la regulació de la reparació del dany en el ADN, la hiperplàsia del teixit com a resposta a un dany extern, i en malalties com el càncer i l'aterosclerosi, entre d'altres. El cicle cel·lular engloba un nombre de proteïnes reguladores que condueixen la cèl·lula a través d'una seqüència d'esdeveniments que culminen en la mitosi i la producció de dues cèl·lules germanes. Importants en aquest procés són les cinases dependents de ciclins (cdks) i les proteïnes ciclins que regulen la progressió de la cèl·lula als estadis del cicle cel·lular anomenats fases G₁, S, G₂, i M. El cicle cel·lular pot ser morfològicament subdividit entre interfase i els estats de la fase M (mitòtica), la qual inclou profase, metafase, anafase i telofase.²¹³ La interfase comprèn G₁, S, G₂.

Les fases G₁ i G₂ del cicle representa una llacuna en el cicle cel·lular que passa entre la mitosi i la síntesi de ADN. En la fase G₁ la cèl·lula es prepara per la síntesi del ADN.

Les cèl·lules en G₀ no es troben actives cíclicament. El terme G₀ va ser utilitzat originalment per indicar que les cèl·lules no estaven en divisió, però que tenien potencial per dividir-se.

9.1.- Regulació del cicle cel·lular

El cicle cel·lular al principi és regulat pels complexos cdks i ciclins. Les cdks són proteïnes serina/treonina cinases que són activades en un punt específic del cicle cel·lular. Es coneixen al menys 7 cdks en les cèl·lules dels mamífers.²¹⁴ Els cdks són crítics per progressar en el cicle cel·lular perquè la seva inactivació prevé la mitosi.²¹⁵

Les ciclines desenvolupen múltiples funcions reguladores. En un estat apropiat de fosforil·lació dels cdk, és necessari que s'uneixin a les ciclines per tal d'activar aquests cdk. Les ciclines troben els cdk en el nucli; contenen un senyal de localització nuclear que els hi falta als cdk.²¹⁶ Abans de cada fase del cicle es sintetitzen les ciclines específiques per aquella fase. Després es degraden. En el cas concret entre les fases G₁ i G₂ del cicle actuen les ciclines D.

En la fase G₁, una diana important dels cdk és la proteïna retinoblastoma (pRb), i els complexos ciclina-cdk de la fase G₁ fosforil·len el pRb en varis residus.²¹⁷ L'hipofosforil·lat pRb s'uneix al factor de transcripció E2F, fent-lo inservible per la transcripció. Una vegada el complexe ciclina-cdk fosforil·la el pRb, aquest allibera el E2F, permetent que aquest participi en la transcripció de proteïnes necessàries per la progressió del cicle cel·lular. En les fases G₁ i S del cicle cel·lular, els inhibidors més importants del cicle són les famílies protèiques de p16 i p21, que actuen inactivant els cdk de G₁.²¹⁸

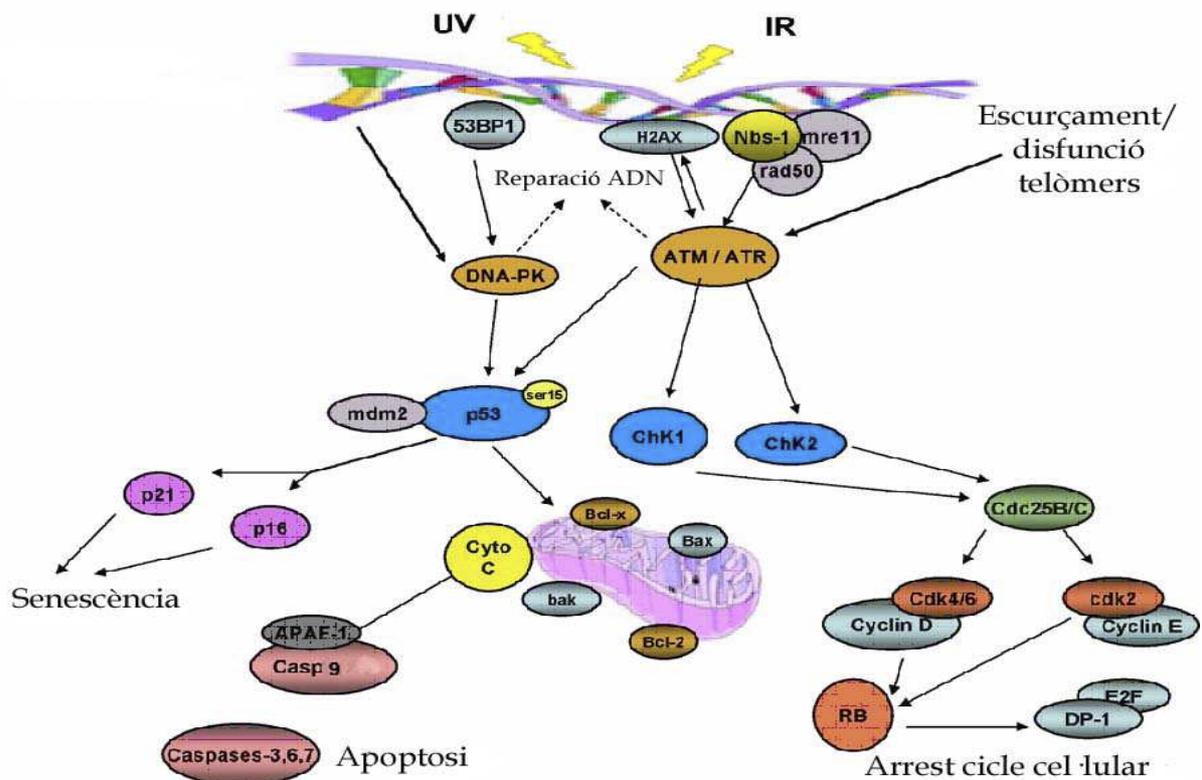


Figura 8. Representació d'un dany al ADN i les seves possibles respostes moleculars que afecten al cicle cel·lular.

La família de la p21 inclou el waf1 (o també anomenat p21), p27 i p57.²¹⁹ Aquestes proteïnes poden inhibir molts cdks.²²⁰ Aquesta família s'uneixen a les ciclines impedit així que els cdks puguin fosforil·lar el pRb i induint la seva dissociació del E2F.²²¹ La proteïna p53 induïx transcripcionalment l'expressió de p21. Aquesta seria una manera amb la qual la p53 induiria l'arrest del cicle cel·lular.²²²

La proteïna p53 té múltiples funcions relacionades amb l'arrest del cicle a la fase G₁. La p53 reconeix i s'uneix a varis tipus de dany en el ADN (Figura 8) inclús cadenes senzilles del ADN, insercions/delecions mal unides, i extrems lliures de ADN.²²³ A més d'aquestes funcions, la p53 té seqüències d'unió específiques al ADN i activitat transcripcional.²²⁴ Si hi ha dany en el ADN, la p53 estimula la transcripció de la p21.²²² Aquesta proteïna, tal com he comentat abans, inhibeix els cdks de la fase G₁. La proteïna p53 també té un "loop" autoregulator amb el qual la mateixa p53 estimula la transcripció de l'oncogen mdm-2, el qual inhibeix la p53.²²⁵ Una altra funció de la p53, és l'estimulació de l'apoptosi després de detectar un dany sever al ADN.²²⁶

10.- RESTENOSI I HIPERPLÀSIA INTIMAL

La restenosi és una resposta mal adaptada de les artèries coronàries a un dany. La més simple i àmplia definició usada de restenosi és que després de la dilatació per revascularització, l'artèria recuperi un diàmetre d'estenosi d'un 50%. La restenosi es dona en el 20-50% dels pacients després d'una angioplàstia i en un 10-30 del pacient que han rebut un stent. Hi han tres processos diferents relacionats en la restenosi: el retraïment dels vasos, la proliferació de la neointima, i la formació primària de trombus. La contribució de cadascun d'aquests processos dependrà del tipus de dany. Aproximadament les tres quartes parts de la pèrdua de la llum del vas després de l'angioplàstia és degut al retraïment del vas i la resta a la proliferació de la neointima, mentre que l'introducció d'un stent a la coronària elimina el retraïment del vas, i la restenosi és bàsicament deguda a la proliferació de la neointima. Els factors de creixement i les citoquines són el major estímul de proliferació de les CML després que una artèria pateixi un dany. Quan es dipositen les plaquetes, s'infiltra els leucòcits, s'expandeixen les CML, es diposita matriu extracel·lular i es dona la reendotelització, s'esdevé la restenosi. A més les plaquetes alliberen el factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF), el factor de creixement transformant (TGF), el factor de creixement epidermal (EGF), i la trombina, els quals estimulen la migració, proliferació i divisió de les CML. Dins les CML, les ciclines dependents de cinases (cdks) i les ciclines (reguladors) condueixen la cèl·lula d'una fase a una altra del cicle cel·lular. Com s'ha

descriu anteriorment, les cdks serien com el motor i les ciclins com el canvi de velocitats, determinant si el motor ha de fer avançar la maquinària cap a un estadi de repòs o conduir-lo a les següents fases del cicle cel·lular. Per tant, tots dos junts regulen la progressió del cicle cel·lular i la migració de les CML.

La restenosi clínicament significativa generalment passa entre un o tres mesos després de l'angioplastia. Molts pacients presenten la típica angina, normalment dins els 4 mesos del procés. La restenosi després dels sis mesos tindrà poques possibilitats de ser la causa dels símptomes d'angina. Amb la introducció dels stents coronaris la presentació del símptomes es veurà retrassada al voltant d'un a tres mesos.

Els mecanismes moleculars i cel·lulars de la hiperplàsia intimal i la hipertròfia de la mitja han estat estudiats durant 4 dècades i encara no es comprenen en algun detall.²²⁷ Per exemple, el dany mecànic o hemodinàmic de l'endoteli (p.e. després d'una angioplastia, la col·locació d'un stent o) pot exposar la matriu subendotelial i induir l'adhesió, agregació i activació de les plaquetes. Les plaquetes activades alliberen diverses citocines, quimiocines i factors de creixement (citats més amunt), que inicien la proliferació de les CML, el reclutament de leucòcits, i l'activació de la cascada de coagulació. Les substàncies alliberades o activades després del dany inclouen a part del PDGF, TGF i la trombina, també la interleucina-1 (IL-1), 6 (IL-6) i 8 (IL-8), l'adenosina difosfat, i el tromboxà A₂. Perquè es doni la màxima resposta de la íntima es requereix que la mitja hagi patit un dany, així com també un dany en les cèl·lules endotelials.²²⁸ De fet, les CML del voltant de l'àrea malmesa comencen a entrar en apoptosi en la primera hora després del dany, i mentre que el bloqueig de l'apoptosi després del dany de l'endoteli i de la mitja inhibeix la hiperplàsia de la íntima,²²⁹ l'apoptosi de les CML sense dany endotelial no dona lloc a la hiperplàsia intimal.²³⁰

El CML de la mitja de rata comencen a proliferar en les primeres 48 hores.²³¹ El factor de creixement dels fibroblasts (FGF)-2 juga un paper important en aquest inici dels esdeveniments proliferatius. És alliberat desde l'endoteli danyat i les CML, i, mentre el bloqueig dels anticòssos prevé la proliferació de les CML en la mitja de les caròtides de rata en un 80%,²³² no té efecte en la subsegüent proliferació de les cèl·lules de la íntima.²³³ En contrast a la caròtida danyada de rata en el qual el PDGF juga un paper menor en la proliferació de les CML de la mitja,²³⁴ un anticòs bloquejant del receptor del PDGF β inhibeix la proliferació de les CML de la mitja en més d'un 90% a l'artèria safrosa de babuïns.²³⁵ Altres factors com el factor de creixement de la insulina (IGF)-1,²³⁶ la

trombina,²³⁷ el TGF- β ²³⁸ juntament amb les citocines IL-1 β ²³⁹ i la IL-6 totes contribueixen a la proliferació de les CML. Una sèrie de factors d'inhibició també moderen la resposta proliferativa al dany, tals com l'adiponectina,²⁴⁰ els proteoglicans heparan sulfat, la interleucina-10,²⁴¹ l'adrenomedullina²⁴² i la somatostatina. A més, elevats fluxes de sang inhibeixen la hiperplàsia intimal després de patir el dany l'artèria.²⁴³

Després de 4 dies, la proliferació de les CML de la media arriba al màxim tan en models de lesió de rossegadors com en primats i les CML comencen a migrar cap a la íntima. El PDGF juga un paper determinant en l'estimulació de la migració de les CML en ambdós models. Aquest és alliberat per les plaquetes, i està també sobreexpressat en la paret dels vasos²⁴⁴ en les cèl·lules endotelials, CMLs, i els macròfags. La insulina,²⁴⁵ el factor tissular (TF)²⁴⁶ i el FGF-2²⁴⁷ també contribueixen a la migració de les CML in vivo.

Les CML de la íntima provenen al principi de la capa media, però també poden provenir dels miofibroblasts de l'adventícia, pericits associats amb la infiltració dels microvasos, i les cèl·lules progenitores circulants.²⁴⁸ Les CML de la íntima proliferen durant unes 2 setmanes i comencen a expressar majoritàriament gens de la matriu extracel·lular (MEC), tals com l'elastina, el col·lagen I, durant aproximadament 7 dies després de la lesió.²⁴⁹ El creixement de la íntima es dona per la síntesi i expressió de l'elastina, el col·lagen, glicoproteïnes i proteoglicans. D'un a tres mesos s'arriba a un estat estacionari en el qual la íntima està composta d'un 20% de cèl·lules i un 80% de MEC.²⁴⁹

La resposta dels vasos previament danyats a un dany recurrent també ha estat investigat. Koyama i Reidy²⁵⁰ van observar proliferació de les CML de la íntima i la media en resposta a un segon dany per angioplàstia a la caròtida d'una rata, però van observar que l'espessiment de la íntima era produït exclusivament per la síntesi de MEC i no de CML. Hanke i col.²⁵¹ Van aplicar un dany per angioplàstia a la caròtida d'un conill previament danyada per estímuls elèctrics. Van trobar que la proliferació va continuar dèbilment, però que va augmentar significativament a les tres setmanes i que el nombre de CML de la íntima es va doblar ràpidament.

11.- ESTRATÈGIES

Degut a la complexitat i els nombrosos processos que intervenen en la patologia aterotrombòtica, s'han desenvolupat un gran número d'estratègies farmacològiques destinades al seu tractament. Podem distingir dues grans línies:

11.1.- Inhibició de la ciclooxigenasa

Via de la ciclooxigenasa

La ciclooxigenasa es troba a la majoria de les cèl·lules dels mamífers i va ser el primer enzim microsòmic descrit amb capacitat d'actuar sobre l'àcid araquidònic lliure. S'han descrit dos isoformes de ciclooxigenasa, la COX-1 i la COX-2. Ambdues isoformes presenten una homologia del 60%: manifesten valors similars de Km, els mateixos llocs d'unió per l'àcid araquidònic i el metabolitzen mitjançant mecanismes similars. Tanmateix, s'ha demostrat que els gens encarregats de la seva síntesi són diferents, de manera que els relacionats amb la COX-2 tenen llocs d'unió específics pels glucocorticoides, interleucina 6 (IL-6) i altres citocines.

La COX-1 és un enzim constitutiu encarregat de la síntesi de les prostaglandines implicades en la homeòstasi general i, en conseqüència, està expressada en la majoria dels teixits de l'organisme, si bé els nivells d'aquesta expressió poden variar entre els diferents tipus cel·lulars. Els valors d'aquest enzim es mantenen constants dins d'una mateixa població cel·lular, encara que poden aparèixer petits increments (de dos a quatre vegades) per estímuls hormonals o factors de creixement. A més, el grau d'expressió basal poden variar entre diferents poblacions cel·lulars i, a mode d'exemple, estructures com l'endoteli vascular i les plaquetes es caracteritzen per presentar nivells de COX-1 molt elevats.

La COX-2, al contrari, és una isoforma imperceptible de forma basal en la majoria dels teixits i només s'encarrega de produir prostanoides en els llocs inflamats. Tanmateix, existeixen algunes excepcions a aquesta norma i s'han trobat nivells alts d'aquest isoenzim a la pròstata, el timus de nou-nat i al cervell. En resposta a un estímulo adequat al tipus de mitògens, citoquines i factors tumorals, la COX-2 pot expressar-se en la majoria de teixits, sent dita expressió bloquejada pels corticoides.

Algunes dades suggereixen l'existència d'un tercer tipus de ciclooxigenasa, la COX-3 que, a diferència de les altres dos isoformes, intervindria la síntesi de prostanoides antiinflamatoris en fases avançades del procés inflamatori.

Actuació de la ciclooxigenasa

La ciclooxigenasa té una acció doble sobre l'àcid araquidònic (Figura 9). Primer s'encarrega de la seva ciclació i oxigenació, formant la PGG₂, i després redueix la PGG₂ originant la PGH₂. Ambdues prostaglandines són denominades de forma genèrica endoperòxids intermedis i, encara que químicament inestables (semivida de 5 min), posseeixen una intensa activitat biològica. La majoria dels teixits són capaços de sintetitzar els endoperòxids intermedis, però la presència d'un o varis dels seus derivats, així com la seva abundància relativa, està determinada per la dotació enzimàtica particular existent a les cèl·lules.

A partir de la PGH₂ les endoperòxid isomerases sintetitzen PGE₂ i PGD₂, mentre que per reducció s'origina la PGF_{2α}. En alguns teixits existeix una interconversió de PGE₂ a PGF_{2α} catalitzada per una 9-cetorreductasa. Les PGA₂, PGB₂ i PGC₂, totes derivades de la PGE₂ no es produeixen en condicions fisiològiques i se suposa que són productes de la síntesi química. La PGH₂ també és l'origen de dos compostos inestables i molt potents: el tromboxà A₂ (TXA₂), que es crea per l'actuació de la tromboxà sintetasa i es metabolitza ràpidament (semivida inferior a 3 min) i de forma no enzimàtica al tromboxà B₂ (TXB₂), molt més estable des d'un punt de vista químic, però també biològicament molt menys potent. La prostaciclina o PGI₂ és conseqüència de l'actuació de la prostaciclina sintetasa, i també s'hidrolitza amb rapidesa (semivida inferior a 3 min) a un metabòlit inactiu: la 6-keto-PGF_{1α}.

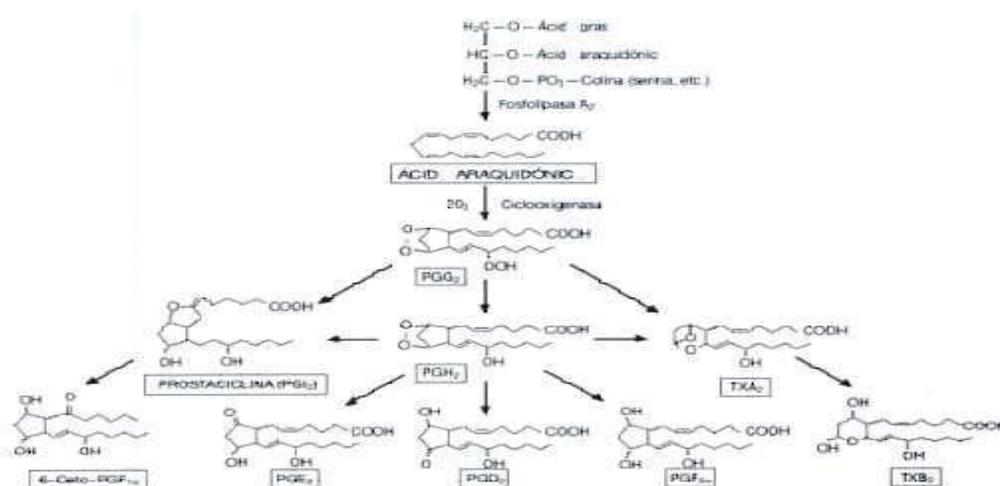


Figura 9. Biosíntesi dels derivats de l'àcid araquidònic produïts per ciclooxigenació.

TRIFLUSAL

El triflusal és un antiagregant plaquetari estructuralment anàleg a l'àcid acetilsalicílic (ASA). Aquest és el compost farmacològic que tradicionalment representa als inhibidors de la Cox, i de forma popular es coneix amb el nom d'aspirina. Aquest compost es va introduir a la terapèutica a finals del segle XIX i es va convertir en l'analgèsic-antipirètic més utilitzat i actualment es considera el patró farmacològic dels analgèsics no opiacis. A més, el descobriment del seu mecanisme d'acció, fa prop de 30 anys, va permetre l'extensió del seu ús a la prevenció i tractament dels fenòmens tromboembòlics. Existeix un gran nombre de salicilats derivats de l'aspirina i molts d'ells s'utilitzen en processos inflamatoris i com a analgèsics. L'aspirina també té múltiples usos, però és el fàrmac de primera elecció pels processos trombòtics. A partir de l'àcid acetilsalicílic es van sintetitzar nous compostos més específics per aquests tipus de processos, entre els quals es troba el Triflusal (àcid-2-acetoxi-4-(trifluorometil)-benzoic, i el seu metabolit l'àcid 2-hidroxi-4-trifluorometil-benzoic (HTB).

Farmacocinètica

Els fàrmacs antiinflamatoris no esteroideus (NSAID's), també coneguts com a salicilats, en general s'absorbeixen ràpidament un cop ingerits, bàsicament a l'intestí prim superi i una petita part a l'estòmac. Després de l'administració oral s'obtenen concentracions plasmàtiques apreciables als 2-30 minuts i màximes als 60-120 minuts²⁵² i la biodisponibilitat de la forma no hidrolitzada és del 70%. El percentatge d'unió de l'aspirina a proteïnes plasmàtiques depèn de la seva concentració i oscil·la entre el 25-95%, i la seva vida mitja plasmàtica és de 15 minuts. El Triflusal s'uneix en un 99% a les proteïnes plasmàtiques i la seva vida mitja és de 30 minuts. L'aspirina pateix un ràpid procés d'hidròlisi després de la seva absorció mitjançant esterases presents en el fetge, pulmó, plasma i glòbuls vermells, encara que el procés ja comença a la mucosa gastrointestinal durant la fase d'absorció. El procés de metabolització dona lloc a l'àcid salicílic, entre altres components, que és un metabolit actiu. El Triflusal també és metabolitzat ràpidament, mitjançant desacetilació, transformant-se en HTB, el seu principal metabolit actiu. El HTB té una semivida molt més gran que el Triflusal (35 hores).

Farmacodinàmica

El mecanisme d'acció de l'aspirina, el Triflusal, així com altres salicilats, consisteix en l'acetilació d'un residu de serina situat a la posició 530 de la cadena polipeptídica de la

Cox, la qual cosa condueix a una inhibició irreversible de l'enzim. D'aquesta manera, s'interromp la transformació del AA en els seus derivats ciclooxigenats, inhibint els mecanismes fisiopatològics en els quals aquests estan implicats. Degut a la gran quantitat de mecanismes en els que està implicada la Cox, els salicilats produeixen una gran amplitud d'accions, i no totes elles beneficioses. Mitjançant la inhibició dels eicosanoids mediadors de la inflamació, es produeixen accions analgèsiques, antipirètiques i antiinflamatòries. A través de la inhibició de la producció de TXA₂ a les plaquetes es produeix un efecte antitrombòtic, però com a contrapartida modifiquen la producció de PGI₂ vascular, efecte contraposat al de la inhibició plaquetària, i de diverses prostaglandines implicades en la funcionalitat de diversos òrgans.²⁵³

A les plaquetes, l'aspirina produeix una acetilació irreversible de la Cox, amb la qual cosa redueix la producció de TXA₂.^{254,255} La inhibició enzimàtica a les plaquetes es prolonga durant tota la seva vida (8-9 dies) al tenir limitat la síntesi proteica. En els humans, una dosi oral de 50 mg d'aspirina és suficient per inhibir la síntesi plaquetària de TXA₂ durant 3 dies.²⁵⁶ L'aspirina inhibeix també l'agregació secundària induïda per la trombina, col·lagen o AA, degut a que inhibeix la producció plaquetària de diacilglicerol,²⁵⁷ encara que aquest efecte és menys durador que la inhibició de la Cox i depèn de la dosi administrada. És important ressaltar que la inhibició de la Cox no exclou de forma absoluta el paper trombogènic de les plaquetes, ja que aquestes poden ser activades a través d'altres rutes. Això contribueix a explicar els fracassos terapèutics observats en assajos clínics i a la pràctica diària en relació amb l'ús de l'aspirina com a profilaxis antitrombòtica.²⁵⁹⁻²⁶¹ A través del mateix mecanisme d'acetilació de la Cox, l'aspirina inhibeix la PGI₂ per l'endoteli vascular, que exerceix un efecte contrari al TXA₂ ja que inhibeix l'agregació plaquetària i és vasodilatadora. La PGI₂ inhibeix l'activació plaquetària mitjançant l'estimulació de l'adenilciclasa, la qual cosa porta a un increment del AMPc. Aquesta molècula facilita l'entrada de calci en els seus dipòsits, reduint la seva disponibilitat en la plaqueta, mentre que el TXA₂ facilita el pas invers. Els efectes contraposats de l'aspirina sobre l'agregació plaquetària i sobre la capacitat antitrombòtica de l'endoteli vascular suposen un problema en la teràpia antitrombòtica conegut com el "dilema de l'aspirina".²⁶² L'efecte sobre la PGI₂ vascular és dosidèpenent, i a diferència de les plaquetes, sense nucli, en l'endoteli vascular es produeix la regeneració del complex enzimàtic de la Cox. Degut a aquesta característica, la manera d'obtenir una inhibició de la Cox plaquetària sense afectar la Cox vascular consisteix en l'administració de dosis baixes d'aspirina (50-75 mg) que

aconsegueixin una inhibició de la síntesi de TXA₂ plaquetari sense efectar la síntesi vascular de la PGI₂.²⁶³

El fàrmac antiagregant ideal tindria que inhibir la síntesi de TXA₂, respectant la de PGI₂, i incrementar els nivells de AMPc. Segons aquesta premisa es va dissenyar el Triflusal. Aquest derivat de l'aspirina inhibeix de manera irreversible la Cox, però amb menor potència, i a més inhibeix la fosfodiesterasa plaquetària, enzim responsable de la metabolització del AMPc.²⁶⁴ El seu metabolit, el HTB, també inhibeix la Cox, però més dèbilment que el Triflusal, i inhibeix la fosfodiesterasa amb molta més potència que el seu antecessor (10 vegades més). Respecte a la PGI₂ vascular, el Triflusal i el HTB inhibeixen la seva síntesi, però són necessàries concentracions mils de vegades superiors a les de l'aspirina, i deu vegades superiors que les necessàries pel seu efecte com a antiagregant plaquetari.²⁶⁵ Ja que el Triflusal una vegada administrat, es metabolitza ràpidament a HTB, el qual té una vida mitja molt més llarga, els efectes obtinguts bàsicament es deuen a aquest últim, amb la qual cosa el resultat és la inhibició de la formació del TXA₂ i un augment del AMPc a la plaqueta, mentre que a nivell vascular no s'afecta a la PGI₂.

Respecte a altres efectes dels salicilats, el mecanisme mitjançant el qual aquests compostos tenen un efecte antiinflamatori, és a través de la inhibició de la isoforma Cox-2, implicada en els processos inflamatoris. La inhibició d'aquesta isoforma es consegueix amb dosis superiors a les antitrombòtiques, degut a que és ràpidament regenerada per les cèl·lules nucleades. Això explica la diferència de dosificació i de l'interval d'administració de l'aspirina, quan s'utilitza com a fàrmac antiinflamatori o com a antiplaquetar. S'ha descrit que els salicilats exerceixen l'acció antiinflamatòria a través d'un mecanisme independent de la inhibició de la Cox-2, mitjançant la inhibició dels factor de transcripció NF-κB,²⁶⁶ factor que participa activament en el procés inflamatori controlant diversos gens d'inflamació.²⁶⁷

Els salicilats clàssics inhibeixen les dues isoformes de Cox, però en aquests últims anys s'han sintetitzat nous compostos que inhibeixen selectivament la cox-2 amb la finalitat d'obtenir un efecte antiinflamatori aïllat, evitant els efectes colaterals que acompanyen a la inhibició de la Cox-1 constitutiva (a nivell vascular, gàstric, etc). Tanmateix, diversos estudis clínics relacionats amb la patologia cardiovascular han demostrat que els inhibidors selectius de la Cox-2 no són tan beneficiosos com s'esperava, ja que es va observar una reducció en els nivells de prostaciclina vascular tant en pacients de risc com en voluntaris sans, acompanyada de majors nivells de TXA₂ degut a la falta

d'inhibició de la Cox-1 plaquetària, pel que es va obtenir una situació de vasoconstricció generalitzada que afavoria els processos aterotrombòtics.⁷⁴ Aquests resultats indiquen que la Cox-2 no és exclusiva de processos inflamatoris i que probablement també participa en processos fisiològics. Amb l'ús de salicilats que inhibeixen ambdós isoenzims, l'equilibri prostaciclina-Tromboxà₂ es manté, i per això, s'obté com a resultat global un benefici en l'enfermetat isquèmica coronària.

Farmacologia Clínica

L'aspirina va demostrar ser efectiva en la previsió d'events vasculars en diferents assajos clínics, però aquests resultats obtinguts en aquests van ser molt heterogenis. A l'estudi ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) l'administració de 163 mg d'aspirina durant 5 dies, a partir de 24 hores de mostrar símptomes d'infart de miocardi, va reduir en un 23% el risc de mortalitat vascular i en un 46-49% el reinfart.²⁶⁸ El tractament a llarg plaç també va demostrar ser efectiu en la prevenció de l'infart de miocardi en pacients de risc mig i alt. Dos assajos realitzats en homes, amb risc cardiovascular reduït o elevat, en els que l'aspirina es va administrar a llarg plaç (Physicians' Health Study i Thrombosis Prevention Trial), van mostrar una reducció dels events vasculars però no de la mortalitat vascular.²⁶⁸ En el metaanàlisi Antiplatelet Trialists' es van obtenir resultats similars (reducció de la incidència dels events cardiovasculars en un 25%).^{259,260} S'ha observat que dosis baixes d'aspirina són tan eficaces en la patologia cardiovascular, com dosis més elevades. Inclús s'ha descrit una major incidència d'accidents cardiovasculars en pacients tractats amb dosis altes, la qual cosa s'atribueix a l'efecte dels salicilats sobre la producció de prostaciclina vascular.⁷⁴ Estudis clínics demostren que el Triflusal i l'aspirina tenen una efectivitat similar en la prevenció de la patologia cardiovascular, encara que comparat amb aquesta última, el Triflusal mostra una major efectivitat en la prevenció dels events cerebrovasculars.²⁶⁹

Tot i que els assajos clínics suggereixen un benefici amb la teràpia amb aspirina en pacient amb patologia ateroscleròtica, el seu ús clínic diari i el seu estudi en diversos models animals suggereixen que aquest compost no és del tot efectiu en la inhibició de l'aterotrombosi, ja que només bloqueja una de les nombroses vies d'activació plaquetària.¹²⁸

11.2.- DONADORS DE NO (agents antiisquèmics)

En els processos d'isquèmia i angina, s'utilitzen fàrmacs vasodilatadors com els donadors de NO. La presència de síndromes coronaris va associada a una disminució en la biodisponibilitat del NO, una menor vasorelaxació i un augment de l'agregació de les plaquetes. Per paliar la falta de NO endogen, l'estratègia ha seguir és proporcionar NO exogen en forma de nitrat (nitroglicerina) o donadors directes de NO (nitroprusat, S-nitrotiols). Aquests compostos presenten l'avantatge que els seus efectes vasodilatadors (i en alguns casos antiagregants) són estrictament independents de l'endoteli; és a dir, es mantenen tot i la severitat de la disfunció endotelial.^{270,271} Des que Thomas Lauder Brunton (1867) va utilitzar amb èxit el nitrat d'amil en una pacient amb angina de pit (els donadors de NO s'han convertit en el tractament estàndard en pacients amb enfermetat coronària ateroscleròtica i angina de pit). Aquests fàrmacs actuen de forma similar a com ho fa el NO derivat de l'endoteli: mitjançant l'activació de la GC i la consegüent formació de GMPc,²⁷² que indueix la relaxació del múscul llis i la disminució de l'agregació de les plaquetes. Per això són un excel·lent substitut del vasodilatador nítric endogen en estats patològics.

11.2.1.- Nitrats

Els nitrats són profàrmacs que requereixen d'un metabolisme enzimàtic per generar NO bioactiu. Encara que no s'ha pogut caracteritzar l'enzim responsable d'aquesta transformació, les proves realitzades fins al moment, suggereixen que el sistema citocrom P-450, en conjunció amb l'activitat de la NADPH, la presència de grups tiol i la S-transferasa del glutatió són indispensables pel procés metabòlic de degradació i reducció dels nitrats orgànics a nitrosotiols i finalment, al NO.²⁷³

L'administració intravenosa de nitroglicerina és una estratègia convencional en la terapia d'isquèmia miocàrdica inestable aguda (angina inestable i infart de miocardi),²⁷⁴ doncs les seves propietats hemodinàmiques permeten compensar el dany isquèmic. En quant a l'administració de nitrats per via oral, el dinitrat i mononitrat d'isosòrbid han demostrat ser molt eficaços en la prevenció de les crisis d'angina. Tot i que l'efecte potencial dels nitrats com a vasodilatadors sobre una base molecular està relacionat amb el número de molècules d'àcid nítric que els compostos són capaços d'alliberar (els trinitrats alliberen tres molècules de NO, els dinitrats dos i els mononitrats una), la dosi (en mil·ligrams) del compost corregeix aquestes diferències.

Tot i l'ús convencional, els nitrats presenten importants limitacions. Una primera limitació és el fenomen de la tolerància; és a dir, la pèrdua d'efectes vasodilatadors per l'aplicació prolongada del fàrmac. Per disminuir l'efecte de tolerància, l'estratègia a seguir és l'ús intermitent de nitrats amb una finestra lliure de nitrats d'almenys 8-10 hores al dia. Encara que es desconeix els seu mecanisme d'aparició, s'ha suggerit que es produeix a causa de la progressiva disminució en la biodisponibilitat dels grups tiols. De fet, s'ha observat que la tolerància adquirida per l'administració continuada de nitroglicerina es reverteix amb la coadministració de la N-acetilcisteïna (tiol). Lamentablement, l'aparició d'importants efectes adversos després de l'administració d'aquesta associació ha eliminat tota esperança d'ús clínic. D'això es deriva, que els nitrats que no precisen biotransformació enzimàtica i alliberen espontàniament el NO de la seva molècula (molsidomina,...) semblen ser menys propensos a la tolerància.²⁷⁵

Altres importants limitacions dels nitrats són la necessitat d'un metabolisme previ (conversió a nitrosotiols i finalment a NO), la presència d'efectes hemodinàmics adversos (hipotensió), la falta de selectivitat i lleus o nuls efectes antiplaquetars.

11.2.2.- Nitrosotiols

Les principals diferències entre els S-nitrosotiols i els nitrats són:

1.- Els nitrosotiols (S-nitrosoglutatió, GSNO; S-nitroso-penicilamina -SNAP; S-nitroso-albumina, S-nitrosohomocisteïna, S-nitrosocisteïna) s'han identificat *in vivo* en diversos sistemes biològics (neutròfils, cervell, plasma i sang).²⁷⁶

2.- La majoria dels efectes directes dels nitrosotiols són deguts a la seva habilitat per interaccionar amb la GC²⁷⁷ com els nitrats. Encara que, varis autors han suggerit que el NO alliberat pels S-nitrosotiols també poden mediar algun dels seus efectes biològics per vies independents al cGMP.²⁷⁸

3.- Els S-nitrosotiols, al contenir el grup tiol en la seva estructura, no requereixen una metabolització prèvia per l'alliberació del NO i per això no presenten el fenomen de tolerància (no depenen de la biodisponibilitat de grups tiol).

4.- Les propietats antiplaquetàries del GSNO són majors que les que presenten els nitrats. Els S-nitrosotiols (GSNO), al alliberar el NO mitjançant l'acció d'enzims associats a la membrana de les plaquetes, presenten efectes antiplaquetars més

específics. La demostració que l'efecte antiplaquetar del GSNO es redueix amb la presència d'un quelant de coure²⁷⁹ suggereix que la presència d'una proteïna de coure a la superfície de la plaqueta és el que indueix l'alliberació del NO. Recentment, també s'ha demostrat que els neutròfils són capaços d'estimular les plaquetes a induir l'alliberació de GSNO.²⁸⁰

5.- En quant a l'ús clínic dels S-nitrosotriols, el GSNO ha demostrat reduir embolitzacions asimptomàtiques durant i després d'una angioplàstia carotídea,²⁸¹ reduir marcadors d'activació plaquetars com la p-selectina (CD62/GMP140) i reduir la densitat del receptor de la GPIIb/IIIa en pacients que seran sotmesos a angioplàstia, amb efectes hemodinàmics molt menors que els produïts per la nitroglicerina.²⁸²

Per tot això, el GSNO sembla presentar una especificitat plaquetar i per això, un major efecte antiplaquetar que els seus efectes en el tò vascular. Però, tot i que el GSNO pot afectar a la funció de les plaquetes sense alterar el tò vascular, dosis elevades de GSNO són vasoactives i no eludiexen la vasodilatació.

OBJECTIUS

L'aterosclerosi és una malaltia multifactorial²⁰. Però l'efecte aquests factors desenvoquen a la paret vascular i a la desregulació de la seva homeòstasi. Per aquest motiu existeix un extens ventall d'estratègies de regulació que es centren en el control, disminució o prevenció d'un o varis dels efectes o simptomatologies que provoquen aquests factors. A mesura que s'aprofundeix en el coneixement d'aquesta complexa malaltia s'intenten provar fàrmacs que aprofitin al màxim les seves característiques i que regulin el màxim nombre de factors proateroscleròtics i amb el mínim efecte sobre l'homeòstasi. Per això, en aquesta tesi, ens hem centrat en l'estudi de 2 estratègies de risc del control cardiovascular i en quin grau regulen factors específics d'aquesta malaltia.

Primer objectiu, article primer: Fàrmac estudiat: Triflusal

L'enzim Cox és una molècula clau en el control de l'estat isquèmic de la paret vascular, així com l'estat d'activació de les plaquetes i el seu nivell aterotrombòtic al ser el responsable de la formació de molècules clau, tals com la prostaciclina i el tromboxà, que regulen aquests processos.

L'aspirina és el fàrmac antitrombòtic de primera elecció pel tractament d'aquest procés. Però presenta un sèrie d'inconvenients com ara un risc hemorràgic i bloqueja la regeneració de la protecció de la mucosa gàstrica. El motiu és que afecta a les dues isoformes de l'enzim cox 1 i 2, bloquejant completament la síntesi de prostanoids. És per això, que s'han desenvolupat molt fàrmacs derivats de l'àcid salicílic específics contra la Cox 2, sense alterar la producció de prostanoids per a l'homeostasi d'altres òrgans. Aquest enzim s'ha relacionat amb processos inflamatoris i producció de prostanoids implicats en trombosi, isquèmia i inflamació. Encara que s'ha demostrat que aquests fàrmacs selectius per la Cox 2 inhibeixen la producció de la prostaciclina, complicant l'estat trombòtic dels vasos afectats per una lesió existent, i augmentant el risc de trombosi secundària.

En canvi, el triflusal, és un fàrmac que no deriva de l'àcid acetilsalicílic, però la seva estructura química està relacionada amb la dels salicilats. El seu mecanisme d'acció és més específic i selectiu que el de l'aspirina, no presenta el risc hemorràgic d'aquest i el seu metabolit principal, el HTB, és actiu farmacològicament, a diferència de l'àcid salicílic, metabolit principal de l'àcid acetilsalicílic, que no presenta cap activitat com a antriagregant plaquetari.

Amb aquests antecedents el primer objectiu ha sigut evaluar les propietats antiplaquetars/antitrombòtiques del fàrmac Triflusal mitjançant la seva contribució sobre la via de la ciclooxigenasa i els seus metabolits en el seu bloqueig sobre la formació del trombus desencadenat per un trombus residual format sobre la paret vascular lesionada (trombosi secundària), l'efecte sobre l'expressió de l'enzim cox a la paret vascular sana, i l'efecte sobre l'expressió i activitat de la Cox 2 en estudis in vitro.

Segon objectiu, article segon: Fàrmac estudiat: Donadors de NO

Els agents antiplaquetars, antitrombòtics, anticoagulants, trombolítics i antiisquèmics (vasodilatadors) són els fàrmacs clau en el tractament de pacients amb risc de patir l'enfermetat isquèmica, pacients que han patit episodis vasculars de major importància tals com un infart o una angina de pit i pacients als que se'ls hi ha realitzat intervencions pel tractament de l'enfermetat simptomàtica (angioplàsties, stents, etc).

La nitroglicerina i els nitrats són majoritàriament usats, en general, per paliar la falta de NO endogen, tant en episodis d'angina estables, inestables i infart de miocardi,²⁸³ ja que les seves propietats hemodinàmiques (augmenten el flux sanguini coronari) permeten compensar el dany isquèmic.²⁷³ Encara que, el tractament convencional amb nitrats està limitat per les seves escasses propietats antitrombòtiques (degut a que el seu efecte no és selectiu per les plaquetes), efectes hemodinàmics adversos (hipotensió) i el desenvolupament de la tolerància. Per contra, l'administració de GTN pot afectar la funció de les plaquetes d'una manera molt més selectiva, sense alterar el to vascular; encara que, dosis elevades de GTN, al ser vasoactives, no eludeixen la vasodilatació. Per superar aquestes limitacions i trobar el correcte tractament dels pacients amb enfermetat cardíaca isquèmica, amb alt risc de patir un síndrome coronari agut, és necessari el desenvolupament de nous donadors de NO selectius per plaquetes amb propietats antitrombòtiques i antiisquèmiques i nuls efectes hipotensors.

Anteriorment s'ha demostrat en el nostre grup les propietats antiplaquetars/antitrombòtiques dels fàrmacs LA419 i LA816.

Amb aquests antecedents ens hem plantejat l'estudi d'aquests fàrmacs selectius sobre les cèl·lules de la paret vascular en quant a la seva afectació del cicle cel·lular i supervivència.

MÈTODES

1.- MODEL ANIMAL I L'ADMINISTRACIÓ DELS FÀRMACS DONADORS DE NO

Els porcs (N=16; 36 Kg) van estar 1 setmana allotjats a les gàbies de l'estabulari abans de qualsevol procediment experimental. Per tal d'evaluar l'efecte dels 2 donadors exògens de NO, oral i intravenós, els porcs es van distribuir de forma aleatòria en els següents grups de tractament:

- I) 10 dies d'administració oral del fàrmac LA419 (un nitrat orgànic de sucre neutral amb un grup tiol protegit a la seva estructura molecular).
- II) 2 hores d'administració intravenosa, abans de l'experimental, del fàrmac LA816 (un aminoàcid no natural que està S-nitrosilat).
- III) 2 hores d'administració intravenosa, abans de l'experimental de nitroglicerina (trinitrat gliceril; GTN).

Tots els animals van ser sacrificats després de la conclusió del període de tractament.

Tots els components van ser administrats a dosis terapèutiques. El LA419 va ser administrat a una dosi de 0,9 mg/kg, mentre que el LA816 i el GTN van ser administrats de forma intravenosa a una dosi de 6,6 nmol((kg min) i 2,5 mg/kg, respectivament. També es va evaluar un grup control-placebo (no tractat) pels efectes comparatius. Tots els procediments d'aquest estudi estan subjectes amb la guia per la cura i l'ús d'animals de laboratori.

2.- MODEL ANIMAL I EL PROTOCOL EXPERIMENTAL DE LA FORMACIÓ DEL TROMBE SECUNDARI EN PRESENCIA D'INHIBIDORS DE LA CICLOOXIGENASA.

Vuitanta-vuit conills mascles blancs New Zealand proporcionats per un proveïdor local, i amb un pes corporal de $2,8 \pm 1,7$ kg, van ser mantinguts a l'estabulari durant 5 dies sense cap intervenció.

Per evaluar l'efecte dels fàrmacs d'estudi sobre la trombosi, es va estudiar la deposició de les plaquetes al perfundir substractes vasculars en una càmbra de perfusió cilíndrica (referència bibliogràfica). Amb el fi de quantificar el nombre de plaquetes que es dipositen, prèviament (el dia abans del sacrifici) es va aïllar una mostra de plaquetes de la sang de l'animal. Es va marcar amb l'isòtop radioactiu In⁻¹¹¹ i es van reinjectar a l'animal (Veure secció 3 dels mètodes). La medicació de la radioactivitat en els substractes després de la reperfusió i el seu posterior anàlisi, ens va permetre valorar i quantificar la deposició induïda en les condicions de l'estudi, tals com al realitzar un

tractament farmacològic, al modificar la trombogenicitat del substracte o la velocitat de cizalla.

Aquest model de paret vascular lesionada s'utilitza per desencadenar la deposició plaquetar o formació de trombe a la superfície d'aquesta. A més, en aquest model, es van utilitzar parets d'aortes vasculars de conill com a model de lesió lleugera. Però, degut a que la paret vascular de les aortes de conill eren molt primes i era quasi impossible eliminar la capa subendotelial, que és un procediment necessari per obtenir el model de lesió severa, es van utilitzar aortes de porc com a model d'aquest tipus de lesió.

Tots aquests substractes es van recollir en escorxadors locals en el moment del sacrifici dels animals. Una vegada obtinguts, es van mantenir en PBS, es van netejar i es va eliminar la capa adventícia amb unes pinces. A continuació es van tallar segments d'aproximadament 3 cm de llarg i es van congelar a -20°C fins el dia de l'experimental. Arribat aquest dia, es van descongelar en PBS, es van obrir longitudinalment i es van tallar en segments d'1 cm d'ample.

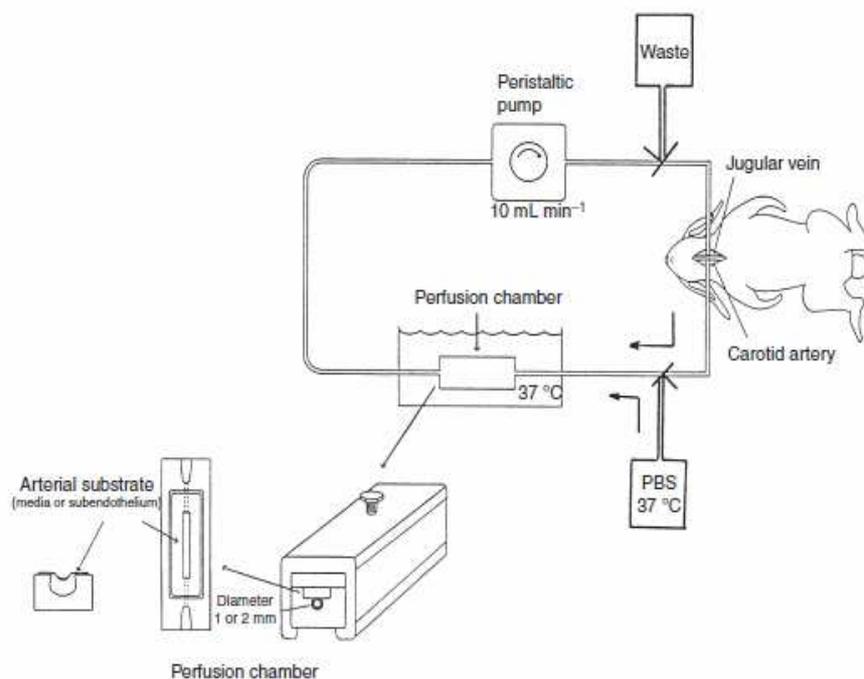
El model de lesió lleugera es va obtenir en exposar la superfície de l'artèria a la circulació sanguínea. Aquesta estructura es denomina subendoteli, ja que les cèl·lules endotelials han sigut eliminades mitjançant el procés de congelació (paret vascular desendotelitzada o erosionada). El model de lesió severa es va aconseguir exposant la túnica mitja del vas. Per fer això es va separar la capa subendotelial amb l'ajuda d'unues pinces.

Els experiments realitzats en els conills es van dividir en dos parts, segons la duració del tractament: Tractament agut, que va consistir en una sola administració del fàrmac i.v. el mateix dia del procediment experimental; i el tractament crònic, el qual consistia en una administració diària del fàrmac per via oral (p.o.) durant una setmana. En ambdós protocols, a més dels grups de conills que van rebre tractament, es van usar un grup d'animals control com a inductors de la trombosi primària.

A la primera part de l'estudi o tractament agut, els animals es van dividir en quatre grups segons el fàrmac administrat: aspirina (àcid acetil salicílic de lisina), triflusal (àcid 2-acetoxi-4-(trifluorometil)-benzoic), HTB (àcid 2-hidroxi-4-trifluorometilbenzoic) i

placebo. Se'ls va administrat un únic bolus i.v. d'aspirina (5 mg/kg), triflusal (10 mg/kg), HTB (10 mg/kg) o sèrum fisiològic (com a placebo, servint de control).

A la segona part o tractament crònic, els conills es van dividir en tres grups: control (placebo), aspirina i triflusal. Els animals van ser tractats oralment un sol cop al dia, durant 8 dies. Es van administrar varies dosis d'aspirina (10, 20, 30 mg/kg/dia) i triflusal (15, 30, 40 mg/kg/dia) per tal de trobar la dosi mínima amb efecte antitrombòtic. Per assegurar que els conills ingerissin, el total de la dosi diària dels fàrmacs es va procedir de la següent manera: Es van dissoldre 500 mg de cadascun dels fàrmacs en 25-50 ml de cloroform i es van pulveritzar sobre 100 g de pinso normal, el qual es va deixar secar sota una corrent d'aire en una campana d'extracció durant tota la nit. Aquest pinso es va emmagatzemar a 4°C i es va administrar segons el procediment a seguir. Així mateix, es va preparar el pinso sense fàrmac pulveritzant una quantitat equivalent del solvent sobre el pinso. Aquest es va usar en el grup d'animals control. Els dos fàrmacs i el placebo es van usar en una sola presa diària pels matins.



3.- MARCATGE DE PLAQUETES

Per fer el marcatge radioactiu de les plaquetes i altres cèl·lules sanguínies, com els leucòcits i els granulòcits, s'utilitza de forma habitual l'Indi¹¹¹ (In¹¹¹). El marcatge de les plaquetes s'ha aplicat a la detecció in vivo de trombes vasculares i per l'anàlisi de la cinètica de les plaquetes. En aquest treball es va usar l'oxina com a quelant transportador del In¹¹¹. El marcatge de les cèl·lules aïllades amb In¹¹¹ es basa en que al barrejar una solució del In¹¹¹-oxina amb les cèl·lules, aquest complex, que és lipofílic, atravesa la membrana cel·lular. Posteriorment, es produeix una reacció en la que l'oxina s'allibera i l' In¹¹¹ queda fortament enllaçat a les estructures cel·lulars. El marcatge de les plaquetes es va realitzar el dia anterior a l'experiment de trombosi per permetre una completa biodistribució de les plaquetes marcades. El procediment és el següent:

Es va extreure sang (conills: 13 ml) en ACD-Anticoagulant (7:50). Es va obtenir Plasma ric en plaquetes (PRP) i es va centrifugar (15 minuts, 1200 g) per separar el plasma sobrenadant del precipitat de plaquetes. Aquestes plaquetes es van rentar 2 vegades amb ACD-salí (15 minuts, 1200 g), i la suspensió en ACD-salí es va incubar amb In¹¹¹-oxina (Amersham) (10-12 µCi/kg de pes corporal de l'animal) durant 20 minuts a temperatura ambient. Es va determinar la dosi (dosi 1, d1) en un dosímetre (Atomlab 100, Biodex) i posteriorment es va centrifugar (10 minuts, 800 g) per obtenir les plaquetes marcades. El precipitat de plaquetes es va resuspendre en plasma, es va realitzar el recompte de plaquetes i es va mesurar la dosi de radioactivitat (d2). Finalment, la suspensió es va injectar per la vena marginal de l'orella de l'animal. Per verificar el grau de marcatge de les plaquetes, es van realitzar les següents determinacions:

- a) Eficàcia del marcatge (%) = $d2/d1 \times 100$.
- b) Viabilitat de les plaquetes (percentatge de radioactivitat unit a les plaquetes): a 480 µl de solució salina es va afegir 20 µl de la suspensió de plaquetes marcades i es va separar el sobrenadant del precipitat mitjançant una centrifugació (3 minuts, 13000 g). Es va determinar la radioactivitat (com a cpm) present en el precipitat (r_{pellet}) i en el sobrenadant (r_{sn}) amb un comptador gamma (Wizard, Wallac).

$$\text{Viabilitat (\%)} = [r_{\text{pellet}} / (r_{\text{pellet}} + r_{\text{sn}})] \times 100$$

4.- OBTENCIÓ DE CÈL·LULES MUSCULARS LLISES DE LES CAPES ÍNTIMA I MÈDIA DE L'ARC AÒRTIC DE PORC, MITJANÇANT LA TÈCNICA D'EXPLANTS

4.1. TRANSPORT I ELABORACIÓ DELS EXPLANTS

Vam obtenir l'arc aòrtic de la necròpsia del porc.

Pel transport de l'arc aòrtic de l'estabulari fins a cultius vam utilitzar PBS estèril per netejar de restes de sang del teixit, i posteriorment el vam passar en un recipient amb medi de cultiu estàndard de porc sense Sèrum de porc (SP)(veure annex 2), temperat a 37°C.

Un cop a cultius, amb unes pinces i unes tisores estèrils, procedim a obrir l'arc aòrtic. (Tot el procés s'ha de dur a terme sota campana i en condicions estèrils). Un cop obert l'arc, amb un bisturí es "rasca" la capa de cèl·lules que hi ha a la llum de l'arc, per tal de descartar les cèl·lules endotelials. Després, amb un parell de pinces, es separen les capes íntima, mèdia i adventícia que conformen l'arc aòrtic. Descartem l'adventícia. Quan ja hem separat les capes les passem a una altra placa amb medi de porc amb un 20% de SP temperat.

Les plaques amb les parts d'íntima i mèdia amb medi de porc al 20% de SP s'usaran per fer els explants. Amb un bisturí estèril ens dediquem a fer trossets molt petits (4mm²) de les parts de les capes íntima i mèdia. Després passem de 15 a 20 trossets a una placa de 60 mm de diàmetre. Sense perdre gaire temps es reparteix 0,5 ml a cada placa i es barreja suaument en forma de "creu". Amb unes pinces estèrils es col·loquen els explants el més equidistants possible.

Es posen les plaques a l'incubador (37°C amb un 5% de CO₂).

4.2. INCUBACIÓ DELS EXPLANTS:

Els explants van ser incubats durant 18 hores, 2 i 10 dies respectivament amb medi de cultiu amb un 20% de SP. En la incubació dels 10 dies es va canviar el medi dels explants cada 2 dies.

Finalitzat el temps d'incubació i amb l'ajuda d'un parell de pinces es varen ajuntar els explants de cada placa i es van congelar en nitrogen líquid pel seu futur processament.

5.- OBTENCIÓ DE CÈL·LULES ENDOTELIALS D'AORTA PORCINA:

5.1.- PREPARACIÓ DELS CULTIUS PRIMARIS:

5.1.1.- EXTRACCIÓ I PREPARACIÓ DE L'AORTA:

S'extreu l'aorta junt amb les intercostals, per poder lligar-se, des de l'arc aòrtic fins al diafragma. Es neteja amb material net, passat per alcohol, per eliminar restes grans de teixit. Llavors s'introdueix en un tupperware que conté PBS-2% amb antibiòtics, es renta una mica en aquesta solució i es passa a un altre tupperware amb PBS-2% amb antibiòtics nets. S'introdueix el tupperware dins d'una bossa d'autoclau i es transporta a la sala de cultius.

Es prepara la campana de cultius amb el material adequat, s'introdueix el tupperware prèviament netejat amb alcohol, i dins de la campana es treu l'aorta i es passa a una placa de cultius quadrada gran. Es clampen amb pinces hemostàtiques els extrems de l'aorta i es neteja cuidadosament fins a deixar aïllades les intercostals. A continuació, es lliguen les intercostals amb seda estèril i s'introdueix PBS-2% d'antibiòtics varies vegades per netejar per dintre l'aorta. Es comprova que totes les intercostals estiguin ben clampades introduint PBS-2% d'antibiòtics, pinçant els extrems de l'aorta amb pinces hemostàtiques i observant detingudament que no s'escapa el líquid.

5.1.2.- DIGESTIÓ AMB COL·LAGENASA CLASSE II:

La solució de col·lagenasa es prepara el mateix dia. Es pesa la col·lagenasa, es dilueix en PBS-2% amb antibiòtics i es filtra amb un filtre de xeringa de 0,22 µm de diàmetre. Es deixa temperar a 37°C (important) fins el moment de la digestió de les cèl·lules endotelials de l'aorta.

Una vegada neta l'aorta amb el PBS-2% amb antibiòtics, s'emplena el vas clampat per un extrem amb la solució pre-temperada de col·lagenasa i s'incuba a la campana durant uns 8-10 minuts.

5.1.3.- PREPARACIÓ DELS CULTIUS:

Per una aorta d'un porc d'uns 25-35 kg s'han de preparar 4-5 flascons de 25 cm². Els flascons es gelatinitzen prèviament al seu ús posant 2-3 ml de gelatina 0.5% en H₂O estèril o PBS, es deixa a l'incubador de cèl·lules unes 2 hores, es renten 2 vegades amb PBS i es deixen a l'incubador fins que es sembrin les cèl·lules.

Acabada la incubació es recull la solució de col·lagenasa en un falcon de 50 ml que conté M-199 complementat pre-temperat. Es renta interiorment l'aorta 4 vegades amb

el medi M-199 per desenganxar les cèl·lules. La suspensió de cèl·lules es centrifuga a 1000 rpm durant 5 minuts. S'aspira el medi sobrenedant deixant una mica de medi per sobre del pellet, es donen uns copets a la base del tub per desenganxar el pellet i s'afegeix fins uns 5 ml de medi M-199 complementat per acabar de resuspendre les cèl·lules.

Les cèl·lules es resuspenen en un volum de medi M-199 complementat suficient per sembrar un volum de 5 ml de suspensió cel·lular per flascó. S'ha de recordar que els flascons sense filtre en el tap han d'obrir-se lleugerament per intercanviar gasos dins de l'incubador, i tancar-los abans de treure'ls de l'incubador.

5.2.- CULTIU IN VITRO DE LES CÈL·LULES ENDOTELIALS DE PORC:

Després d'1 hora, les cèl·lules sembrades ja s'hauran adherit a la placa; es deixa en el mateix medi fins el dia següent. El dia següent pel matí es canvia el medi, deixant una petita quantitat a la placa del medi anterior, per així eliminar els detritus cel·lulars generats durant el procediment de preparació dels cultius primaris. Es canvia el medi 2-3 vegades per setmana i es fa un control microscòpic de l'evolució del creixement cada 48 hores. Quan les cèl·lules estan subconfluents es tripsinitzen per subcultivar i passar les cèl·lules a pas 1.

5.3.- TRIPSINITZACIÓ DE LES CÈL·LULES:

S'utilitza tripsina especial per endotelials. Es guarda congelada en al·líquotes de 10 ml en tubs falcon de 15 ml. La tripsina ha d'estar ben pre-temperada a 37°C abans d'utilitzar-la.

Per tripsinitzar un flascó:

- a) S'aspira el medi;
- b) Es renta bé 2 vegades amb PBS pre-temperat i s'aspira bé perquè no es dilueixi la tripsina.
- c) S'afegeixen 1,5-2 ml per flascó de la solució de tripsina, es deixa la tripsina un mínim d'1 minut i es controla la tripsinització mitjançant control microscòpic (deixar actuar la tripsina fins que les cèl·lules agafin forma arrodonida);
- d) Finalitzada la incubació, s'aspira la tripsina, es donen uns copets a la base del flascó i s'afegeix medi M-199 pre-temperat per resuspendre les cèl·lules. Es recull la suspensió en un falcon de 50 ml, s'afegeix medi

nou al flascó per acabar de recuperar les cèl·lules, s'afegeix a la suspensió inicial i es centrifuga a 1000 rpm durant 5 minuts.

Després d'aspirar el medi es resuspèn el pellet de cèl·lules com s'ha indicat anteriorment, i es ressemblen les cèl·lules en flascons de 75 cm² gelatinitzats (1 flascó de 25 cm² ----- 1 flascó de 75 cm²).

6.- EXTRACCIÓ DEL ARN, L'ADN I LA PROTEÏNA AMB EL PROTOCOL DEL TRIPURE:

Aquest protocol ha estat dissenyat per Roche® i aplicat i modificat pel processament de totes les mostres d'estudi. Sempre s'ha de fer servir material autoclavat i RNAsa free. És imprescindible utilitzar guants i mantenir neta l'àrea en què es vulgui fer l'extracció.

Es procedeix de la següent manera :

- a) S'elimina el medi de cultiu aspirant amb un Pipetboy®.
- b) S'afegeix 1 ml de Tripure® a cada placa de cultiu o cada 100 mg de teixit. Es rasca amb l'ajut d'un rascador de plaques i el volum obtingut es passa diverses vegades per la punta de la pipeta automàtica fins que es veu ben homogeneïtzat, en el cas de què les cèl·lules provinquin de cultius, o s'homogenitza el teixit congelat o fresc amb un politró. Es reparteix en dos eppendorfs i es deixa en gel fins que s'hagin acabat de rascar o politronar totes i es puguin guardar a -80°C.

6.1.- PROCEDIMENT GENERAL

- a) Es descongelen les mostres que provinquin d'un mateix estudi. Un cop descongelades es deixen una estona més a temperatura ambient per tal de dissociar bé les unions dels complexos de les nucleoproteïnes.
- b) S'afegeix cloroform a cada eppendorf (0.2 ml per cada ml de Tripure®).
- c) Es tapa cada tub i s'agita fortament amb el vòrtex durant uns 15 segons.
- d) Es deixen els tubs a temperatura ambient de 2 a 15 minuts. Passat aquest temps es centrifuguen a 12000 x g (no sobrepassar-los), durant 15 minuts a 4°C. Així es formaran tres fases: una de transparent que queda a dalt (l'ARN), una de blanca al mig i una de vermella (a sota) que contenen el ADN i la proteïna i que s'hauran de purificar per

procediments diferents. Anem a especificar què cal fer per aïllar cada component:

6.2.- AÏLLAMENT DEL ARN

- a) Es transvasa el volum de la fase superior (sense escurar gaire) a un eppendorf net. La resta de volum es guarda per fer l'aïllament de proteïna i de ADN.
- b) S'afegeix isopropanol (0.5 ml d'isopropanol per cada ml de Tripure® inicial). Es tapa el tub i s'homogeneïtza el contingut invertint-lo diverses vegades. Es deixa incubar aquesta barreja a temperatura ambient durant uns 10 minuts per tal que precipiti l'ARN.
- c) Es centrifuga a 12000 x g, a 4°C durant un mínim de 10 minuts. S'elimina el sobrenedant.
- d) S'afegeix un mínim d'1 ml d'etanol al 75% a cada tub i es renta el pellet d'RNA vortejant el tub.
- e) Es centrifuga a 7500 x g durant 5 minuts a 4°C. S'elimina el sobrenedant. L'excés d'etanol del pellet s'evaporarà deixant-lo a l'aire (no deixar assecar-lo totalment). Això es pot repetir una altra vegada.
- f) Es resuspèn el pellet amb H₂O RNAsin o H₂O DEPC i s'homogeneïtza amb l'ajuda d'una pipeta i s'incuba a 55-60°C durant 10-15 minuts fins a dissoldre'l totalment.

6.3.- AÏLLAMENT DE ADN

- a) De les tres bandes obtingudes en el procediment general ens quedarem amb les dues inferiors (la blanca i la vermella) que són les que contenen el ADN i les proteïnes. Es procedeix de la següent manera:
- b) Amb molt de compte s'acaba de treure el volum que quedi de la banda aquosa, que és la que té l'ARN i no ens interessa. Cal eliminar aquest residu si es vol tenir el ADN pur.
- c) Es precipita el ADN afegint etanol absolut (al 100%) a les dues fases restants. S'afegeixen 0,3 ml d'etanol per cada ml de Tripure®.
- d) Es tapen els tubs eppendorfs i s'inverteixen diverses vegades per barrejar-los bé. Es deixen incubant 2-3 minuts a temperatura ambient per deixar que es formi el precipitat de ADN.

- e) Es centrifuguen les mostres a 6000 x g, durant 15 minuts a 4°C.
- f) Es treu el sobrenedant (que conté fenol, etanol i proteïna) de cada tub i es guarda a 4°C. Aquest volum s'utilitza després per fer l'extracció de proteïna i mentre, perquè no es degradi, es deixa a 4°C.

6.4.- AÏLLAMENT DE LA PROTEÏNA

- a) Per fer aquesta purificació s'utilitzen els sobrenedants obtinguts en el pas g de la purificació de l'ADN. Es passen a eppendorfs de 2 ml perquè sinó no hi cabrien els volums que s'hi afegeixen.
- b) Es fa precipitar la proteïna.
- c) S'afegeix isopropanol al sobrenedant que s'ha tret del pas g d'aïllament de l'ADN. El volum adient és 1,5 ml d'isopropanol per cada ml de Tripure®.
- d) Es tapen bé els tubs, s'inverteixen diverses vegades fins que es barregi tot.
- e) Es deixen incubant a temperatura ambient un mínim de 10 minuts per tal que precipiti la proteïna.
- f) Es centrifuguen les mostres a 12000 x g durant 10 minuts a 4°C.
- g) S'eliminen els sobrenedants.
- h) Es renten els precipitats de proteïna seguint els següents passos (que es repetiran 3 vegades):
 - i) Es resuspèn cada pellet amb uns 2 ml d'hidroclorur de guanidini 0.3 M amb etanol al 95%.
 - j) Es deixen incubar les mostres a temperatura ambient durant 20 minuts.
 - k) Es centrifuguen les mostres a 7500 x g durant 5 minuts a 4°C.
 - l) S'eliminen els sobrenedants.
 - m) A cada pellet de proteïna es fan els següents procediments:
 - n) S'afegeixen 2 ml d'etanol absolut a cada pellet.
 - o) S'agiten bé, però sense vortejar, per rentar-los.
 - p) Es deixen incubar les mostres a temperatura ambient durant, aproximadament, 20 minuts.
 - q) Es centrifuguen a 7500 x g durant 10 minuts a 4°C.
 - r) S'eliminen els sobrenedants.
 - s) S'elimina l'excés d'alcohol deixant els eppendorfs oberts perquè s'evapori.

- t) Els pellets de proteïna es dissolen afegint SDS a l'1% i passant-los repetidament per una punta de pipeta o de xeringa. En cas que costi de resuspendre'ls es posen a 50°C fins que solubilitzin del tot.
- u) Per quedar-nos només amb la proteïna solubilitzada es centrifuguen les mostres a 10000 x g, 10 minuts a 4°C.
- v) Es passen els sobrenedant a eppendorfs nets i ja es poden guardar directament a -20°C o bé utilitzar-los per fer western Blot.

7.- DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE PROTEÏNA

Per quantificar la proteïna es barregen 2 µl de mostra + 98 µl d'H₂O destil·lada, per cada mostra.

Cal fer una recta patró que serveixi per extrapolar els resultats de les mostres i poder determinar la seva concentració. Per preparar la recta patró s'han de fer les següents dilucions:

CONCENTRACIONS	VOLUM DE BCA (µl)	VOLUM D'H ₂ O (µl)
0 mg/ml	0 µl	100 µl
2.5 mg/ml	1.25 µl	98.75 µl
5 mg/ml	2.5 µl	97.5 µl
10 mg/ml	5 µl	95 µl
20 mg/ml	10 µl	90 µl

De cada dilució de la recta patró i de cada mostra es reparteixen 50 µl en dos pouets de la placa de plàstic de 96 pouets i s'afegeix a totes 100 µl de reactiu de color.

El reactiu de color consta de dos solucions A i B que han d'estar en una proporció 50:1.

Un cop afegit el reactiu s'incuba la placa a 37°C durant 30 minuts. Després es deixa atemperar durant 5 minuts i es llegeix la placa en un espectrofotòmetre a $\lambda = 562$ nm.

El resultat de concentració que ens doni el programa SoftMax ja és el definitiu.

8.- DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ I INTEGRITAT DEL ARN

Per determinar la concentració de l'ARN, es va medir l'absorbància a 260 nm de 1-2 µl de la solució acuosa d'ARN. Una absorbància de 1 OD equival a una concentració aproximada d'ARN de 40 µg/µl a la mostra original.

La integritat del ARN es va comprovar mitjançant electroforesi en gel d'agarosa al 1%, la qual permet separar l'ARN segons un gradient de tamany. Per fer això, 0,5-1 µg d'ARN es van diluir en tampó de mostres 1x, es van carregar en un gel d'agarosa al 1% en solució TBE 1x, i es van deixar córrer a 70V. Les bandes d'ARN obtingudes es van valorar en un transiluminador de llum ultravioleta (Gel-Doc 1000, Bio-rad). Es van observar les bandes ribosomals 18S i 28S, així com una banda menys intensa corresponent a l'ARN de menor tamany. L'ausència de bandes o la presència d'una cua (smear) són indicatives de la degradació de les mostres.

9.- WESTERN BLOT:

Un cop determinada la concentració de proteïna de les mostres (VEURE PROTOCOL DE DETERMINACIÓ DE PROTEÏNA) es fan els càlculs corresponents per agafar el volum necessari per carregar 25 µg de proteïna total. El tampó de mostra utilitzat és en condicions reductores (amb 2-mercaptoetanol).

Es preparen gels al 7.5% en acrilamida.

GEL SEPARADOR (1 gel)	7.5%	GEL APILADOR (4%)	Per 2 gels (4 ml)
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	1.25 ml	Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	1ml
Acrilamida/Bisacrilamida	1.25 ml	Acrilamida/Bisacrilamida	0.52 ml
SDS 10%	50 µl	SDS 10%	40 µl
H2O Milli-Q	2.43 ml	H2O Milli-Q	2.44 ml
Persulfat amònic 15%	25 µl	Persulfat amònic 15%	20 µl
TEMED	2.5 µl	TEMED	4 µl

Es preparen els suports on correran les mostres pel gel. Consisteixen en la superposició de dos vidres, un més llarg que l'altre, separats per uns bastonets que són els que donen el gruix del gel. A sobre el gel apilador, s'hi afegeix una pinta que un cop solidificat el gel es retira i queden marcats uns pouets que és on es carreguen les mostres.

Abans de carregar les mostres s'han d'escalfar a 95°C durant 5 minuts. Juntament amb els marcadors de pes molecular.

Dins una cubeta es col·loquen els gels polimeritzats i s'emplena amb Running Buffer 1X a pH 8.5 fins que cobreixi els gels.

Es sembren les mostres i marcadors, una per pouet o butxaca, amb una xeringa Hamilton.

Es fa córrer electroforèticament les mostres a 80 Volts.

Per fer la transferència de les proteïnes del gel d'acrilamida a una membrana de nitrocel·lulosa, es necessita un cassette que contingui:

ESPONJA + 2 PAPER WATHMANN + GEL + MEMBRANA NITROCEL·LULOSA
+ 2 PAPER WATHMANN + ESPONJA.

Tot això es fa amb presència de tampó de transferència amb un 20% de metanol.

* La membrana de nitrocel·lulosa s'ha de deixar 15 minuts abans de la transferència en el tampó de transferència amb el 20% de metanol.

Es transfereix tota la nit a 4°C a un amperatge de 0,20 Ampers.

Feta la transferència, es passen les membranes de nitrocel·lulosa a una solució de ponceau, la qual tenyirà totes les bandes de proteïna de color vermell, i ens donarà una idea de la transferència i estat de cada mostra.

Passat el ponceau, es bloquegen les membranes amb 50 ml de blotto (TBS-tween al 0,05% amb 5% de llet) durant 1 hora.

S'incuben les membranes amb 10 ml de blotto més la dilució de l'anticòs primari corresponent durant 1 hora.

Es fan 2 rentats amb TBS-Tween al 0,05% durant 15 minuts cadascun.

Es fan 2 rentats amb TBS durant 15 minuts cadascun.

S'incuben les membranes amb 10 ml de blotto més la dilució d'anticòs secundari corresponent durant 1 hora.

Es fan 2 rentats amb TBS-Tween al 0,05% durant 15 minuts cadascun.

Es fan 2 rentats amb TBS durant 15 minuts cadascun.

Es revelen les membranes amb 2 ml per cada membrana del kit SuperSignal durant 6 minuts, i després de retirar l'excés de SuperSignal, s'emboliquen les membranes amb un plàstic.

Les bandes es capten amb el programa Quantity One de BioRad.

10.- PROCESSAMENT DEL ARN I PCR A TEMPS REAL:

Es parteix d'1µg d'ARN de cada mostra i es fa síntesi de primera cadena fins a obtenir cDNA: al µg d'ARN se li afegeix oligo dT (1/5) i es desnaturalitzen les mostres a 70°C durant 5 minuts i després se li afegeix una barreja de 20 µl de volum total que conté: Tampó de síntesi (5X) a concentració 1X, dNTPs a 500 µM, DTT a 10 mM, RNAsa OUT a 1 U/µl, SuperScript RT a 10 U/µl. I es deixa la barreja 1 hora a 42°C. Després es para la reacció a 75°C durant 10 minuts.

Per analitzar les mostres de cADN en una PCR a temps real es fa en un aparell 7000 Sequence Detection System d'ABIPRISM (Applied Biosystems).

Primer es determina quina és la millor concentració dels oligonucleòtids sentit i antisentit, i també es calcula la recta patró del gen (veure taula 1 a l'annex 2) a partir de dilucions seqüencials d'un pool de les mostres que s'han d'analitzar. Es posen 2 µl de cDNA de cada dilució en una barreja de 50 µl de volum total que conté: Master Mix (1X), oligonucleòtids sentit i antisentit de COX-2 (TTAGAAGCGTCTATGGTGACATT) i (TCTGGGCGAGGCTTTTCTAC), i COX-1 (TGCTCATGCGCCTGGTACT) i (TCGTGTGCCGTGTTGTAGGT), i una sonda per COX-2 (6-FAM-ATGCCATGGAGCTGTATCCTGCCCTT-MGB) i COX-1 (6-FAM-ACAGTGCGTTCCACC-MGB) de porc (250nM) proporcionats per Applied Biosystems, i aigua DEPC. Després es segueixen tres passos, al primer pas es posen les mostres a 50°C (inhibeix la retrotranscriptasa) durant 2 minuts, al segon pas es posen les mostres a 95°C (desnaturalitza l'ADN) durant 10 minuts i el tercer pas consta de dos fases: primera a 95°C durant 15 segons i la segona a 60°C (hibrida les cadenes d'ADN) durant 1 minut. Aquest últim pas es repeteix 40 vegades. Els resultats s'analitzen amb el programa ABIPRISM 7000.

Un cop obtinguda la recta patró es fan córrer les mostres de la mateixa manera que les dilucions per determinar la recta patró. Acabada la carrera s'extrapolen els resultats de les mostres a la recta patró i aquests valors es tracten amb el programa EXCEL.

11.- PROTOCOL D'EIA PER LA DETERMINACIÓ DE LA CONCENTRACIÓ DE 6-KETO PGF-1- α :

IMPORTANT: L'aigua utilitzada per resuspendre els productes, ha de ser ultrapura i lliure de soluts orgànics. Es pot utilitzar l'aigua miliQ.

11.1.- PREPARACIÓ DE LES SOLUCIONS:

Els recipients en els que es guardaran les solucions preparades, s'han de netejar, i aclarir amb aigua ultrapura.

1.- EIA BUFFER: Es dilueix el vial 4 en 90 ml d'aigua ultrapura. S'han de dissoldre bé les sals precipitades.

2.- WASH BUFFER: Es fa una dilució 1:400 del vial 5 amb aigua ultrapura, i s'afegeix Tween 20 (vial 5a) 0,5 ml/L.

Per preparar 1 l: 2,5 ml vial 5 + 997 ml d'aigua ultrapura + 500 μ l vial 5a.

Per preparar 0,5 l: 1,25 ml vial 5 + 498,5 ml d'aigua ultrapura + 250 μ l vial 5a.

3.- 6-KETO PROSTAGLANDIN F-1- α STANDARD: Es dilueix el vial 3 amb 900 μ l d'aigua ultrapura. La concentració d'aquesta solució mare és de 5 ng/ml. Per preparar la corba estàndard, es marquen 8 tubs de l'1 al 8, i es fan les següents dilucions:

TUB #	EIA BUFFER
1	900 μ l
2-8	500 μ l

S'afegeixen 100 μ l de la solució mare al tub 1, es vorteja intensament, i 500 μ l del tub 1 es passen al tub 2, es vorteja, i es repeteix l'operació seqüencialment amb 500 μ l dels tubs 3-8.

La concentració final de 6-keto prostaglandin F-1- α , serà:

TUB #	CONCENTRACIÓ (pg/ml)
1	500
2	250

3	125
4	62,5
5	31,3
6	15,6
7	7,8
8	3,9

NOTA: La solució mare estàndard, és estable durant 6 SETMANES a 4°C.

4.- 6-KETO PROSTAGLANDIN F-1- α ACETYLCHLINESTERASE TRACER:
S'afegeixen 6 ml d'EIA Buffer al vial 2.

NOTA: El Tracer és estable durant 2 SETMANES a 4°C.

5.- 6-KETO PROSTAGLANDIN F-1- α ANTISÈRUM: Es dilueix el vial 1 amb 6 ml d'EIA Buffer.

NOTA: L'antisèrum és estable durant 4 setmanes a 4°C.

6.- MOSTRES: Es dilueixen les mostres amb EIA Buffer, a dos dilucions diferents cada mostra. No convé fer dilucions seqüencials, ja que pot augmentar l'error. Dilucions típiques serien:

DILUCIONS	MOSTRA (μ l)	EIA BUFFER (μ l)
1/10	100	900
1/50	20	980
1/100	10	990
1/200	10	1990 (a)
1/400	200 de (a)	200
1/800	100 de (a)	300

IMPORTANT: S'han de vortejar les solucions intensament una vegada ja preparades.

11.2.- DISPOSICIÓ DE LA PLACA MULTIPOUETS:

1.- Es dissenya sobre la plantilla l'ordre de les mostres a la placa. Normalment l'ordre és el següent:

B	S1	S5	*
B	S1	S5	*
NSB	S2	S6	*
NSB	S2	S6	*
Bo	S3	S7	*
Bo	S3	S7	*
TA	S4	S8	*
TA	S4	S8	*

B: Blanc, NSB: unió inespecífica, Bo: unió màxima, TA: activitat del tracer, S1-S8: estàndards 1-8, *: mostres (per duplicat).

Es completaria la placa amb totes les mostres, i en cas que sobrin pouets, es poden guardar a 4°C amb el seu dessecador.

2.- Es renta la placa abans d'utilitzar-la amb Wash Buffer (200 µl)/pouet, amb ajuda de la pipeta multicanal. A continuació s'elimina el Wash Buffer invertint la placa i sacsejant-la.

Les plaques que no s'utilitzin, es guarden a 4°C amb el seu dessecador.

3.- S'afegeix 100 µl d'EIA Buffer als pouets de NSB, i 50 µl als de Bo.

4.- S'afegeix 50 µl dels estàndards prèviament vortejats als pouets corresponents.

5.- S'afegeix 50 µl de les mostres prèviament vortejades als pouets corresponents.

6.- S'afegeix 50 µl de tracer amb el dispensador automàtic a tots els pouets excepte als de TA i B.

7.- S'afegeix 50 µl d'antisèrum amb el dispensador automàtic a tots els pouets excepte als de NSB, B i TA.

8.- Es cobreix la placa amb un film, i s'incuba durant 18 hores (tota la nit) a 4°C.

11.3.- REVELAT DE LA PLACA:

1.- Es prepara el reactiu d'Ellman: 2 vials 8 en 40 ml d'aigua ultrapura.

S'ha d'utilitzar el mateix dia en que es prepara, i protegir de la llum.

2.- Es buida la placa, i es renta 5 vegades amb Wash Buffer (200 μ l), amb l'ajuda de la pipeta multicanal.

3.- S'eliminen totes les gotes de Wash Buffer, sacsejant la placa, i s'afegeixen 200 μ l de reactiu d'Ellman per pouet, amb l'ajuda de la pipeta multicanal.

4.- Als pouets de TA se l'hi afegeix 5 μ l de tracer.

5.- Es deixa la placa en agitació i protegida de la llum durant 90-120 minuts, a temperatura ambient.

6.- Es llegeix l'absorbància en el espectrofotòmetre a 412 nm. És molt important netejar bé la placa per la base abans de llegir. L'absorbància de Bo ha de ser de 0,3-0,8 unitats. S'ha de fer a més una lectura de referència a 620 nm, per comprovar que el plàstic no absorbeix.

11.4.- ANÀLISI DELS RESULTATS:

Utilitzant el programa EXCEL, es construeix una fulla de càlcul amb les següents columnes:

mostra	abs	abs-B	abs-NSB	%B/Bo	logX	inv logX	pg/ml
--------	-----	-------	---------	-------	------	----------	-------

Per calcular el %B/Bo, es divideix l'absorbància de cada mostra corregida, pel valor de Bo, i es multiplica per 100.

Amb els valors de %B/Bo dels estàndards, i la seva concentració de 6-keto-PGF-1- α coneguda (veure la taula de concentració de les mostres estàndard), es construeix una corba logarítmica amb el programa CRICKET GRAPH.

A partir de la corba es pot calcular la concentració de 6-keto-PGF-1- α de les diferents mostres. No oblidem multiplicar el resultat per la dilució pertinent.

NOTA: Els valors a tenir en compte per construir la corba patró han de tenir un valor de B/Bo% del 20-80%. També els valors de les mostres han d'estar en aquest rang.

En el cas que els valors de les mostres estiguin fora d'aquest rang, s'haurien de canviar les dilucions, tenint en compte que a una major dilució augmenta el percentatge i viceversa.

NOTA: En cas que es dilueixin les mostres amb M-199 en lloc d'EIA Buffer, s'ha de diluir també la corba patró amb M-199.

ANNEX 1: MEDIS DE CULTIU

1. Medi de cultiu estàndard per les cèl·lules musculars llises de conill:
 - a) 20% de FCS (Fetal Calf Serum)
 - b) 39% de medi F12
 - c) 39% de medi DMEM
 - d) 1% de Glutamina (L-Glu)
 - e) 1% de Penicil·lina/Estreptomicina (P/S)
2. Medi de cultiu estàndard per les cèl·lules musculars llises de porc:
 - a) 20% de FCS (Fetal Calf Serum)
 - b) 62.4% de medi F12
 - c) 15.6% de medi DMEM
 - d) 1% de Glutamina (L-Glu)
 - e) 1% de Penicil·lina/Estreptomicina (P/S)
3. Medi d'arrest per cèl·lules musculars llises de conill:
 - a) 0.5% de FCS
 - b) 48.75% de medi F12
 - c) 48.75% de medi DMEM
 - d) 1% de L-Glu
 - e) 1% de P/S
4. Medi d'arrest per cèl·lules musculars llises de porc:
 - a) 0.5% de FCS
 - b) 78% de medi F12
 - c) 19.5% de medi DMEM
 - d) 1% de L-Glu
 - e) 1% de P/S

5. Medi de cultiu amb sèrum de conill (PSC):

- a) 10% de RSP
- b) 44% de medi F12
- c) 44% de medi DMEM
- d) 1% de L-Glu
- e) 1% de P/S

6. Medi de cultiu amb sèrum de porc (SP):

- a) 10% de PS
- b) 70.4% de medi F12
- c) 17.6% de medi DMEM
- d) 1% de L-Glu
- e) 1% de P/S

ANNEX 2: OBTENCIÓ DEL SÈRUM DE PORC

En un tub de vidre es posen 50 ml de sang extreta d'un porc control, i es deixa coagular durant 1 hora a temperatura ambient.

Es centrifuga el tub a 2400 rpm durant 20 minuts a 4°C.

Es recull el sobrenedant, que serà el sèrum de la sang.

S'ha d'inactivar, en cas que sigui necessari, a 56°C durant 30 minuts.

Sota una campana, es filtra i es prepara el medi de cultiu corresponent.

DISCUSSIÓ

Existeixen un gran ventall d'estratègies de control del risc cardiovascular. Concretament, es poden diferenciar dos tipus importants, com són les estratègies preventives, com poden ser el control de la dieta (dieta mediterrània, l'esport, el tabaquisme, els control dels nivells de colesterol,...), i les estratègies sobre l'aterotrombosi, concretament les que actuen sobre la trombosi secundària. En aquest estudi ens centrarem en aquest segon tipus.

Aquestes estratègies utilitzen les característiques de molècules específiques (fàrmacs) que actuen sobre enzims i productes reguladors del procés d'evolució de la malaltia i situacions fisiològiques agudes que presenten una simptomatologia associada a una patologia cardiovascular. En el nostre cas ens hem centrat en els efectes antitrombòtics i antiisquèmics d'un fàrmac amb una estructura similar al de l'aspirina, el triflusal. Així com també en els efectes antiisquèmics d'uns nous donador d'òxid nítric selectius per les plaquetes (LA419, LA816).

No existeix el fàrmac ideal, però cada vegada apareixen noves molècules més selectives per controlar una via metabòlica associada a una patologia. Aquesta especificitat ajuda a prevenir els anomenats efectes secundaris dels fàrmacs més genèrics, els quals poden actuar indirectament sobre moltes vies metabòliques alterant l'homeòstasi d'altres cèl·lules i òrgans. Encara que fan falta estudis amb més profunditat per determinar les seues mecanismes d'acció i les seves propietats farmacològiques per determinar el seu possible benefici terapèutic.

En el primer treball hem demostrat que el tractament amb aspirina i triflusal, i el seu principal metabòlit el HTB, són igualment efectius en la reducció de la progressió de trombus desencadenats per trombus residuals sota condicions de fluxes mitjans i severes en artèries caròtides estenòtiques. Els resultats descrits aquí també evidencien que el tractament crònic amb aspirina i triflusal a les dosis antitrombòtiques testades, redueixen en diferent grau fisiològic l'expressió de la Cox-2 vascular, mentre que la cox-1 no es veu afectada. A més, el principal metabòlit, el HTB, sembla que preserva l'activitat de la cox 2 endotelial permetent així la síntesi de prostaciclina.

La malaltia ateroscleròtica en la caròtida és la causa més important de l'embòlia isquèmica en els països occidentals.²⁸⁴ En realitat, l'embolització del trombus de la superfície de la placa ateroscleròtica de la caròtida o del trombus mural als vasos del cervell poden resultar ocluides i per tant patir isquèmia cerebral. L'aspirina, el triflusal,

i el seu metabòlit desacetilat, HTB, bloquegen principalment la cox-1 de les plaquetes prevenint la formació del proagregant i vasoconstrictor TXA₂ a les plaquetes. L'efecte antitrombòtic del triflusal ha estat prèviament descrit en varis assajos clínics els quals van mostrar que el triflusal és tan eficient com l'aspirina en la prevenció dels events cerebrovasculars, fins i tot s'ha vist un potencial risc de complicacions per sagnia a causa del fàrmac reduït.²⁸⁵ Tanmateix, encara que els dos inhibidors de la cox van provar la seva eficiència a nivell clínic i s'ha demostrat que redueixen l'activitat de les plaquetes, va quedar per aclarir com els dos compostos eren d'eficaços i equipotents bloquejant el creixement del trombus preexistent. Nosaltres hem demostrat en els nostres models de trombosi *ex vivo*,²⁸⁷ prèviament validats, que el triflusal i l'aspirina prevenien equivalentment la progressió d'un trombus desencadenat per un trombus residual més allunyat, indicant que igual que la trombina,^{286,287} el TXA₂ pot també contribuir al creixement del trombus i a events isquèmics més llunyans.²⁸⁸

Varis estudis han demostrat que la cox-2 és gairebé indetectable en les cèl·lules o teixits²⁹¹ no estimulats mentre que es veu considerablement induït en processos inflamatoris patofisiològics, com per exemple en les lesions ateroscleròtiques.^{289,290} Encara que, en línia amb altres estudis, el nostre estudi afirma de la importància de la cox-2 en condicions fisiològiques normals.^{291,292} A més, en aquest context i en el millor dels casos, hem demostrat per primera vegada l'habilitat dels inhibidors de la cox-1 de plaquetes per modular l'expressió de la cox-2 vascular en animals sans i no hipercolesterolèmics de forma coincident amb la no observació de canvis en la cox-1 vascular. Sens dubte, molts dels estudis que mostren una disminució de la cox-2 per varis fàrmacs antiinflamatoris no esteroideus (NSAIDs) han estat realitzats en cèl·lules o teixits on prèviament se'ls ha induït la cox-2.^{293,294}

Observant l'efecte del tractament oral amb aspirina i triflusal en l'expressió de la cox-2 del sistema vascular, la proteïna cox-2 residual era molt més alta en el grup del triflusal que en el grup de l'aspirina, suggerint una millor preservació de l'enzim per part del triflusal. Per tant, tenint en compte que l'administració oral de triflusal semblava estar associada amb una baixa expressió de l'enzim cox-2, ens vàrem preguntar en quin grau aquest efecte tardà influenciava l'activitat de la cox-2, en forma de síntesi de prostaciclina, i si tal influència era mediada pel triflusal a través del seu metabòlit principal, el HTB. Curiosament, vam observar que el HTB va preservar la síntesi de cox-2 i de prostaciclina en les cèl·lules endotelials. Això està en contrast amb el que es va observar amb el triflusal. De fet, el triflusal és ràpidament convertit al seu metabòlit

majoritari i per això té una vida mitja del voltant d'uns 30 minuts mentre que el HTB s'acosta almenys fins les 48 hores.²⁹⁵ Aquests descobriments poden ajudar a desxifrar millor el rol que pot tenir el HTB in vivo. De fet, el HTB participa en els efectes relacionats in vivo del tractament amb triflusal induint la preservació de cox-2 i la subsegüent síntesi de prostaciclina. Recentment, el HTB s'ha observat que juga un paper important com a antiinflamatori en l'efecte neuroprotector del triflusal.²⁹⁶ A la vista d'aquestes troballes i considerant que, a diferència de l'àcid salicílic (principal metabòlit de l'aspirina), el HTB reté l'activitat de les plaquetes, el triflusal es manté com una gran promesa en quan a ser una alternativa atractiva a l'aspirina en pacients per qui l'aspirina està contraindicada per causa d'intolerància o hipersensibilitat.

La isoforma vascular de la cox-2 contribueix significativament a la síntesi de la prostaciclina sistèmica i per això juga un paper important en el rol vasculoprotector; un efecte que ha estat apreciat en els últims anys pel què fa als efectes adversos dels inhibidors selectius de la cox-2 en assajos clínics.²⁹⁷ A més, molts estudis de recerca amb animals han recalcat la importància de la prostaciclina no només en l'homeòstasi trombòtica¹⁴⁰ com a resposta compensatòria d'un increment de TXA₂, sino també prevenint la progressió de l'aterosclerosi, hipertensió, hiperplàsia intimal, i la restenosi.²⁹⁸ De fet, la inhibició simultània de la síntesi de TXA₂ i la PGI₂ poden ser una de les raons pels decebedors resultats dels assajos clínics i la discussió sobre les dosis "baixes" versus "altes" de l'aspirina.²⁹⁹

En resum, els resultats d'aquest primer estudi mostren que l'aspirina, el triflusal i els seu metabòlit, el HTB, tenen un efecte inhibidor sobre la deposició de les plaquetes durante la trombosis mural desencadenada per una desendotelització i una lesió severa de la paret dels vasos. Per això, els nostres resultats demostren que, encara que el creixement del trombus en una superfície vascular coberta amb un trombus fresc és mediat principalment per la trombina, pot ser inhibida per inhibidors de cox-1 de les plaquetes usats a una dosi adequada. Adicionalment, encara que l'aspirina i el triflusal inhibeixen moderadament els nivells de proteïna i ARN missatger de la cox-2 a la paret vascular, el triflusal preserva millor l'expressió de la proteïna cox-2. A més, l'activitat de l'enzim cox-2 en les cèl·lules endotelials és preservada pel metabòlit principal del triflusal, el HTB. Aquesta protecció de la prostaciclina vascular pot ajudar a explicar en part els descobriments obtinguts en un llarg metaanàlisi recent de 5 estudis on el tractament amb triflusal va resultar millor que l'aspirina en quan a la prevenció de l'embòlia isquèmica fatal.³⁰⁰

Un altre molècula important en les estratègies de risc del control cardiovascular és l'òxid nítric (NO). Aquesta molècula és de vital importància, juntament amb les anteriorment anomenades prostaciclina i TXA₂, per regular el to vascular en l'homeòstasi i per contrapartida en condicions fisiopatològiques. A més, també té més efectes sobre les cèl·lules de la paret vascular tal com hem descrit anteriorment. Es pot considerar el que s'anomena una molècula amb efectes pleiotròpics. Un d'aquests efectes és la seva regulació sobre les plaquetes de les seves propietats antitrombòtiques i antiisquèmiques. A més com ara descriuré en el següent estudi actua modulant el cicle cel·lular de les cèl·lules vascular segons la dosi administrada.

La migració de les CML de la mitjana cap a la íntima i la seva ulterior proliferació contribueixen a l'espessiment intimal de les artèries, jugant un paper important en l'aterosclerosi i especialment en la restenosi després d'una angioplàstia transluminal percutànea.³⁰¹ Per tant, els agents que restringeixen el creixement de les CML poden contribuir envers una estratègia preventiva potencialment eficient per la malaltia coronària. En aquest estudi, hem parlat que tres compostos diferents alliberadors de NO (2 nous donadors de NO específics de plaquetes – LA419 i LA816– i la nitroglicerina [GTN]) són capaços de modular la supervivència de les CML mentre que probablement limiten la seva migració i proliferació, efectes que van més enllà de les seves propietats antitrombòtiques i antiisquèmiques descrites anteriorment.³⁰²⁻³⁰⁵

L'Òxid nítric té diverses activitats bioquímiques incloent la mediació en la vasodilatació, segregant directament el superòxid, atenuant l'adhesió i activació dels leucòcits, inhibint l'agregació plaquetària, i mantenint la integritat endotelial.³⁰⁶ A més, el NO s'ha observat que exerceix propietats antiproliferatives en les CML tan in vivo com in vitro suggerint un paper important del NO en l'aterogènesi.³⁰⁷ De fet, en el dany vascular la subsegüent interrupció en la producció de NO realça la proliferació de les CML. Concretament, les CML experimenten una “modulació fenotípica” i migren de la mitjana a la íntima on comencen a proliferar i a produir col·lagen forçant l'arquitectura vascular (per exemple, la remodelació vascular).³⁰⁸ Considerant tot això, nosaltres hem mostrat que el tractament in vivo amb tres compostos alliberadors de NO estructuralment diferents, quan s'administren a dosis terapèutiques per efectes antiplaquetaris i antiisquèmics, mostren un increment significatiu tant en l'activitat com la quantitat de p53. L'activació de la proteïna supressora de tumors p53 és sabut que habilita el bloqueig de la proliferació de les CML durant la formació de les lesions

ateroscleròtiques ja sigui per l'arrest transitori del cicle cel·lular o induint l'apoptosi.^{309,310} S'ha observat prèviament que el NO produeix un efecte dual en l'apoptosi de les CML depenent de la concentració usada. Ha estat descrit que quantitats fisiològiques de NO tenen un efecte antiapoptòtic²⁰⁹ mentre que concentracions relativament altes promouen l'apoptosi.²⁰⁵ Els nostres resultats proporcionen evidències que la donació exògena de NO a les dosis usades, les dues administrades de forma aguda (GTN o LA816) i oralment (LA419), promouen la quiescència de les cèl·lules vasculars més que no pas l'apoptosi, un efecte que es manté almenys durant uns 10 dies després de la retirada de la donació de NO. El tractament amb NO es va associar amb una clara reducció de la ciclina D2, un efector a la baixa del p53. De fet, les ciclines D1/D2 amb l'associació als cdk4/6 estan essencialment involucrades en la transició de la fase G1 a la fase S del cicle cel·lular. Així, els nostres resultats demostren l'habilitat de la donació exògena de NO per bloquejar la progressió del cicle cel·lular probablement conduint les cèl·lules a la quiescència.³¹¹ Aquests descobriments estan recolzats per la detecció de la disminució de Bax, una diana apoptòtica del p53, mediador clau per la via apoptòtica depenent de la mitocondria (via intrínseca). De fet, no vàrem observar cap alteració de l'expressió de la caspasa 8 probablement excloent els efectes del NO de la via apoptòtica extrínseca.³¹² A més, la donació exògena de NO està també associada amb un increment dels ratio Bcl2/Bax la qual cosa atenua els senyals proapoptòtics i afavorint ulteriorment l'estat de supervivència.³¹³ De fet, la caspasa 3 activa (un conegut efector irreversible de la senyal apoptòtica) a penes va ser aparent la seva expressió en els explants vasculars procedents dels animals tractats amb NO en els períodes analitzats en aquest estudi. En resum, l'administració de LA419, LA816, i GTN a dosis terapèutiques preserva les CML de l'apoptosi. A més, tenint en compte els nostres resultats previs, que mostraven que la supressió de la p53 en les CML està associat amb un clar creixement cel·lular,³¹⁴ hipotetitzem que el tractament amb NO pot limitar la proliferació i migració de les CML representant així un mecanisme de protecció global contra l'aterogènesi i el remodelat vascular. Es necessiten futurs estudis per enfocar correctament aquestes qüestions.

Prèviament havíem publicat que en porcs i en subjectes humans saludables els potents efectes antitrombòtics associats amb l'administració de LA816 i LA419 (dos nous compostos donadors de NO específics per plaquetes)³⁰²⁻³⁰⁵ més enllà de les seves propietats antiisquèmiques. La remodelació vascular després d'una dilatació per un baló d'angioplastia està també mediada per la formació incrementada d'un trombus. Un cop activades les plaquetes alliberen concentracions locals de mitògens derivats de

plaquetes que promouran la proliferació de les CML³¹⁵ i a llarg termini el remodelat vascular. Des d'aquest punt de vista, ja que nosaltres hem demostrat prèviament el potent efecte antiplaquetari associat a l'administració de LA419 i LA816 sota les mateixes condicions usades per dur a terme aquest estudi, la donació de NO amb aquests donadors de NO no només pot reduir la formació del trombus sino que també pot influenciar indirectament sobre el comportament de les CML a través dels seus efectes sobre les plaquetes.

S'ha d'especificar que el nostre estudi s'ha dut a terme amb animals sans. Certament, s'hauran de fer més estudis en models rellevants de malaltia (deficiència en NO, etc...) per proporcionar dades preclíniques rellevants per probar aquests conceptes.

Per concloure, la proliferació de les CML s'ha mostrat molt interessant degut a la seva importància durant l'aterogènesi i la remodelació vascular. En aquest estudi hem dilucidat la contribució de tres compostos diferents donadors de NO (LA419, LA816, i GTN) sobre la supervivència de les CML. Hem mostrat que el tractament amb NO exogen in vivo preserva les CML de l'apoptosi mentre que facilita el pas a quiescència de les cèl·lules i així probablement limita la proliferació i posterior migració. Afegint aquest efecte ateroprotector als ja descrits anteriorment, els potents antitrombòtics i antiisquèmics, els donadors de NO mostren un potencial valuós perfil terapèutic per la prevenció i el tractament de la malaltia coronària i el remodelat vascular.

CONCLUSIONS

Basant-nos en els resultats obtinguts en aquest treball, es poden extreure les següents conclusions:

Respecte a l'**objectiu 1**: Estudi de l'efecte protector del triflusal en el creixement del trombus secundari i la implicació de la ciclooxygenasa-2:

- El tractament amb aspirina i triflusal, i el seu principal metabòlit el HTB, són igualment efectius en la reducció de la progressió de trombus desencadenats per trombus residuals sota condicions de fluxe mitjans i severos en artèries caròtides estenòtiques.
- El tractament crònic amb aspirina i triflusal a les dosis antitrombòtiques testades redueixen en diferent grau fisiològic l'expressió de la Cox 2 vascular, mentre que la cox 1 no es veu afectada.
- El principal metabòlit, el HTB, sembla que preserva l'activitat de la cox 2 endotelial permetent així la síntesi de prostaciclina.

Respecte a l'**objectiu 2**: El tractament amb donadors de NO exogen in vivo preserven els nivells de p53 i protegeixen les cèl·lules vasculares de l'apoptosi:

- El tractament in vivo amb tres compostos alliberadors de NO (LA419, LA816 i Nitroglicerina) estructuralment diferents, quan s'administren a dosis terapèutiques per efectes antiplaquetaris i antiisquèmics, mostren un increment significatiu tant en l'activitat com la quantitat de p53.
- El tractament amb NO exogen in vivo preserva les CML de l'apoptosi mentre que facilita el pas a quiescència de les cèl·lules i així probablement limita la proliferació i posterior migració.
- Aquest efecte ateroprotector sumant als ja descrits anteriorment, els potents antitrombòtics i antiisquèmics, podem concloure que els donadors de NO mostren un potencial valuós perfil terapèutic per la prevenció i el tractament de la malaltia coronària i el remodelat vascular.

BIBLIOGRAFIA

1. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994;344:1383-9.
2. Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med* 1995;333:1301-7.
3. Breslow JL. Cardiovascular disease burden increases, NIH funding decreases. *Nat Med* 1997;3:600-1.
4. Braunwald E. Shattuck Lecture — cardiovascular medicine at the turn of the millennium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med* 1997;337:1360-9.
5. Ross R, Glomset JA. Atherosclerosis and the arterial smooth muscle cell: proliferation of smooth muscle is a key event in the genesis of the lesions of atherosclerosis. *Science* 1973;180:1332-9.
6. Ross R, Glomset JA. The pathogenesis of atherosclerosis. *N Engl J Med* 1976;295:369-77, 420-5.
7. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis — an update. *N Engl J Med* 1986;314:488-500.
8. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801-9.
9. Ross R. Atherosclerosis: a defense mechanism gone awry. *Am J Pathol* 1993;143:987-1002.
10. Napoli C, D'Armiento FP, Mancini FP, et al. Fatty streak formation occurs in human fetal aortas and is greatly enhanced by maternal hypercholesterolemia: intimal accumulation of low density lipoprotein and its oxidation precede monocyte recruitment into early atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997;100:2680-90.
11. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, et al. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994;89:2462-78.
12. Simionescu N, Vasile E, Lupu F, Popescu G, Simionescu M. Prelesional events in atherogenesis: accumulation of extracellular cholesterol-rich liposomes in the arterial intima and cardiac valves of the hyperlipidemic rabbit. *Am J Pathol* 1986;123:109-25.
13. Glagov S, Weisenberg E, Zarins CK, Stankunavicius R, Kolettis GJ. Compensatory enlargement of human atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1987;316:1371-5.
14. Jonasson L, Holm J, Skalli O, Bondjers G, Hansson GK. Regional accumulations of T cells, macrophages, and smooth muscle cells in the human atherosclerotic plaque. *Arteriosclerosis* 1986;6:131-8.
15. van der Wal AC, Das PK, Bentz van de Berg D, van der Loos CM, Becker AE. Atherosclerotic lesions in humans: in situ immunophenotypic analysis suggesting an immune mediated response. *Lab Invest* 1989;61:166-70.
16. Stary HC. The histological classification of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:463-74.
17. Libby P, Ross R. Cytokines and growth regulatory molecules. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:585-94.
18. Raines EW, Rosenfeld ME, Ross R. The role of macrophages. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol. 1. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:539-55.

19. Falk E, Shah PK, Fuster V. Pathogenesis of plaque disruption. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and coronary artery disease*. Vol.2. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996:492-510.
20. Ross R. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *N Engl J Med*. 1999;340:115-26.
21. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing factor and contracting factor. *FASEB J* 1989; 3:2007-2018.
22. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.
23. Vanhoutte PM. Endothelium dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J* 1997; 18:19-29.
24. DiCorleto PE, Gimbrone MA Jr. Vascular endothelium. En: *Atherosclerosis and coronary disease*. Eds: Fuster V, Ross R, Topol EJ. Lippincott-Raven, Philadelphia 1996, pp387-389.
25. Verbeuren TJ, Jordaens FH, Zonnekeyn LL, Van Hove CE, Coene M-C, Herman AG. Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. *Circ Res* 1986; 58:552-554.
26. Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, Dzau VJ. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1990; 86:228-234.
27. Traub O, Berk BC. Laminar shear stress: Mechanisms by which endothelial cells transducer an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:677-685.
28. Malek AM, Alper SI, Izummo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 1999; 282:2035-2042.
29. Olsson U, Ostergren-Lunden G, Moses J. Glycosaminoglycan-lipoprotein interaction. *Glycoconj J*. 2001;18:789-797.
30. Camejo G, Fager G, Rosengren B, Hurt-Camejo E, Bondjers G. Binding of low density lipoproteins by proteoglycans synthesized by proliferating and quiescent human arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem*. 1993;268:14131-14137.
31. Steinberg D (a). A critical look at the evidence for the oxidation of LDL in atherogenesis. *Atherosclerosis*. 1997;131:S5-7.
32. Lefer AM and Ma XL. Cytokines and growth factors in endothelial dysfunction. *Crit Care Med*. 1993;21:S9-14.
33. Eberhardt RT, Forgione MA, Cap A, Leopold JA, Rudd MA, Trolliet M, Heydrick S, Stark R, Klings ES, Moldovan NI, Yaghoubi M, Goldschmidt-Clermont PJ, Farber HW, Cohen R, Loscalzo J. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest*. 2000;106:483-491.
34. Tousoulis D, Davies G, Stefanadis C, Toutouzas P, Ambrose JA. Inflammatory and thrombotic mechanisms in coronary atherosclerosis. *Heart*. 2003;89:993-997.
35. Hansson GK. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:1876-1890.
36. Kaartinen M, van der Wal AC, van der Loos CM, Pick JJ, Koch KT, Becker AE, Kovanen PT. Mast cell infiltration in acute coronary syndromes: implications for plaque rupture. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:606-612.
37. Bürrig KF. The endothelium of advanced atherosclerotic plaques in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1991;11:1678-1689.
38. Falk E, Fernandez-Ortiz A (a). Role of thrombosis in atherosclerosis and its complications. *Am J Cardiol*. 1995;75:3B-11B.
39. Koenig W. Fibrin(ogen) in cardiovascular disease: an update. *Throm Haemost*. 2003;89:601-609.

40. Watanabee T, Pakala R, Katagiri T, Benedict CR. Angiotensin II and serotonin potentiate endothelin-1-induced vascular smooth muscle cell proliferation. *J Hypertens* 2001;19:731-739.
41. Newby AC. Molecular and cell biology of native coronary and vein-graft atherosclerosis: regulation of plaque stability and vessel-wall remodelling by growth factors and cell-extracellular matrix interactions. *Coron Artery Dis.* 1997;8:213-224.
42. Barnes MJ, Farndale RW. Collagens and atherosclerosis. *Exp Gerontol.* 1999;34(4):513-25.
43. Andreeva ER, Pugach IM, Orekhov AN. Collagen-synthesizing cells in initial and advanced atherosclerotic lesions of human aorta *Atherosclerosis.* 1997;130:133-142.
44. Hao H, Gabbiani G, Bochaton-Piallant ML. Arterial smooth muscle cell heterogeneity: implications for atherosclerosis and restenosis development. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2003;23:1510-1520.
45. Rao RN, Falls DG, Gerrity RG, Sethuraman SN, Thiruvaiyaru DS. Intimal thickness and layering, and smooth muscle cell phenotypes in aorta of youth. *Pathobiology.* 2000;68:18-28.
46. Llorente-Cortes V, Martinez-Gonzalez 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.
47. Llorente-Cortes V, Otero-Vinas M, Hurt-Camejo E, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Human coronary smooth muscle cells internalize versican-modified LDL through LDL receptor-related protein and LDL receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:387-393.
48. Kolodgie FD, Burke AP, Farb A, Weber DK, Kutys R, Wight TN, Virmani R. Differential accumulation of proteoglycans and hyaluronan in culprit lesions: insights into plaque erosion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22:1642-1648.
49. Bobryshev YV, Lord RS, Warren BA. Calcified deposit formation in intimal thickenings of the human aorta. *Atherosclerosis.* 1995;118:9-21.
50. Steitz SA, Speer MY, Curinga G, Yang HY, Haynes P, Aebbersold R, Schinka T, Kartsenty G, Giachelly CM. Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification. *Circ Res.* 2001;89:1147-1154.
51. Clowes MM, Kocher O, Ropraz P, Chaponnier C, Gabbiani G. Arterial smooth muscle cells in vivo : relationship between actin isoform expression and mitogenesis and their modulation by heparin. *J Cell Biol.* 1998;107:1939-1945.
52. Stary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced 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.
53. Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi. *Circulation.* 1992;86:III74-85.
54. Fuster V, Badimon JJ, Badimon L (a) .Clinical-pathological correlations of coronary disease progression and regression. *Circulation.* 1992;86:III1-III11.
55. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;352:1685-95.
56. Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:2131-7.

57. Ruggeri ZM. Platelets in atherothrombosis. *Nat Med* 2002;8:1227-34.
58. Italiano JE Jr, Shivdasani RA. Megakaryocytes and beyond: the birth of platelets. *J Thromb Haemost* 2003;1:1174-82.
59. Healy AM, Pickard MD, Pradhan AD, et al. Platelet expression profiling and clinical validation of myeloid-related protein-14 as a novel determinant of cardiovascular events. *Circulation* 2006;113:2278-84.
60. Dennis MM, Tolley ND, Bunting M, et al. Escaping the nuclear confines: signal-dependent pre-mRNA splicing in anucleate platelets. *Cell* 2005;122:379-91.
61. Macaulay IC, Carr P, Gusnanto A, Ouwehand WH, Fitzgerald D, Watkins NA. Platelet genomics and proteomics in human health and disease. *J Clin Invest* 2005;115:3370-7.
62. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood* 2004;103:2096-104.
63. Watson SP, Bahou WF, Fitzgerald D, Ouwehand W, Rao AK, Leavitt AD. Mapping the platelet proteome: a report of the ISTH Platelet Physiology Subcommittee. *J Thromb Haemost* 2005;3:2098-101.
64. McRedmond JP, Park SD, Reilly DF, et al. Integration of proteomics and genomics in platelets: a profile of platelet proteins and platelet-specific genes. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:133-44.
65. Mannucci PM. Treatment of von Willebrand's disease. *N Engl J Med* 2004;351:683-94.
66. Offermanns S. Activation of platelet function through G protein-coupled receptors. *Circ Res* 2006;99:1293-304.
67. Kulkarni S, Dopheide SM, Yap CL, et al. A revised model of platelet aggregation. *J Clin Invest* 2000;105:783-91.
68. Hodivala-Dilke KM, McHugh KP, Tsakiris DA, et al. Beta3-integrin-deficient mice are a model for Glanzmann thrombasthenia showing placental defects and reduced survival. *J Clin Invest* 1999;103:229-38.
69. Ni H, Denis CV, Subbarao S, et al. Persistence of platelet thrombus formation in arterioles of mice lacking both von Willebrand factor and fibrinogen. *J Clin Invest* 200;106:385-92.
70. Schwertz H, Tolley ND, Foulks JM, et al. Signal-dependent splicing of tissue factor pre-mRNA modulates the thrombogenicity of human platelets. *J Exp Med* 2006;203:2433-40.
71. Jin RC, Voetsch B, Loscalzo J. Endogenous mechanisms of inhibition of platelet function. *Microcirculation* 2005;12:247-58.
72. Cullen L, Kelly L, Connor SO, Fitzgerald DJ. Selective cyclooxygenase-2 inhibition by nimesulide in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1998;287:578-82.
73. McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini I, Kapoor S, Lawson JA, Fitzgerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:272-7 [Erratum, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5890.]
74. Catella-Lawson F, McAdam B, Morrison BW, et al. Effects of specific inhibition of cyclooxygenase-2 on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289:735-41.
75. Moncada S. Adventures in vascular biology: a tale of two mediators. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2006;361:735-59.
76. Marcus AJ, Broekman MJ, Drosopoulos JH, et al. Role of CD39 (NTPDase-1) in thromboregulation, cerebroprotection, and cardioprotection. *Semin Thromb Hemost* 2005;31:234-46.

77. Massberg S, Brand K, Gruner S, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerosis lesion formation. *J Exp Med* 2002;196:887-96.
78. Methia N, André P, Denis CV, Economopoulos M, Wagner DD. Localized reduction of atherosclerosis in von Willebrand factor-deficient mice. *Blood* 2001;98:1424-8.
79. Praticò D, Tillmann C, Zhang ZB, Li H, Fitzgerald GA. Acceleration of atherogenesis by COX-1-dependent prostanoid formation in low density lipoprotein receptor knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:3358-63.
80. Praticò D, Cyrus T, Li H, Fitzgerald GA. Endogenous biosynthesis of thromboxane and prostacyclin in 2 distinct murine models of atherogenesis. *Blood* 2000;96:3823-6.
81. Egan KM, Wang M, Fries S, et al. Cyclooxygenases, thromboxane, and atherosclerosis: plaque destabilization by cyclooxygenase-2 inhibition combined with thromboxane receptor antagonism. *Circulation* 2005;111:334-42. [Erratum, *Circulation* 2005;111:2414.]
82. Kobayashi T, Tahara Y, Matsumoto M, et al. Roles of thromboxane A2 and prostacyclin in the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice. *J Clin Invest* 2004;114:784-94.
83. Dixon DA, Tolley ND, Benis-Standoli K, et al. Expression of COX-2 in platelet-monocyte interactions occurs via combinatorial regulation involving adhesion and cytokine signalling. *J Clin Invest* 2006;116:2727-38.
84. Huo Y, Schober A, Forlow SB, et al. Circulating activated platelets exacerbate atherosclerosis in mice deficient in apolipoprotein E. *Nat Med* 2003;9:61-7.
85. Gawaz M, Langer H, May AE. Platelets in inflammation and atherosclerosis. *J Clin Invest* 2005;115:3378-84.
86. Henn V, Slupsky JR, Gräfe M, et al. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998;391:591-4.
87. Hermann A, Rauch BH, Braun M, Schrör K, Weber AA. Platelet CD40 ligand (CD40L) – subcellular localization, regulation of expression, and inhibition by clopidogrel. *Platelets* 2001;12:74-82.
88. Urbich C, Dernbach E, Aicher A, Zeiher AM, Dimmeler S. CD40 ligand inhibits endothelial cell migration by increasing production of endothelial reactive oxygen species. *Circulation* 2002;106:981-6.
89. Slupsky JR, Kalbas M, Willutweit A, Henn V, Kroczeck RA, Müller-Berghaus G. Activated platelets induce tissue factor expression on human umbilical vein endothelial cells by ligation of CD40. *Thromb Haemost* 1998;80:1008-14.
90. Mach F, Schönbeck U, Sukhova GK, Atkinson E, Libby P. Reduction of atherosclerosis mice by inhibition of CD40 signalling. *Nature* 1998;394:200-3.
91. Schönbeck U, Varo N, Libby P, Buring J, Ridker PM. Soluble CD40L and cardiovascular risk in women. *Circulation* 2001;104:2266-8.
92. Harding SA, Sarma J, Josephs DH, et al. Upregulation of the CD40/cd40 ligand dyad and platelet-monocyte aggregation in cigarette smokers. *Circulation* 2004;109:1926-9.
93. Santilli F, Davi G, Consoli A, et al. Thromboxane-dependent CD40 ligand release in type 2 diabetes mellitus. *J Am Coll Cardiol* 2006;47:391-7.
94. Vaidyula VR, Rao AK, Mozzoli M, Homko C, Cheung P, Boden G. Effects of hyperglycemia and hyperinsulinemia on circulating tissue factor procoagulant activity and platelet CD40 ligand. *Diabetes* 2006;55:202-8.
95. Morel O, Tofi F, Hugel B, et al. Procoagulant microparticles: disrupting the vascular homeostasis equation? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006;26:2594-604.
96. Barry OP, Praticò D, Savani RC, Fitzgerald GA. Modulation of monocyte-endothelial cell interactions by platelet microparticles. *J Clin Invest* 1998;102:136-44.

97. Barry OP, Pratico D, Lawson JA, Fitzgerald GA. Transcellular activation of platelets and endothelial cells by bioactive lipids in platelet microparticles. *J Clin Invest* 1997;99:2118-27.
98. von Hundelshausen P, Weber KS, Huo Y, et al. RANTES deposition by platelets triggers monocyte arrest on inflamed and atherosclerotic endothelium. *Circulation* 2001;103:1772-7.
99. Weber C. Platelets and chemokines in atherosclerosis: partners in crime. *Circ Res* 2005;96:612-6.
100. Tan KT, Lip GY. The potential role of platelet microparticles in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2005;94:488-92.
101. Yu G, Rux AH, Ma P, Bdeir K, Sachais BS. Endothelial expression of E-selectin is induced by the platelet-specific chemokine platelet factor 4 through LRP in an NF-KappaB-dependent manner. *Blood* 2005;105:3545-51.
102. Kisucka J, Butterfield CE, Duda DG, et al. Platelets and platelet adhesion support angiogenesis while preventing excessive hemorrhage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:855-60.
103. Loscalzo J. Oxidant stress: a key determinant of atherothrombosis. *Biochem Soc Trans* 2003;31:1059-61.
104. Pignatelli P, Sanguigni V, Lenti L, et al. gp91phox-Dependent expression of platelet CD40 ligand. *Circulation* 2004;110:1326-9.
105. Krötz F, Sohn HY, Gloe T, et al. NAD(P)H oxidase-dependent platelet superoxide anion release increases platelet recruitment. *Blood* 2002;100:917-24.
106. Krötz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:1988-96.
107. Williams PC, Coffey MJ, Coles B, et al. In vivo aspirin supplementation inhibits nitric oxide consumption by human platelets. *Blood* 2005;106:2737-43.
108. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ II. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:9383-7.
109. Morrow JD. Quantification of isoprostanes as indices of oxidant stress and the risk of atherosclerosis in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:279-86.
110. Praticò D, Smyth EM, Violi F, Fitzgerald GA. Local amplification of platelet function by 8-Epi prostaglandin F₂alpha is not mediated by thromboxane receptor isoforms. *J Biol Chem* 1996;271:14916-24.
111. Davi G, Guagnano MT, Ciabattani G, et al. Platelet activation in obese women: role of inflammation and oxidant stress. *JAMA* 2002;288:2008-14.
112. Davi G, Alessandrini P, Mezzetti A, et al. In vivo formation of 8-Epi-prostaglandin F₂ alpha is increased in hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3230-5.
113. Davi G, Ciabattani G, Consoli A, et al. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin F₂ alpha and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation*. 1999;99:224-9.
114. Davi G, Di Minno G, Coppola A, et al. Oxidative stress and platelet activation in homozygous homocystinuria. *Circulation* 2001;104:1124-8.
115. Pitsilos S, Hunt J, Mohler ER, et al. Platelet factor 4 localization in carotid atherosclerotic plaques: correlation with clinical parameters. *Thromb Haemost* 2003;90:1112-20.
116. Koyama H, Maeno T, Fukumoto S, et al. Platelet P-selectin expression is associated with atherosclerotic wall thickness in carotid artery in humans. *Circulation* 2003;108:524-9.

117. Fateh-Moghadam S, Li Z, Ersel S, et al. Platelet degranulation is associated with progression of intima-media thickness of the common carotid artery in patients with diabetes mellitus type 2. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:1299-303.
118. Nowak J, Murray JJ, Oates JA, Fitzgeralds GA. Biochemical evidence of a chronic abnormality in platelet and vascular function in healthy individuals who smoke cigarettes. *Circulation* 1987;76:6-14.
119. DaviG, Averna M, Catalano I, et al. Increased thromboxane biosynthesis in type IIa hypercholesterolemia. *Circulation* 1992;85:1792-8.
120. Davi , Catalano I, Averna MG, et al. Thromboxane biosynthesis and platelet function in type II diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1990;322:1769-74.
121. Minuz P, Patrignani P, Gaino S, et al. Increased oxidative stress and platelet activation in patients with hypertension and renovascular disease. *Circulation* 2002;106:2800-5.
122. Di Minno G, Davi G, Margaglione M, et al. Abnormally high thromboxane biosynthesis in homozygous homocystinuria: evidence of platelet involvement and probucol-sensitive mechanism. *J Clin Invest* 1993;92:1400-6.
123. Davi G, Gresele P, Violi F, et al. Diabetes mellitus, hypercholesterolemia, and hypertension but not vascular disease per se are associated with persistent platelet activation in vivo: evidence derived from the study of peripheral arterial disease. *Circulation* 1997;96:69-75.
124. Patrono C, Garcia Rodriguez LA, Landolfi R, Baigent C. Low-dose aspirin for the prevention of atherothrombosis. *N Engl J Med* 2005;353:2373-83.
125. Kearney PM, Baigent C, Godwin J, Halls H, Emberson JR, Patrono C. Do selective cyclo-oxygenase-2 inhibitors and traditional non-steroidal anti-inflammatory drugs indrease the risk of atherothrombosis? Meta-analysis of randomised trials. *BMJ* 2006;332:1302-8.
126. Falk E, Shah PK, Fuster V. Coronary plaque disruption. *Circulation* 1995;92:657-71.
127. Patrono C, Collier B, Fitzgerald GA, Hirsh J, Roth G. Platelet-active drugs: the relationships among dose, effectiveness, and side effects: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004;126:Suppl 3:234S-264S.
128. Folts JD, Schafer AI, Loscaozo J, Willerson JT, Muller JE. A perspective on the potential problems with aspirin as an antithrombotic agent: a comparison of studies in an animal model with clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 1999;33:295-303.
129. Nies wandt B, Aktas B, Moers A, Sachs UJ. Platelets in atherothrombosis: lessons from mouse models. *J Thromb Haemost* 2005;3:1725-36.
130. Tsakiris DA, Scuder L, Hodivala-Dilke K, Hynes RO, Collier BS. Hemostasis in the mouse (*Mus musculus*): a review. *Thromb Haemost* 1999;81:177-88.
131. Calara F, Silvestre M, Casanada F, Yuan N, Napoli C, Palinski W. Spontaneous plaque rupture and secondary thrombosis in apolipoprotein E-deficient and LDL receptor-deficient mice. *J Pathol* 2001;195:257-63.
132. Schwartz SM, Galis ZS, Rosenfeld ME, Falk E. Plaque rupture in humans and mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:705-13.
133. Fitzgerald DJ, Roy L, Catella F, Fitzgerald GA. Platelet activation in unstable coronary disease. *N Engl J Med* 1986;315:983-9.
134. Vejar M, Fragasso G, Hackett D, et al. Dissociation of platelet activation and spontaneous myocardial ischemia in unestable angina. *Thromb Haemost* 1990;63:163-8.
135. ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both or neither

- among 17187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *Lancet* 1988;2:349-60.
136. Davies MJ, Thomas AC. Plaque fissuring – the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* 1985;53:363-73.
137. Albers GW, Amarenco P, Easton JD, Sacco RL, Teal P. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004;126:Suppl 3:483S-512S.
138. Koudstaal PJ, Ciabattini G, van Gijn J, et al. Increased thromboxane biosynthesis in patients with acute cerebral ischemia. *Stroke* 1993;24:219-23.
139. van Kooten F, Ciabattini G, Patrono C, Dippel DW, Koudstaal PJ. Platelet activation and lipid peroxidation in patients with acute ischemic stroke. *Stroke* 1997;28:1557-63.
140. Cheng Y, Austin SC, Rocca B, et al. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science* 2002;296:539-41.
141. Yu Y, Cheng Y, Fan J, et al. Differential impact of prostaglandin H synthase 1 knockdown on platelets and parturition. *J Clin Invest* 2005;115:986-95.
142. Cheng Y, Wang M, Yu Y, Lawson J, Funk CD, Fitzgerald GA. Cyclooxygenases, microsomal prostaglandin E synthase-1, and cardiovascular function. *J Clin Invest* 2006;116:1391-9.
143. Fitzgerald GA, Oates JA, Hawiger J, et al. Endogenous biosynthesis of prostacyclin and thromboxane and platelet function during chronic administration of aspirin in man. *J Clin Invest* 1983;71:676-88.
144. Cooke JP, Tsao PS. Is NO an endogenous antiatherogenic molecule? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1994;14:653-55.
145. Griffiths M, Evans TW. Inhaled nitric oxide in adults. *N Engl J Med* 2005;353:25.
146. Dandona P. Endothelial dysfunction and hypertension in diabetes mellitus. *Med Clin N Am* 2004;88:911-31.
147. Bolander FF Jr. Prolactin activation of mammary nitric oxide synthase: molecular mechanisms. *J Mol Endocrinol* 2002;28:45-51.
148. Vallance P, Chan N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart* 2001;85:342-50.
149. Rodrigo J, Alonso D, Fernandez AP, Serrano J, Lopez JC, Encinas JM, Fernandez Vizarrá P, Castro S, Peinado MA, Pedrosa JA, Richard A, Martínez Murillo, Santacana M, Bentura ML, Uttenthal RLO. Nitric oxide: síntesis, neuroprotección and neurotoxicity. *Anales del sistema sanitario de Navarra*. 2000;23(2):195-236.
150. Tessari P. Acute effect of insulin on nitric oxide synthesis in humans: a precursor-product isotopic study. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;293:E776-E782.
151. Hurford WE. Inhaled nitric oxide: Current concepts. *The American Society of Anesthesiologists*. 2003.
152. Coggins MP, Bloch KD. Nitric oxide in the pulmonary vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:1877-85.
153. Roberts CK. Acute exercise increases nitric oxide synthase activity in skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 1999;277:390-94.
154. Muravchick S, Levy RJ. Clinical implications of mitochondrial dysfunction. *Anesthesiology* 2006;105:819-37.
155. Brunton LL, Lazo JS, Parker KL. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. 11th ed 2006:395-397.
156. Sowers JR. Insulin and insulin resistance: impact on blood pressure and cardiovascular disease. *Med Clin N Am* 2004;88:63-82.
157. Norata G, Catapano AL. Molecular mechanisms responsible for the anti-inflammatory and protective effect of high-density lipoprotein on the endothelium. *High Blood Press Cardiovasc Prev* 2007;14:21-31.

158. Madamanchi NR, Runge MS. Mitochondrial dysfunction in atherosclerosis. *Circ Res* 2007;100:460-73.
159. Chikan G et al. Lipids: potencial regulators of nitric oxide generation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004;287:E386-E389.
160. Oparil S. Pathogenesis of hypertension. *Ann Intern Med* 2003;139:761-76.
161. He Z. Microvascular complications of diabetes. *Endocrinol Metab Clin N Am* 2004;33:215-38.
162. Sokolnicki LA. Contribution of nitric oxide to cutaneous microvascular dilation in individuals with type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E314-E318.
163. Pantelis A. Insulin and endothelin: An interplay contributing to hypertension development? *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92:379-85.
164. Turina M, Christ-Crain M, Polk HC Jr. Diabetes and hyperglycemia: strict glycemic control. *Crit care Med* 2006;34[Suppl]:S291-S300.
165. Powell LA. High glucose decreases intracellular glutathione concentrations and upregulates inducible nitric oxide synthase gene expression in intestinal epithelial cells. *J Mol Endocrinol* 2004;33:797-803.
166. Davis N, Katz S, Wylie-Rosett J. The effect of diet on endothelial function. *Cardiol Rev* 2007;15:62-66.
167. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
168. Lazebnik YA, Cole S, Cooke CA, Nelson WG, Earnshaw WC. Nuclear events of apoptosis in vitro in cell-free mitotic extracts: a model system for analysis of the active phase of apoptosis. *J Cell Biol* 1993;123:7-22.
169. Kaufmann SH, Hengartner MO. Programmed cell death: alive and well in the new millennium. *Trends Cell Biol* 2001;11:526-34.
170. Li D, Liu L, Chen H, Sawamura T, Ranganathan S, Mehta JL. LOX-1 mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of matrix metalloproteinases in human coronary artery endothelial cells. *Circulation* 2003;107:264-70.
171. Tricot O, Mallat Z, Heymes C, Belmin J, Leseche G, Tedgui A. Relation between endothelial cell apoptosis and blood flow direction in human atherosclerotic plaques. *Circulation* 2000;101:2450-3.
172. Casscells W, Naghavi M, Willerson JT. Vulnerable atherosclerotic plaque: a multifocal disease. *Circulation* 2003;107:2072-5.
173. Maseri A, Fuster V. Is there a vulnerable plaque? *Circulation* 2003;107:2068-71.
174. Sata M, Walsh K. Oxidized LDL activates fas-mediated endothelial cell apoptosis. *J Clin Invest* 1998;102:1682-9.
175. Sata M, Walsh K. Endothelial cell apoptosis induced by oxidized LDL is associated with the down-regulation of the cellular caspase inhibitor FLIP. *J Biol Chem* 1998;273:33103-6.
176. Farber A, Kitzmiller T, Morganelli PM, Pfeiffer J, Groveman D, Wagner RJ, Cronenwett JL, Powell RJ. A caspase inhibitor decreases oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in bovine endothelial cells. *J Surg Res* 1999;85:323-30.
177. Boyle JJ, Weissberg PL, Bennett MR. Human macrophage-induced vascular smooth muscle cell apoptosis requires NO enhancement of Fas/Fas-L interactions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1624-30.
178. Kolodgie FD, Narula J, Burke AP, Haider N, Farb A, Hui-Liang Y, Smialek J, Virmani R. Localization of apoptotic macrophages at the site of plaque rupture in sudden coronary death. *Am J Pathol* 2000; 157:1259-68.
179. Walsh K, Smith RC, Kim HS. Vascular cell apoptosis in remodelling, restenosis, and plaque rupture. *Circ Res* 2000;87:184-8.

180. Ball RY, Stowers EC, Burton JH, Cary NR, Skepper JN, Mitchinson MJ. Evidence that the death of macrophage foam cells contributes to the lipid core of atheroma. *Atherosclerosis* 1995;114:45-54.
181. Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT. Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol* 1996;7:330-5.
182. Tabas I. Apoptosis and plaque destabilization in atherosclerosis: the role of macrophage apoptosis induced by cholesterol. *Cell Death Differ* 2004;11:S12-6.
183. Hansson GK, Holm J, Jonasson L. Detection of activated T lymphocytes in the human atherosclerotic plaque. *Am J Pathol* 1989;135:169-75.
184. Inagaki Y, Yamagishi S, Amano S, Okamoto T, Koga K, Makita Z. Interferon-gamma-induced apoptosis and activation of THP-1 macrophages. *Life Sci* 2002;71:2499-508.
185. Mallat Z, Corbaz A, Scoazec A, Graber P, Alouani S, Esposito B, Humbert Y, Chvatchko Y, Tedgui A. Interleukin-18/interleukin-18 binding protein signalling modulates atherosclerotic lesion development and stability. *Circ Res* 2001;89:E41-5.
186. Rapp JH, Connor WE, Lin DS, Inahara T, Porter JM. Lipids of human atherosclerotic plaques and xanthomas: clues to the mechanism of plaque progression. *J Lipid Res* 1983;24:1329-35.
187. Kolodgie FD, Gold HK, Burke AP, Fowler DR, Kruth HS, Weber DK, Farb A, Guerrero LJ, Hayase M, Kutys R, Narula J, Finn AV, Virmani R. Intraplaque hemorrhage and progression of coronary atheroma. *N Engl J Med* 2003;349:2316-25.
188. Li W, Dalen H, Eaton JW, Yuan XM. Apoptotic death of inflammatory cells in human atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1124-30.
189. Libby P, Geng YJ, Sukhova GK, Simon DI, Lee RT. Molecular determinants of atherosclerotic plaque vulnerability. *Ann NY Acad Sci* 1997;811:134-42.
190. O'Sullivan M, Scott SD, McCarthy N, Figg N, Shapiro LM, Kirkpatrick P, Bennett MR. Differential cyclin E expression in human in-stent stenosis smooth muscle cells identifies targets for selective anti-restenosis therapy. *Cardiovasc Res* 2003;60:673-83.
191. Patel VA, Zhang QJ, Siddle K, Soos MA, Goddard M, Weissberg PL, Bennett RM. Defect in insulin-like growth factor-1 survival mechanism in atherosclerotic plaque-derived vascular smooth muscle cells is mediated by reduced surface binding and signalling. *Circ Res* 2001;88:895-902.
192. Bauriedel G, Hutter R, Welsch U, Bach R, Sievert H, Luderitz B. Role of smooth muscle cell death in advanced coronary primary lesions: implications for plaque instability. *Cardiovasc Res* 1999;41:480-8.
193. Kockx MM, Herman AG. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res* 2000;45:736-46.
194. Geng YJ, Henderson LE, Levesque EB, Muszynski M, Libby P. Fas is expressed in human atherosclerotic intima and promotes apoptosis of cytokine-primed human vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2200-8.
195. Mayr M, Xu Q. Smooth muscle cell apoptosis in arteriosclerosis. *Exp Gerontol* 2001;36:969-87.
196. Hansson GK. Cell-mediated immunity in arteriosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1997;8:301-11.
197. Geng YJ, Liao H-S, Macgovern J. Expression of FasL in advanced human atherosclerotic lesions: implications for co-occurrence of immunocytotoxicity and immune privilege. *Circulation* 1998;98(Suppl.D):1-48.
198. Sata M, Perlman H, Muruve DA, Silver M, Ikebe M, Libermann TA, Oettgen P, Walsh K. Fas ligand gene transfer to the vessel wall inhibits neointima formation

- and overrides the adenovirus-mediated T cell response. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:1213-17.
199. Shimizu M, Fukuro K, Nagata S, Suhara T, Okuro M, Fujii K, Higashiro Y, Mogi M, Hatanaka Y, Ogihara T. Increased plasma levels of the soluble form of Fas ligand in patients with acute myocardial infarction and unstable angina pectoris. *J Am Coll Cardiol* 2002;39:585-90.
200. Okura T, Watanabe S, Jiang Y, Nakamura M, Takata Y, Yang ZH, Kohara K, Kitami Y, Hiwada K. Soluble Fas ligand and atherosclerosis in hypertensive patients. *J Hypertens* 2002;20:895-8.
201. Martin-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Munoz-Garcia B, Gomez-Hernandez A, Arribas A, Ortega L, Tunon J, Egido J. NF-KappaB activation and Fas ligand overexpression in blood and plaques of patients with carotid atherosclerosis: potential implication in plaque instability. *Stroke* 2004;35:458-63.
202. Kavurma MM, Bobryshev U, Khachigian LM. Ets-1 positively regulates Fas ligand transcription via co-operative interactions with Sp-1. *J Biol Chem* 2002;277:36244-52.
203. Kavurma MM, Santiago FS, Bonfoco E, Khachigian LM. Sp1 phosphorylation regulates apoptosis via extracellular LasL-Fas engagement. *J Biol Chem* 2001;276:4964-71.
204. O'Connor M, Salzman AL, Szabo C. Role of peroxynitrite in the protein oxidation and apoptotic DNA fragmentation in vascular smooth muscle cells stimulated with bacterial lipopolysaccharide and interferon-gamma. *Shock* 1997;8:439-43.
205. Pollman M, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons G. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis-counterbalancing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res* 1996;79:748-56.
206. Sandau K, Pfeilschifter J, Brune B. Nitric oxide and superoxide induced p53 and Bax accumulation during mesangial cell apoptosis. *Kidney Int* 1997;52:378-86.
207. Fukuo K, Hata S, Suhara T, et al. Nitric oxide induces up regulation of Fas and apoptosis in vascular smooth muscle. *Hypertension* 1996;27:823-26.
208. Xie KP, Wang YF, Huang SY, et al. Nitric oxide-mediated apoptosis of K-1735 melanoma cells is associated with downregulation of Bcl-2. *Oncogene* 1997;15:771-79.
209. Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 beta-converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* 1997;185:601-7.
210. Ogura T, Tatemichi M, Esumi H. Nitric oxide inhibits CPP32-like activity under redox regulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;236:365-9.
211. Mannick JB, Miao XQ, Stamler JS. Nitric oxide inhibits Fas-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:24125-8.
212. Calmels S, Hainaut P, Ohshima H. Nitric oxide induces conformational and functional modifications of wild-type p53 tumor suppressor protein. *Cancer Res* 1997;57:3365-9.
213. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD: *Molecular biology of the cell*. Garland, New York, NY 1983.
214. Pines J: Cyclins and cyclin-dependent kinases: theme and variations. *Adv Cancer Res* 1995;66:181-212.
215. van den Heuvel S, Harlow E: Distinct roles for cyclin-dependent kinases in cell cycle control. *Science* 1993;262:2050-2054.
216. David-Pfeuty T, Nouvian-Dooghe Y: Human cyclin B1 is targeted to the nucleus in G(1) phase prior to its accumulation in the cytoplasm. *Oncogene* 1996;13:1447-1460-

217. Kato J, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ: Direct binding of cyclin-D to the retinoblastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase cdk4. *Genes Rev* 1993;7:331-342.
218. Mudrak I, Ogris E, Rothenedet H, Wintersbarger E: Coordinated trans-activation of DNA synthesis- and precursor-producing enzymes by polyomavirus large T antigen through interaction with the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 1994;14:1886-1892.
219. Toyoshima H, Hunter T: p27, a novel inhibitor of G1 cyclin-cdk protein kinase activity, is related to p21. *Cell* 1994;78:67-74.
220. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, Fox MP, Wei N. Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. *Mol Biol Cell* 1995;6:387-400.
221. Hall M, Bates S, Peters G. Evidence for different modes of action of cyclin-dependent kinase inhibitors: p15 and p16 bind to kinases, p21 and p27 bind to cyclins. *Oncogene* 1995;11:1581-1588.
222. WaldmanT, Kinzeler KW, Vogelstein B. P21 is necessary for the p53-mediated G(1) arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 1995;55:5187-5190.
223. Lee S, Elenbaas B, Levine A, Griffith J. P53 and its 14kDa C-terminal domain recognize primary DNA damage in the form of insertion/deletion mismatches. *Cell* 1995;81:1013-1020.
224. Wang Y, Prives C. Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. *Nature* 1995;376:88-91.
225. Haines DS, Landers JE, Engle LJ, George DL. Physical and functional interaction between wild-type p53 and mdm2 proteins. *Mol Cell Biol* 1994;14:1171-1178.
226. Clarke AR, Gledhill S, Hooper ML, Bird CC, Wylie AH. P53 dependence of early apoptotic and proliferative responses within the mouse intestinal epithelium following gamma-irradiation. *Oncogene* 1994;9:1767-1773.
227. Mitra AK, Gangahar DM, Agrawal DK. Cellular, molecular and immunological mechanisms in the pathophysiology of vein graft intimal hyperplasia. *Immunol Cell Biol* 2006;84:115-124.
228. Fingerle J, Au YPT, Clowes AW, Reidy C. Intimal lesion formation in rat carotid arteries after endothelial denudation in absence of medial injury. *Arteriosclerosis* 1990;10:1082-1087.
229. Beohar N, Flaherty JD, Davidson CJ, Maynard RC, et.al. Antirestenotic effects of a locally delivered caspase inhibitor in a ballon injury model. *Circulation* 2004;109:108-113.
230. Clarke MC, Figg N, Maguire JJ, Davenport AP, Goddard M, Littlewood TD, Bennett MR. Apoptosis of vascular smooth muscle cells induces features of plaque vulnerability in atherosclerosis. *Nat Med* 2006;12:1075-1080.
231. Clowes AW, Reidy MA, Clowes MM. Kinetics of cellular proliferation after arterial injury. I. Smooth muscle growth in the absence of endothelium. *Lab Invest* 1983;49:327-333.
232. Lindner V, Lappi DA, Baird A, Majack RA, Reidy MA. Role of basic fibroblast growth factor in vascular lesion formation. *Circ Res* 1991;68:106-113.
233. Olson NE, Chao S, Lindner V, Reidy MA. Intimal smooth muscle cell proliferation after balloon catheter injury: The role of basic fibroblast growth factor. *Am J Pathol* 1992;140:1017-1023.
234. Lewis CD, Olson NE, Raines EW, Reidy MA, Jackson CL. Modulation of smooth muscle proliferation in rat carotid artery by platelet-derived smooth muscle proliferation in rat artery by platelet-derived mediators and fibroblast growth factor-2. *Platelets* 2001;12:352-358.

235. Englesbe MJ, Davies MG, Hawkins SM, Hsieh pch, Daum G, Kenagy RD, Clowes AW. Arterial injury repair in non-human primates- The role of platelet-derived growth factor receptor- β . *J Surg Res* 2004;119:80-84.
236. Zhu BH, Zhao GS, Witte DP, Hui DY, Fagin JA. Targeted overexpression of IGF-1 in smooth muscle cells of transgenic mice enhances neointimal formation through increased proliferation and cell migration after intraarterial injury. *Endocrinology* 2001;142:3598-3606.
237. Gallo R, Padurean A, Toschi V, Bichler J, Fallon JT. Prolonged thrombin inhibition reduces restenosis after balloon angioplasty in porcine coronary arteries. *Circulation* 1998;97:581-588.
238. Wolf YG, Rasmussen LM, Ruoslahti E. Antibodies against transforming growth factor- β 1 suppress intimal hyperplasia in a rat model. *J Clin Invest* 1994;93:1172-1178.
239. Rectenwald JE, Moldawer LL, Huber TS, Seeger JM, Ozaki CK. Direct evidence for cytokine involvement in neointimal hyperplasia. *Circulation* 2000;102:1697-1702.
240. Matsuda M, Shimomura I, Sata M, Arita Y, et. Al. Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem* 2002;277:37487-37491.
241. Feldman LJ, Aguirre L, Ziol M, Bridou JP, Nevo N, Michel JB, Steg PG. Interleukin-10 inhibits intimal hyperplasia after angioplasty or stent implantation in hypercholesterolemic rabbits. *Circulation* 2000;101:908-916.
242. Rauma-Pinola T, Paakko P, Ilves M, Serpi R, Romppanen H, Vuolteenaho O, Ruskoaho H, Hautala T. Adrenomedullin gene transfer induces neointimal apoptosis and inhibits neointimal hyperplasia in injured rat artery. *J Gene Med* 2006;8:452-458.
243. Kohler TR, Jawien A. Flow affects development of intimal hyperplasia after arterial injury in rats. *Arterioscler Thromb* 1992;12:963-971.
244. Majesky M, Reidy M, Benditt EP, Schwartz S. Expression of platelet-derived growth factor (PDGF) A- and B-chain gene in smooth muscle during repair of arterial injury. *J Mole Cell Cardiol* 1987;19:S3.
245. Indolfi et., al. Effects of balloon injury on neointimal hyperplasia in streptozotocin-induced diabetes and in hyperinsulinemic nondiabetic pancreatic islet-transplanted rats. *Circulation* 2001;103:2980-2986.
246. Roqué M, Reis ED, Fuster V, Padurean A, Fallon JT, Taubman MB, Chesebro JH, Badimon JJ. Inhibition of tissue factor reduces thrombus formation and intimal hyperplasia after porcine coronary angioplasty. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:2303-2310.
247. Jackson CL, Reidy MA. Basic fibroblast growth factor: Its role in the control of smooth muscle cell migration. *Am J Pathol* 1993;143:1024-1031.
248. Zalewski A, Shi Y, Johnson AG. Diverse origin of intimal cells: smooth muscle cells, myofibroblasts, fibroblasts, and beyond? *Circ Res* 2002;91:652-655.
249. Nikkari ST, Järveläinen HT, Wight TN, Ferguson M, Clowes AW. Smooth muscle expression of extracellular matrix genes after arterial injury. *Am J Pathol* 1994;144:1348-1356.
250. Koyama H, Reidy MA. Expression of extracellular matrix proteins accompanies lesion growth in a model of intimal reinjury. *Circ Res* 1998;82:988-995.
251. Hanke et., al. Time course of smooth muscle cell proliferation in the intima and media of arteries following experimental angioplasty. *Circ Res* 1990;67:651-659.
252. Rowland M, Riegelman S, Harris PA, Sholkoff SB. Absorption kinetics of aspirin in man following oral administration of an aqueous solution. *J Pharm Sci* 1972;61:379-385.

253. Castillo J, Rodríguez JR, Suárez C. Ácido acetilsalicílico. En: Trombosis, fármacos antitrombóticos y enfermedad cerebrovascular. Ed: Castillo J, Martínez-Vila E. J. Uriach & Cia, Barcelona 1995, pp.175-192.
254. Roth GJ, Majerus. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I. Acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest* 1975;44:669-694.
255. Roth GJ, Calverly DC. Aspirin, platelets and thrombosis. Theory and practise. *Blood* 1994;83:885-98.
256. Mohri H, Ohkubo T. Single-dose of enteric-coated aspirin on platelet function and thromboxane generation in middle-aged men. *Ann Pharmacother* 1993;27:405-410.
257. Werner MH, Senzel L, Bielawska A, Khan W, Hannun YA. Diacylglycerol overcomes aspirin inhibition of platelets: evidence for a necessary role for diacylglycerol accumulation in platelet activation. *Mol Pharmacol* 1991;39:547-556.
258. Chesebro JH, Fuster V. Therapeutic challenge of plaque rupture: value of biochemical markers. *J Am Coll Cardiol* 1987;10:1005.
259. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Collaborative overview of randomized trials of antiplatelet therapy. I. Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *Br Med J* 1994;308:81-106.
260. Antiplatelet Trialists' Collaboration. Secondary prevention of vascular disease by prolonged antiplatelet treatment. *Br Med J* 1988;296:320-331.
261. Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomized trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Br Med J* 2002;324:71-86.
262. Preston FE, Whipps S, Jackson CA, French AJ, Wyld PJ, Stoddard CJ. Inhibition of prostacyclin and platelet thromboxane A2 after low-dose aspirin. *N Engl J Med* 1981;304:76-79.
263. Vial JH, McLeod LJ, Roberts MS, Seville PR. Selective inhibition of platelet cyclooxygenase with controlled released, low-dose aspirin. *Aust N Z J Med* 1990;20:652-656.
264. Cruz JP, Sánchez de la Cuesta F. Triflusal. En: Trombosis, fármacos antitrombóticos y enfermedad cerebrovascular. Ed: Castillo J, Martínez-Vila E. J. Uriach & Cia, Barcelona 1995, pp.21-39.
265. Cruz JP, Mata JM, Sánchez de la Cuesta F. Triflusal vs aspirin on the inhibition of human platelet and vascular cyclooxygenase. *Gen Pharmacol* 1992;23:297-300.
266. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF- κ B binding by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994;265:956-959.
267. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997;336:1066-1071.
268. Patrono C. Aspirin: new cardiovascular uses for an old drug. *Am J Med* 2001;110:62-65.
269. Cruz-Fernandez JM, Bescos-López L, García-Dorado D, López García-Aranda V, Cabades A, Martí-Jadraque L, Velasco JA, Castro-Beiras A, Torres F, Marfil F, Navarro E. Randomized comparative trial of triflusal and aspirin following acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2000;21:457-465.
270. Ignarro LJ, Kadowitz PJ. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1985;25:171-191.
271. Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest*. 1986;78:1-5.
272. Kukovetz WR, Holzmann S, Romanin C. Mechanism of vasodilation by nitrates: role of cyclic GMP. *Cardiology*. 1987;74:12-19.

273. Abrams J. Interactions between organic nitrates and thiol groups. *Am J Med* . 1991;91:106S-112S.
274. Werns SW, Rote WE, Davis JH, Guevara T, Lucchesi BR. Nitroglycerin inhibits experimental thrombosis and reocclusion after thrombolysis. *Am Heart J*. 1994;127:727-37.
275. Hinz B, Schroder H. Nitrate tolerance is specific for nitric acid esters and its recovery requires an intact protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;252:232-235.
276. Marley R, Feelisch M, Holt S, Moore K. A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols. *Free Radic Res*. 2000 ;32:1-9.
277. Ignarro LJ. Heme-dependent activation of soluble guanylate cyclase by nitric oxide: regulation of enzyme activity by porphyrins and metalloporphyrins. *Semin Hematol*. 1989;26:63-76.
278. Pawloski JR, Swaminathan RV, Stamler JS. Cell-free and erythrocytic S-nitrosohemoglobin inhibits human platelet aggregation. *Circulation*. 1998;97:263-267.
279. Gordge MP, Meyer DJ, Hothersall J, Neild GH, Payne NN, Noronha-Dutra A. Copper chelation-induced reduction of the biological activity of S-nitrosothiols. *Br J Pharmacol*. 1995;114:1083-1089.
280. Hirayama A, Noronha-Dutra AA, Gordge MP, Neild GH, Hothersall JS. S-nitrosothiols are stored by platelets and released during platelet-neutrophil interactions. *Nitric Oxide*. 1999;3:95-104.
281. Kaposzta Z, Baskerville PA, Madge D, Fraser S, Martin JF, Markus HS. L-arginine and S-nitrosoglutathione reduce embolization in humans. *Circulation*. 2001;103:2371-2375.
282. Langford EJ, Brown AS, Wainwright RJ, de Belder AJ, Thomas MR, Smith RE, Radomski MW, Martin JF, Moncada S. Inhibition of platelet activity by S-nitrosoglutathione during coronary angioplasty. *Lancet*. 1994;344:1458-1460.
283. Werns SW, Rote WE, Davis JH, Guevara T, Lucchesi BR. Nitroglycerin inhibits experimental thrombosis and reocclusion after thrombolysis. *Am Heart J*. 1994;127:727-37.
284. Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern SM, Ho M, Howard V, Kissela B et al. Heart disease and stroke statistics—2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008;117:e25-146.
285. Matias-Guiu J, Ferro JM, Alvarez-Sabin J, Torres F, Jimenez MD, Lago A, Melo T. Comparison of triflusal and aspirin for prevention of vascular events in patients after cerebral infarction: the TACIP Study: a randomized, double-blind, multicenter trial. *Stroke* 2003;34:840-848.
286. Meyer BJ, Badimon JJ, Mailhac A, Fernandez-Ortiz A, Chesebro JH, Fuster V, Badimon L. Inhibition of growth of thrombus on fresh mural thrombus. Targeting optimal therapy. *Circulation* 1994;90:2432-2438.
287. Meyer BJ, Badimon JJ, Chesebro JH, Fallon JT, Fuster V, Badimon L. Dissolution of mural thrombus by specific thrombin inhibition with r-hirudin: comparison with heparin and aspirin. *Circulation* 1998;97:681-685.
288. Lassila R, Badimon JJ, Vallabhajosula S, Badimon L. Dynamic monitoring of platelet deposition on severely damaged vessel wall in flowing blood. Effects of different stenoses on thrombus growth. *Arteriosclerosis (later ATVB)* 1990;10:306-315.
289. Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1999;155:1281-1291.

290. Stemme V, Swedenborg J, Claesson H, Hansson GK. Expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic carotid arteries. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000;20:146-152.
291. Catella-Lawson F, Crofford LJ. Cyclooxygenase inhibition and thrombogenicity. *Am J Med* 2001;110 Suppl 3A:28S-32S.
292. Fitzgerald GA. Cardiovascular pharmacology of nonselective nonsteroidal anti-inflammatory drugs and coxibs: clinical considerations. *Am J Cardiol* 2002;89:26D-32D.
293. Xu XM, Sansores-Garcia L, Chen XM, Matijevic-Aleksic N, Du M, Wu KK. Suppression of inducible cyclooxygenase 2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:5292-5297.
294. Fernandez de Arriba A, Cavalcanti F, Miralles A, Bayon Y, Alonso A, Merlos M, Garcia-Rafanell J, Forn J. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression by 4-trifluoromethyl derivatives of salicylate, triflusal, and its deacetylated metabolite, 2-hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid. *Mol Pharmacol* 1999;55:753-760.
295. Murdoch D, Plosker GL. Triflusal: a review of its use in cerebral infarction and myocardial infarction, and as thromboprophylaxis in atrial fibrillation. *Drugs* 2006;66:671-692.
296. Gonzalez-Correa JA, Arrebola MM, Urena IM, Ruiz-Villafranca D, Muñoz-Marin J, Guerrero A, Sanchez de la Cuesta F, De La Cruz JP. Protective effect of triflusal and its main metabolite HTB in an in vitro model of anoxia-reoxygenation in rat brain slices: comparison with acetylsalicylic and salicylic acids. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2005;371:81-88.
297. Grosser T, Fries S, Fitzgerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of cox-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest* 2006;116:4-15.
298. Fetalvero KM, Martin KA, Hwa J. Cardioprotective prostacyclin signalling in vascular smooth muscle. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007;82:109-118.
299. Marcus AJ. Aspirin as an antithrombotic medication. *N Engl J Med* 1983;309:1515-1517.
300. Costa J, Ferro JM, Matias-Guiu J, Alvarez-Sabin J, Torres F. Triflusal for preventing serious vascular events in people at high risk. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;CD004296.
301. Chesebro J, Lam J, Badimon L, Fuster V. Restenosis after arterial angioplasty: a hemorrheologic response to injury. *Am J Cardiol* 1987;60:10B-6B.
302. Vilahur G, Segales E, Casani L, Badimon L. A novel anti-ischemic nitric oxide donor inhibits thrombosis without modifying haemodynamic parameters. *Thromb Haemost* 2004;91:1035-43.
303. Urooj Zafar M, Vilahur G, Choi BG, et al. A novel anti-ischemic nitric oxide donor (LA419) reduces thrombogenesis in healthy human subjects. *J Thromb Haemost* 2007;5:1195-200.
304. Vilahur G, Pena E, Padro T, Badimon L. Protein disulphide isomerase-mediated LA419-NO release additional antithrombotic effects to the blockade of the ADP receptor. *Thromb Haemost* 2007;97:650-7.
305. Vilahur G, Segales E, Salas E, Badimon L. Effects of a novel platelet nitric oxide donor (LA816), aspirin, clopidogrel, and combined therapy in inhibiting flow- and lesion-dependent thrombosis in the porcine ex vivo model. *Circulation* 2004;110:1686-93.
306. Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res* 2001;88:756-62.
307. Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989;83:1774-7.

308. Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1370-80.
309. Ihling C, Menzel G, Wellens E, Monting JS, Schaefer HE, Zeiher AM. Topographical association between the cyclin-dependent kinases inhibitor p21, p53 accumulation, and cellular proliferation in human atherosclerotic tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2218-24.
310. Bennett MR, Littlewood TD, Schwartz SM, weissberg PL. Increased sensitivity of human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques to p53-mediated apoptosis. *Circ Res* 1997;81:591-9.
311. Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004;73:39-85.
312. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770-6.
313. Xie K, Huang S, Wang Y, et al. Bcl-2 protects cells from cytokine-induced nitric-oxide-dependent apoptosis. *Cancer Immunol Immunother* 1996;43:109-15.
314. Rodríguez-Campos A, Ruiz-Enríquez P, Faraudo S, Badimon L. Mitogen-induced p53 downregulation precedes vascular smooth muscle cell migration from healthy tunica media and proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21:214-9.
315. Janssens S, Flaherty D, Nong Z, et al. Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats. *Circulation* 1998;97:1274-81.
316. Viñals M, Martínez-González J, Badimon JJ, Badimon L. HDL-induced prostacyclin release in smooth muscle cells is dependent on cyclooxygenase-2 (Cox-2). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:3481-3488.

PUBLICACIONES

1.- RESUMS

RESUM PRIMER ARTICLE (PRIMER OBJECTIU)

Duran X, Sánchez S, Vilahur G, Badimon L. Protective effects of triflusal on secondary thrombus growth and vascular cyclooxygenase-2. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1385-92

Trombus residuals a la caròtida predisposen a una trombosis recurrent i/o una embolització distal (p.e. una isquèmia cerebrovascular). Els objectius d'aquest estudi van ser:

- 1.- Analitzar i comparar l'eficàcia de l'aspirina, el triflusal, i el seu principal metabolit, el HTB, en el creixement de trombus secundaris.
- 2.- Avaluat de quina manera els tres inhibidors de la Cox-1 influencien en l'expressió vascular de la Cox-1 i la Cox-2, i la síntesi de prostaciclina endotelial.

Els mètodes utilitzats per desenvolupar aquests objectius i l'estudi en general es van basar en el model animal de trombosi *ex vivo* en conills. Es van quantificar els trombus que es van formar en vasos danyats en condicions de fluxe típiques d'estenosis de caròtida mitjanes i severes. Els efectes dels inhibidors de la Cox-1, administrats tots de forma intravenosa (aspirina 5 mg/kg, triflusal 10 mg/kg, i el HTB 10 mg/kg) i de forma oral (durant 8 dies; l'aspirina 30 mg/kg/dia, i el triflusal 40 mg/kg/dia) sobre el creixement del trombus secundari van ser quantificats mitjançant el mesurament de la deposició de les plaquetes marcades amb l'isotop radioactiu In⁻¹¹¹ i comparats amb els placebo-controls. L'expressió de la Cox-1 i la Cox-2 arterial després de 8 dies de tractament es va quantificar avaluant els nivells de ARNm i proteïna. A més, es va fer un assaig de dosi dependència *in vitro* dels fàrmacs sobre l'alliberació de la prostaciclina (PGI₂) endotelial, per tal d'avaluar l'activitat de l'enzim Cox-2.

Els resultats obtinguts, en aquest primer article, van mostrar que tots els inhibidors de la Cox-1 van reduir de forma similar i significativament ($p < 0.05$) la formació del trombus secundari després de l'administració oral i intravenosa dels fàrmacs respecte el placebo-control. Els tractaments utilitzats no van afectar els nivells d'expressió del ARNm de Cox-1 vascular, mentre que els nivells d'expressió del ARNm de Cox-2 vascular es van veure reduïts de forma moderada tan per l'aspirina com pel triflusal (el placebo 100±9%, l'aspirina 70±2% i el triflusal 70±2%; $p < 0.05$). Els nivells de la proteïna Cox-2 van ser una mica més alts en el triflusal que en el grup de l'aspirina, però bastant inferiors que en el placebo-control (el placebo 100±6%, l'aspirina 35±10% i el triflusal 61±9%; $p < 0.005$ respecte el placebo). De forma interessant, *in vitro*, només el HTB va permetre l'activitat de l'enzim Cox-2 permetent mantenir la síntesi i els nivells de la prostaciclina (PGI₂) endotelial de forma comparable als controls sense fàrmacs.

Per tant, després d'analitzar tots aquests resultats, podem concloure a nivells similars d'eficàcia per inhibir la trombosi secundària, el triflusal sembla ser molt millor que l'aspirina a l'hora de preservar l'expressió de la Cox-2 i que a més el metabolit del triflusal, el HTB, va ser capaç de protegir la producció de la prostaciclina (PGI₂) endotelial.

RESUM SEGON ARTICLE (SEGON OBJECTIU)

Xavier Duran, Gemma Vilahur, Lina Badimon. Exogenous in vivo NO-donor treatment preserves p53 levels and protects vascular cells from apoptosis. *Atherosclerosis* 205 (2009) 101-106

L'òxid nítric (NO) és crític en la protecció del sistema cardiovascular. Tot i això, la producció de NO es veu alterada durant l'aterosclerosi, de manera que com a resultat d'aquest fet, es dona trombosi, vasoconstricció i restenosi. Donadors exògens de NO (NOd) s'ha comprovat que proporcionen protecció contra la isquèmia i la trombosi. Tanmateix, els seus efectes sobre les cèl·lules de la paret vascular no es coneixen completament. Per tant, l'objectiu d'aquets estudi va ser determinar l'efecte dels NOd en la supervivència de les cèl·lules musculars llises (CML).

Els mètodes utilitzats per desenvolupar aquests objectius i l'estudi en general es van basar en un model animal amb porcs (N=16) els quals van ser aleatoriament distribuïts en els següents grups de tractaments:

- 1.- LA419 (nitratíol; durant 10 dies d'administració oral, 0.9 mg/kg bid).
- 2.- LA816 (nitrosotíol; 2 hores abans administració intravenosa, 6.6 nmol/(kg/min)).
- 3.- Nitroglicerina (GTN, 2 hores abans administració intravenosa, 2.5 mg/kg).
- 4.- Grup placebo-control (sense NOd).

Després del sacrifici, es va obtenir l'arc aòrtic dels porcs del qual es va congelar una part i una altra es va destinar al cultiu del teixit amb la tècnica de l'explant en unes condicions de sèrum homòleg del propi porc a un 20% del volum total, durant diferents períodes de temps (18 hores, 2 i 10 dies). Es van avaluar els nivells de mRNA de caspasa-8 (casp-8), caspasa-3 (casp-3), ciclina-D2, p53 fosforil·lada i el ràtio Bcl-2/Bax mitjançant la PCR a temps real, i també l'expressió proteica amb Western blot.

Els resultats obtinguts, en aquest segon article, van mostrar que en els primers 2 dies d'explants en cultiu procedents dels animals tractats amb NOd tenien un increment en el ràtio de supervivència Bcl-2/Bax respecte els procedents del grup placebo-control (5 vegades més en els grups amb LA816 i GTN; així com també 10 vegades més elevat el ratio en el grup del LA419 als 10 dies respecte el placebo-control; $p < 0.05$). Els nivells de p53 fosforil·lat eren clarament augmentats per tots els grups amb tractament amb NOd respecte el grup placebo-control ($p < 0.05$) i més els nivells de ARNm de p53 van mostrar que estaven incrementats en el grup placebo-control als 10 dies de cultiu, mentre que no varen patir cap tipus d'augment en els explants procedents d'animals tractats amb NOd ($p < 0.05$). La quantitat de ARNm de la ciclina-D2, casp-3 i Bax es va veure disminuïda unes 6 vegades en els explants provinents d'animals tractats amb

NOd que en els explants controls als 10 dies d'incubació ($p < 0.001$). A més, no es van detectar canvis en l'expressió de la casp-8.

Si agafem els resultats en conjunt, podem dir que aquests suggereixen que el tractament amb NO d'origen exogen in vivo sembla que preserva les CML de l'apoptosi via mitocòndria i que condueix a les cèl·lules a un estat d'arrest o quiescència a través d'augmentar l'expressió de p53.

2.-PUBLICACIONES

ORIGINAL ARTICLE

Protective effects of triflusal on secondary thrombus growth and vascular cyclooxygenase-2

X. DURAN,* S. SÁNCHEZ,* G. VILAHUR*† and L. BADIMON*†‡

*Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; †CIBEROBN-Instituto Salud Carlos III, Barcelona; and ‡Cardiovascular Research Chair, UAB, Barcelona, Spain

To cite this article: Duran X, Sánchez S, Vilahur G, Badimon L. Protective effects of triflusal on secondary thrombus growth and vascular cyclooxygenase-2. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1385–92.

Summary. *Background:* Carotid residual mural thrombus predisposes to recurrent thrombosis and/or distal embolization (i.e. cerebrovascular ischemia). *Objectives:* Our aims were (i) to analyze and compare the efficacy of aspirin, triflusal, and its main metabolite 2-hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid (HTB) on secondary thrombus growth; and (ii) evaluate to what extent the three Cox-1 inhibitors influenced vascular Cox-1/Cox-2 expression and endothelial prostacyclin synthesis. *Methods:* In a rabbit model of *ex vivo* thrombosis, a fresh mural thrombus was formed on damaged vessels at flow conditions typical of mild and severe carotid stenoses. The effects of Cox-1 inhibitors administered both intravenously (i.v.) (aspirin 5 mg kg⁻¹, triflusal 10 mg kg⁻¹, and HTB 10 mg kg⁻¹) and orally (p.o.) (8 days; aspirin 30 mg kg⁻¹ day⁻¹, and triflusal 40 mg kg⁻¹ day⁻¹) on secondary thrombus growth were assessed by In-¹¹¹deposited platelets and compared with a placebo control. Arterial Cox-1/Cox-2 expression after 8-day treatment was evaluated at mRNA and protein levels. Additionally, a drug-related dose-dependent *in vitro* assay was performed for endothelial PGI₂ release measurement (Cox-2 activity). *Results:* All Cox inhibitors similarly and significantly ($P < 0.05$) reduced secondary thrombus formation after i.v. and p.o. administration versus placebo control. Treatments exerted no effect on vascular Cox-1 mRNA whereas Cox-2 mRNA was moderately reduced by aspirin and triflusal (placebo 100% ± 9%, aspirin 70% ± 2% and triflusal 70% ± 2%; $P < 0.05$). Cox-2 protein levels were slightly higher in the triflusal versus aspirin group (placebo 100% ± 6%, aspirin 35% ± 10% and triflusal 61% ± 9%; $P < 0.005$ versus placebo). Interestingly, *in vitro*, HTB solely maintained endothelial PGI₂ synthesis levels similar to the control. *Conclusions:* At a similar level of

efficacy in inhibiting secondary thrombosis, triflusal seems to better preserve Cox-2 expression than aspirin and its metabolite HTB was able to protect endothelial prostacyclin production.

Keywords: cyclooxygenase inhibitors, prostacyclin, secondary thrombus.

Introduction

Approximately, 25% of the cerebrovascular events (CVE) derive from an atherothrombotic vessel occlusion within the carotid system which might then embolize and cause cerebral infarction. The outcome of a thrombotic event is dependent on rheological factors, derived from the hemodynamic compromise (i.e. vessel occlusion) and local risk factors. Within the latter, the degree of vascular damage at the time of plaque disruption and the presence of a residual thrombus may partly determine the thrombogenic outcome [1,2]. Indeed, the surface of the residual thrombus becomes a very thrombogenic triggering substrate as a result of fibrin bound thrombin in the original fragmented thrombus [3,4]. Therefore, antiplatelet therapy is the cornerstone for prevention of cerebral ischemia.

The efficacy of aspirin therapy in the prevention and treatment of various cerebrovascular diseases is well established and supported by a wealth of clinical data [5–8]. However, emerging data regarding the use of aspirin for primary prevention (e.g. gastrointestinal and bleeding complications) or the aspirin ‘resistance’ phenomenon restricts the efficacy of this compound in various settings [9]. Therefore, introduction of agents with efficacy at least similar to that of aspirin, yet with potentially reduced adverse events, may represent a useful addition to the therapeutic options available. In this regard, several large-scale clinical trials [10,11] and a meta-analysis [12] have assessed the comparable efficacy of triflusal (fluorinated derivative of salicylic acid) relative to aspirin in reducing ischemic cerebral events of vascular origin yet with a potentially reduced risk of treatment-related bleeding hemorrhagic complications [11].

Aspirin, depending on the dose, inhibits cyclooxygenase (Cox) isoforms 1 and 2. Cox-1 [13] mediates thromboxane A₂

Correspondence: Lina Badimon, Cardiovascular Research Center, C/Sant Antoni M^a Claret 167, 08025 Barcelona, Spain.
Tel.: +34 93 556 58 80; fax: +34 93 556 55 59.
E-mail: lbadimon@csic-iccc.org

Received 7 February 2008, accepted 13 May 2008

(TXA₂) platelet production leading to platelet aggregation and vasoconstriction. Cox-2 catalyzes endothelial prostacyclin (PGI₂) synthesis [14], which counteracts TXA₂ and triggers vasodilation and platelet inhibition and thus renders vascular protection. Triflusal and its main metabolite 2-hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid (HTB) [11,15] also inhibit the platelet Cox-1 isoform; however, *in vitro* [16] and *in vivo* [17] data have suggested that triflusal has little inhibitory effect in Cox-2 expression; thus far, the mechanisms by which this occurs is not fully understood. Moreover, in contrast to aspirin, triflusal has been shown to inhibit cyclic adenosine monophosphate (cAMP) and cyclic guanosine monophosphate (cGMP) phosphodiesterases, thus diminishing calcium-dependent platelet aggregation similarly to dipyridamole [18].

Although both Cox-1 inhibitors have proven efficacy at a clinical level and have both been shown to inhibit platelet activation, it is yet unknown whether both drugs are efficacious and equipotent in blocking the growth of pre-existing thrombus. Moreover, a better understanding of their effects on vascular Cox expression is required as it may provide new insights regarding important clinical aspects and properties of these antiplatelet agents. Thus, we firstly evaluated the effect of a pharmacological intervention targeted at the cyclooxygenase pathway to inhibit the propagation and growth of secondary thrombi. To address this issue, we have modeled *ex vivo* the cell-cell and fluid phase-protein interaction at the particular microenvironment of the ruptured plaque with a pre-existing thrombus, and evaluated secondary thrombus growth under carotid-like flow conditions in an *ex vivo* rabbit model of thrombosis. Second, we ascertained to what extent Cox-1 inhibitors, at the tested antithrombotic doses, also influenced vascular Cox expression and activity.

Materials and methods

Evaluation of the Cox-1 inhibitors on secondary thrombus formation

Animal preparation and experimental protocol Eighty-eight New Zealand White male rabbits obtained from a single local provider (body weight, 2.8 ± 1.7 kg) were kept for 5 days in the animal facility without any intervention. As shown in Fig. 1A, first we evaluated in a subgroup of animals (Rabbit-In¹¹¹, $n = 5$) the amount of primary thrombus formation by measuring In-¹¹¹ labeled platelet deposition triggered by a damaged vessel wall under flow conditions typical of mildly and severely stenotic carotid arteries using our *ex vivo* perfusion chamber as reported elsewhere [1,19–22]. Next, in order to quantitatively study the growth of arterial thrombus (i.e. secondary thrombus formation) we modified our *ex vivo* perfusion system [1,19–22] (Fig. 1B). Briefly, blood from Rabbit A (unlabeled platelets) was passed through the chamber at a flow rate of 10 mL min^{-1} for 5 min on de-endothelialized vessel and tunica media with the

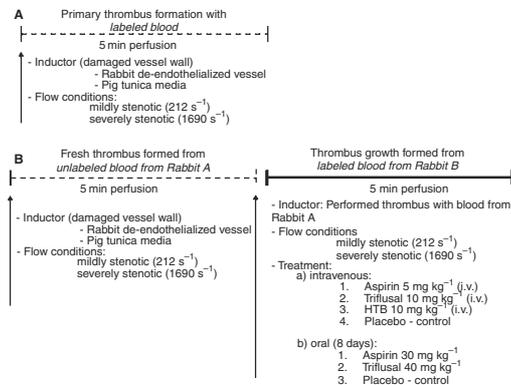


Fig. 1. Schematic representation of the perfusion studies.

intention of creating the fresh thrombus. Thereafter, blood with autologous ¹¹¹In-labeled platelets from Rabbit B (with or without drug treatment) was perfused, under identical flow conditions, to measure secondary thrombus growth onto the preformed primary thrombus (acting as the thrombogenic substrate).

Before performing the perfusion experiments, Rabbits B were randomly distributed into two types of studies. In the first study, rabbits were intravenously (i.v.) treated with (i) aspirin (lysidated acetylsalicylic acid; Synthelabo-Pharma; 5 mg kg^{-1}); (ii) triflusal (2-acetyloxy-4-trifluoromethyl-benzoic acid; Uriach; 10 mg kg^{-1}); (iii) the main triflusal metabolite HTB (2-hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid; Uriach, 10 mg kg^{-1}); or (iv) a placebo control. These i.v. doses were considered equimolar and were selected according to previous studies [23]. In the second study, rabbits were orally treated (p.o.) during 8 days with (i) aspirin ($30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$); (ii) triflusal ($40 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$); or (iii) a placebo control. We performed dose-related finding studies in order to detect the minimal oral dose required to exert significant antiplatelet effects. Thus, we evaluated the antithrombotic potential of 10, 20 and $30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ aspirin and 15, 30, $40 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ triflusal. We observed that $30 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ aspirin and $40 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}^{-1}$ triflusal were able to inhibit secondary thrombus formation (data not included).

All procedures performed in this study followed the American Heart Association guidelines for animal research.

Platelet labeling and *ex vivo* perfusion experiments The day before the experiments, blood was drawn from the rabbits via the ear central artery to perform platelet labeling with ¹¹¹In-oxine as described previously [1].

Twenty-four hours after labeling, animals were anesthetized [intramuscularly (i.m.) ketamine 35 mg kg^{-1} and xylazine 5 mg kg^{-1}] and the jugular vein and the contra-lateral carotid artery were catheterized (Fig. 2). Animals were heparinized with an i.v. bolus of 30 U kg^{-1} heparin (Liquemine; Roche, Barcelona, Spain) and activated partial thromboplastin time

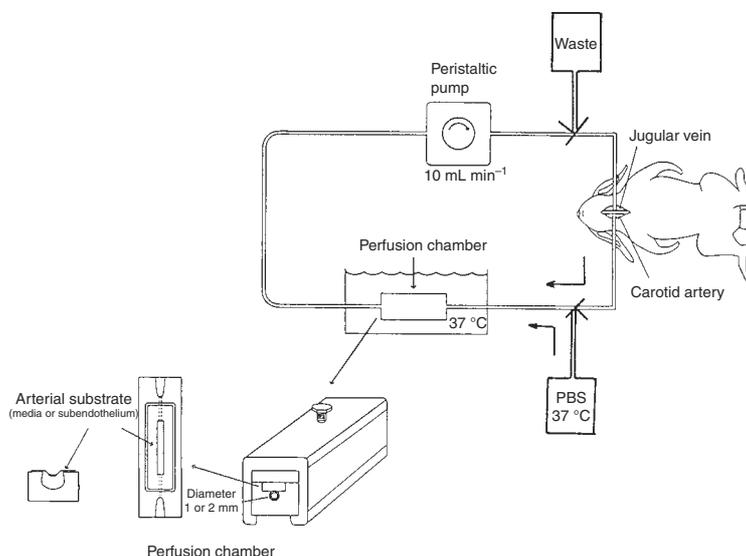


Fig. 2. Representation of the extracorporeal perfusion system.

(aPTT) levels of 1.88 ± 0.06 were maintained throughout the experiment. An arterio-venous shunt was established with the aid of a peristaltic pump (Master-flex, Model 7518-10) at a fixed rate of 10 mL min^{-1} . Vessel wall segments were mounted in the chamber and experimental perfusions were performed. Radioactivity in each vessel segment was measured as counts per minute with a gamma-well counter (Wizard 1470; Wallac, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) and transformed in platelet number per surface unit, as previously described [1]. In the present study, we used two types of chambers with an internal diameter of 0.2 and 0.1 cm modeling local flow conditions typical of mildly and severely stenotic carotid arteries (shear rates of 212 and 1690 s^{-1} , respectively). Rabbit subendothelium and pig tunica media were used as models of wall damage (i.e. the triggering surfaces for primary thrombus formation).

Thrombus triggering substrates Aortas from rabbits and pigs were obtained fresh from a slaughterhouse, immediately cleaned of adventitia and frozen at $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ until needed. Before the experiments, the aortas were thawed in phosphate-buffered saline (PBS), opened longitudinally and cut into $30 \times 10 \text{ mm}$ segments. De-endothelialized rabbit vessels (i.e. subendothelium) were used for modeling mildly damaged vessels whereas porcine tunica media was used for modeling severely damaged vessels. Tunica media exposure requires removing the intima with a thin portion of the subjacent media as previously described [1,2]. Thus, owing to the vessel-related difficulties in the intima removal in rabbit aortas (i.e. thin vessel layers) we used pig aortas for tunica media obtention.

Laboratory measurements After each perfusion, blood samples were collected and evaluated for platelet and red blood cell (RBC) count, hematocrit, fibrinogen levels, prothrombin time (PT), aPTT, and indium lysis.

Effect of the different Cox-1 inhibitors on systemic vascular Cox expression and endothelial Cox-2 activity

Vascular Cox protein and gene expression analysis Immediately after being killed, aortas from orally treated rabbits (i.e. aspirin and triflusal) were collected, cleaned and frozen in liquid nitrogen. Aortic vessel wall RNA and protein were obtained using the Tripure method (Boehringer Mannheim, Barcelona, Spain) and immediately processed for reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blotting to detect Cox-1 and Cox-2 mRNA and protein levels, respectively.

RT-PCR analysis: Next, $1 \mu\text{g}$ of RNA was reverse transcribed in a $20\text{-}\mu\text{L}$ reaction mixture ($0.02 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ oligo-dT, 1 mM dNTPs, 20 mM DTT, 200U SuperScript II Reverse Transcriptase, 50 mM Tris-HCl pH 8.3, 75 mM KCl and 3 mM MgCl_2). Reaction was performed at $42 \text{ }^\circ\text{C}$ for 55 min and was stopped by heating at $75 \text{ }^\circ\text{C}$ for 15 min, RNA residues were degraded by RNase (1U) at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 20 min. Cox-1/Cox2 primers were as follows: 5'-TCAATGCCACCTTCATCCGG-3' (sense) and 5'-ATCCAGCACCTGGTACTTGA-3' (antisense) for Cox-1 (466bp); 5'-TCAGCCACGAGCAAATCCT-3' (sense) and 5'-GTGATCTGGATGTCAGCACG-3' (antisense) for Cox-2 (282 bp); and 5'-GTCACCAGGGCTGCTTTTAA-3' (sense) and 5'-ACGGAAGCCATGCCAGTGA-3' (antisense) for GAPDH (652 bp). Amplification was

carried out by 30 (Cox-2 and GAPDH) or 35 (Cox-1) cycles of 95 °C 45 s, 56 °C 45 s and 72 °C 1 min and 30 s, followed by a final extension of 72 °C for 2 min. PCR products were resolved by electrophoresis in 2% agarose gels with etidium bromure.

Western Blot analysis: Protein analysis was performed according to standard procedures [mini-PROTEAN II Dual Slab Cell (Bio Rad, Hercules, CA, USA)]. Blots were incubated with monoclonal antibodies against Cox-2 (Oxford Biomedical, Oxford, MI, USA) and Cox-1 (Cayman, Ann Arbor, MI, USA) and the signal was detected with Super Signal (Pierce, USA). Positive controls for Cox-1 and Cox-2 detection (Cayman) were run with the samples.

Measurement of endothelial Cox-2 activity

Cell culture: Porcine aortic endothelial cells (PAEC) primary cultures were prepared from fresh pig aortas by a modification of the collagenase method as described previously [24]. Thereafter, PAECs were seeded in pretreated gelatine (1%) plates and incubated at 37 °C in a humidified atmosphere 5% CO₂. PAEC grew in a monolayer in medium M199 (Gibco Laboratories) supplemented with 5% fetal calf serum (FCS), 2 mmol L⁻¹ L-glutamine, 100 U mL⁻¹ penicillin G, and 100 µg mL⁻¹ streptomycin. Cell viability was determined by trypan blue exclusion and PAECs were counted in the Neubauer Chamber. PAECs were studied at passage 3–4.

Cellular treatment and PGI₂ determinations: Near-confluent PAECs were placed in serum-free media for 24 h to remove the effects of serum. Subsequently, cells were incubated for 30 min with M199 media in the absence or the presence of increasing concentrations (37.5, 75, 300 µmol L⁻¹) of aspirin, triflusal and HTB. Then, Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA; Sigma-Aldrich, Madrid, Spain; 100 nmol L⁻¹) was added to all plates except for the negative control and maintained for 4, 12, and 24 h. After these different incubation periods, the media was aspirated and kept at -80 °C until the time of assay for PGI₂. Conversely, PAECs were processed for protein and mRNA obtention according to the Tripure method.

Release of endothelial PGI₂ was measured as 6-keto-prostaglandin F1 α (6-keto-PGF1 α ; its stable hydrolysis product), by radioimmunoassay according to the manufacturer's instructions (Cayman Chemical Co.).

RT-PCR and immunoblot analysis: mRNA was analyzed by real-time PCR 7000 (ABI PRISM, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) as previously described in our laboratory [25]. TaqMan fluorescent real-time PCR primers and probes (6-FAM-MGB) for pig Cox-2 detection were designed by use of Primer Express software (Applied Biosystems) and were as follows: Cox-2 pig probe (5'-ATGCCATGGAGCTGTATCCTGCCCTT-3'- MGB) (250 nm), Cox-2 pig forward primer (5'-TTAGAAGCGTCTATGGTGACATT-3') (300 nm) and Cox-2 pig reverse primer (5'-TCTGGGCGAGGCTTTTCTAC-3') (300 nm). The threshold cycle (Ct) values were determined and normalized to the housekeeping gene 18S rRNA. Western blot analysis was performed as mentioned above. Blots were incubated with monoclonal antibodies against Cox-2 (Oxford Biomedical).

Statistical analysis

Statistical comparison of data was carried out using STATVIEW II (Abacus Concepts Inc., Cary, NC, USA). Between-group analysis was made using one-way ANOVA, followed by Fisher PLSD test to assess specific group differences. All values are presented as mean \pm SEM and $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Effect of the Cox inhibitors on thrombus progression

Primary thrombus formation: a highly thrombogenic substrate Before evaluating the effects of the different Cox-1 inhibitors on secondary thrombus formation, we sought to assess in this rabbit model of *ex vivo* thrombosis, the thrombogenicity of a preformed thrombus. For this purpose, labeled blood from Rabbits-In¹¹¹ ($n = 5$) was directly perfused for 5 min at both 212 and 1690 s⁻¹ over subendothelium and tunica media. At 212 s⁻¹, a mean of 11.6 \pm 3.7 and 29.8 \pm 6.8 $\times 10^6$ platelets cm⁻² were deposited on subendothelium and tunica media, respectively, whereas at 1690 s⁻¹ subendothelium and tunica media induced a mural thrombus of about 157.6 \pm 25.4 and 563.9 \pm 22.7 $\times 10^6$ platelets cm⁻², respectively (Fig. 3A). Then, in order to evaluate the thrombogenicity of the resulting primary thrombus, unlabeled blood from Rabbit-A was perfused over both vascular substrates for 5 min under the same flow conditions. Immediately after, this unlabeled freshly formed thrombus was perfused with blood from Rabbit-B with ¹¹¹In-labeled platelets for additional 5 min. The amount of platelets deposited on the preformed thrombus was 23.1 \pm 3.8 and 63.8 \pm 7.1 $\times 10^6$ platelets cm⁻² at 212 s⁻¹ and 172 \pm 43 and 515 \pm 104 $\times 10^6$ platelets cm⁻² at 1690 s⁻¹ on subendothelium and tunica media, respectively. In summary, exposure of a preformed thrombus to flowing blood at 212 s⁻¹ increased by 2-fold the total amount of deposited platelets when compared with platelet-free vascular substrates ($P < 0.05$) while at 1690 s⁻¹ the primary thrombus exhibited similar thrombogenicity than the triggering substrate ($P = NS$).

Effect of acute treatment with aspirin, triflusal and HTB on thrombus progression Cox-1 inhibitors (aspirin, triflusal, and its active metabolite HTB) similarly and significantly ($P < 0.01$) reduced platelet deposition on a fresh primary thrombus triggered by both substrates (subendothelium and tunica media) at shear rates typical of mildly stenotic vessels (Fig. 3B–C). Thus, platelet deposition on subendothelium-induced primary thrombus was reduced by about 68% by aspirin ($n = 6$) and by about 66% by both triflusal and HTB ($n = 4$ and $n = 5$; respectively) when compared with placebo-control animals ($n = 11$) (Fig. 3B). Similarly, platelet deposition on a fresh thrombus formed over tunica media (Fig. 3C) was reduced by around 62%, 48% and 66% using aspirin ($n = 6$), triflusal ($n = 7$) and HTB ($n = 3$)-treated

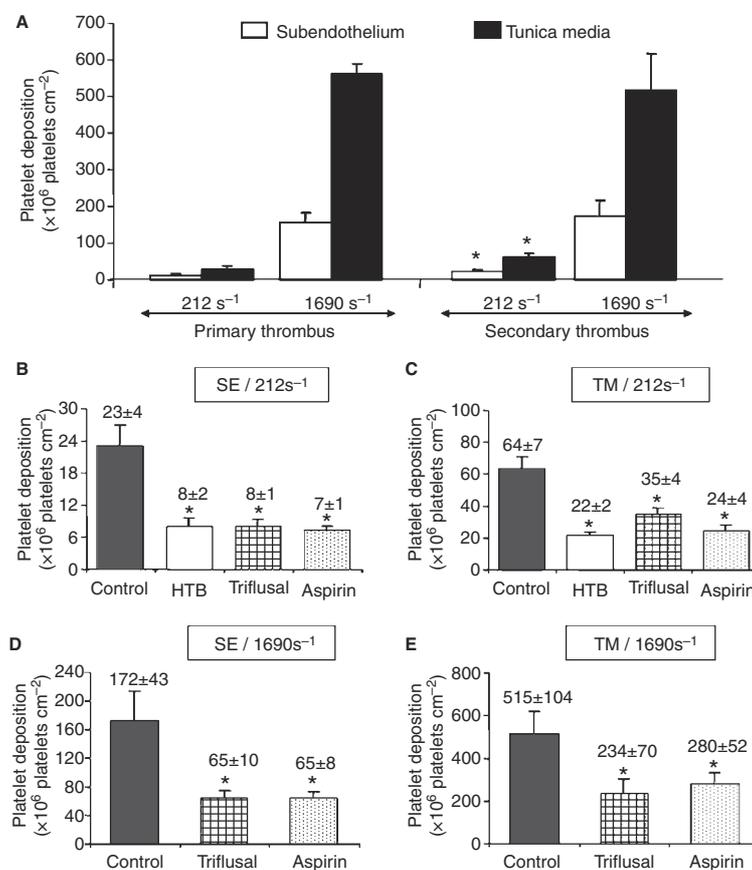


Fig. 3. Bar graph showing the model of growth of thrombus (A). Effect of acute treatment with aspirin, triflusal and 2-hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid (HTB) (B and C) and chronic treatment with aspirin and triflusal (D and E) on secondary thrombosis. SE = subendothelium or de-endothelialized vessel; TM = tunica media. Results are expressed as mean \pm SEM of platelet deposition $\times 10^6$ cm⁻². * $P < 0.05$ vs. placebo-control.

animals, respectively, compared with placebo-control animals ($n = 8$; $P < 0.001$).

Effect of chronic treatment with aspirin and triflusal on thrombus progression Platelet deposition on preformed thrombi induced by de-endothelialized vessels and tunica media at 1690 s⁻¹ (i.e. high stenotic conditions) was evaluated in rabbits treated during 8 days p.o. with aspirin ($n = 12$), triflusal ($n = 9$) and placebo control ($n = 12$). Both aspirin and triflusal similarly reduced platelet deposition on a primary thrombus triggered by subendothelium (Fig. 3D) and tunica media (Fig. 3E) when compared with non-treated animals (63% and 53% reduction, respectively).

Laboratory data Platelet and RBC count, hematocrit, fibrinogen levels, PT and aPTT were assessed in all groups, at baseline and after treatment. These determination values did not differ between treatment groups (data not shown).

Effects of in vivo treatment with Cox inhibitors on the vascular wall expression of Cox-1 and Cox-2 and on endothelial Cox-2 activity

Effect of oral treatment with aspirin and triflusal on vascular Cox expression We evaluated whether treatment with Cox-inhibitors, addressed to thrombus inhibition, could impair the vascular wall eicosaenoid synthesis. Therefore, the effect of oral treatment with aspirin or triflusal on arterial wall Cox expression was evaluated. Vascular Cox-1 mRNA levels were not significantly modified by the treatments (Fig. 4) whereas Cox-2 mRNA levels (expressed as Cox-2/GAPDH ratio) were significantly reduced by both aspirin ($n = 6$) and triflusal ($n = 5$) when compared with placebo-control ($n = 6$) animals ($P < 0.05$) (Fig. 5A). Regarding the effect of treatment on protein Cox-2 expression (Fig. 5B) both compounds significantly reduced Cox-2 protein levels with regards to the placebo group. However, aspirin-treated animals showed a

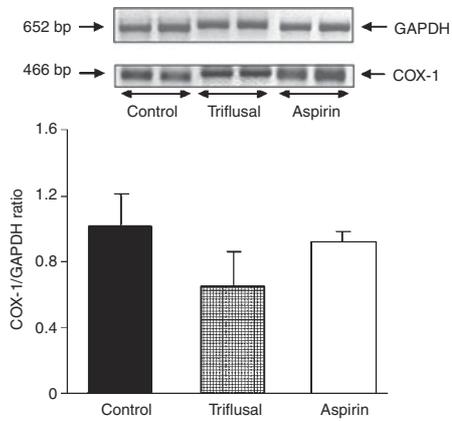


Fig. 4. Effect of chronic treatment with aspirin and triflusal on Cox-1 mRNA expression in the aortic vascular wall.

65% decrease while triflusal-treated animals showed a better preservation of Cox-2 with only a 39% reduction ($P = \text{NS}$).

Effect of aspirin, triflusal and HTB on endothelial Cox-2 activity Figure 6 depicts the effect of the different treatments on Cox-2 activity as determined by 6-keto-PGF1 α production in PAEC cells previously stimulated with PMA. In contrast to aspirin, the main triflusal metabolite, HTB, preserved 6-keto-PGF1 α synthesis without a significant decline for up to 24 h even at the higher concentration. Interestingly, all treated cells showed similar abundance of Cox-2 protein and mRNA expression levels ($P = \text{NS}$; data not shown).

Discussion

In the present study, we have demonstrated that treatment with aspirin and triflusal, and its main metabolite HTB, are equally effective in reducing thrombus progression triggered by a residual thrombus under flow conditions typical of mildly and severely stenotic carotid arteries. Results reported here also provide evidence that chronic treatment with aspirin and triflusal at the tested antithrombotic doses reduce to a different extent physiological vascular Cox-2 expression whereas Cox-1 remains unaffected. Moreover, the main triflusal metabolite, HTB, seems to preserve endothelial Cox-2 activity thus allowing prostacyclin synthesis.

Atherothrombotic carotid disease is a major cause of ischemic stroke in Western countries [26]. Indeed, thrombus embolization from the surface of a carotid atherosclerotic plaque or from a residual mural thrombus to cerebral vessels can result in occlusion and subsequent cerebral ischemia. Aspirin, triflusal and its deacetylated metabolite HTB mainly block platelet Cox-1 preventing the formation of the aggregating and vasoconstrictor TXA₂ in platelets. The antithrombotic effect of triflusal has been previously reported in several clinical trials which have shown that triflusal is as efficient as aspirin in preventing cerebrovascular events, yet with a potentially

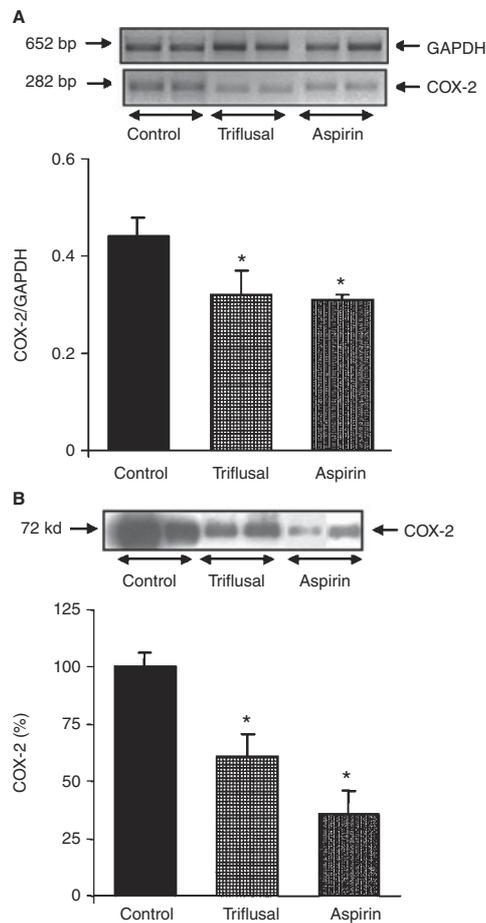


Fig. 5. Effect of chronic treatment with aspirin and triflusal on Cox-2 mRNA (A) and protein (B) expression in the aortic vascular wall. Results are expressed as the mean \pm SEM of Cox-2/GAPDH ratio (mRNA) and percentage (protein). * $P < 0.05$ vs. placebo-control.

reduced risk of treatment-related bleeding complications [11]. However, although both Cox inhibitors have proven efficacy at a clinical level and have been shown to reduce platelet activity, it remains to be elucidated whether both compounds were efficacious and equipotent in blocking the growth of a pre-existing thrombus. We have demonstrated in our previously validated *ex vivo* model of thrombosis [21], that triflusal and aspirin equally prevent thrombus progression triggered by a residual thrombus further indicating that besides thrombin [20,21], TXA₂ may also contribute to thrombus growth and a further ischemic event [3,4].

Several studies have shown that Cox-2 is almost undetectable in non-stimulated cells or tissues [27] while is highly induced in pathophysiological inflammatory processes (i.e. atherosclerotic lesions) [28,29]. However, in line with previous studies, the current study supports the importance of Cox-2 in

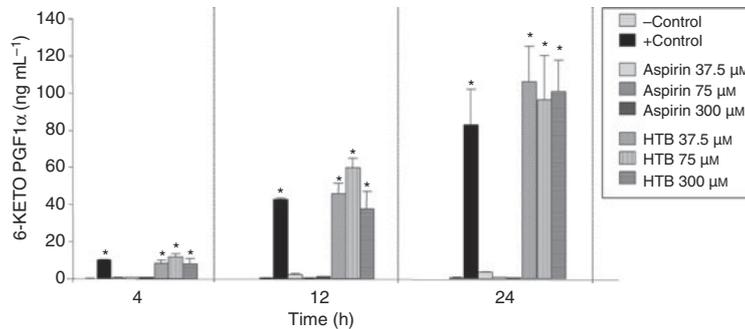


Fig. 6. Measurements of 6-keto-PGF 1α released from porcine aortic endothelial cells (PAEC) cells previously stimulated with Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA) and incubated for 4, 12, and 24 h with aspirin or HTB. * $P < 0.05$ vs. (-) control and aspirin.

normal physiologic conditions [27,30]. Moreover, within this context and to the best of our knowledge, we have demonstrated for the first time the ability of platelet Cox-1 inhibitors to modulate vascular Cox-2 expression in healthy and non-hypercholesterolemic animals concurrently with no changes in vascular Cox-1. Definitely, most of the studies showing a decrease in Cox-2 using several non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) have been performed in cells or tissues with previous Cox-2 induction [31,32].

Regarding the effect of oral treatment with aspirin and triflusal on systemic vascular Cox-2 expression, residual Cox-2 protein was much higher in the triflusal group than in the aspirin group, suggesting a better preservation of this enzyme by triflusal. Therefore, provided that oral triflusal administration seemed to be associated with a lower suppression of the Cox-2 enzyme, we wondered to what extent this latter effect influenced Cox-2 activity (PGI $_2$ synthesis) and if such an influence was mediated by triflusal through its main metabolite HTB. Interestingly, we observed that HTB preserved Cox-2 and PGI $_2$ synthesis in endothelial cells. This is in contrast to what was observed with aspirin. In fact, triflusal is rapidly converted to its principal metabolite and hence has a short half life of around 30 min whereas HTB lasts for at least 48 h [33]. The findings reported herein may help to better decipher the *in vivo* role of HTB. Indeed, HTB participates in the *in vivo*-related effects of triflusal treatment inducing preservation of Cox-2 and subsequent prostacyclin synthesis. Recently, HTB has been shown to play an important anti-inflammatory role in the neuroprotective effect of triflusal [18]. In view of these findings and taking into account that, unlike salicylic acid (aspirin's main metabolite), HTB retains antiplatelet activities, triflusal holds great promise as an attractive alternative to aspirin in patients for whom aspirin is contraindicated owing to intolerance or hypersensitivity.

Vascular Cox-2 isoforms contribute significantly to systemic PGI $_2$ synthesis and hence play an important vasculoprotective role; an effect that has been increasingly appreciated in recent years in light of the adverse effects of selective Cox-2 inhibitors in clinical trials [34]. Furthermore, many animal research studies have underlined the importance of prostacyclin not only in

thrombotic homeostasis [35] as a compensatory response to increase TXA $_2$, but also in preventing atherosclerosis progression, hypertension, intimal hyperplasia and restenosis [36]. Indeed, simultaneous inhibition of TXA $_2$ and PGI $_2$ synthesis may be one of the reasons for the disappointing results of clinical trials and discussion of 'low' versus 'high' doses of aspirin [37].

In summary, the results of this study show that aspirin, triflusal and its metabolite, HTB, have an inhibitory effect on platelet deposition during growth of mural thrombosis triggered by both de-endothelialized and severely damaged vessel wall. Hence, our results demonstrate that, although the growth of thrombus on a vascular surface covered with fresh thrombus is primarily thrombin mediated, it can be inhibited by platelet Cox-1 inhibitors used in an adequate dose. In addition, although aspirin and triflusal moderately inhibit Cox-2 mRNA and protein levels in vascular wall, triflusal better preserves Cox-2 protein expression. Moreover, Cox-2 enzyme activity in endothelial cells is preserved by the main triflusal metabolite, HTB. This vascular prostacyclin protection may help to partly explain the findings obtained in a recent large meta-analysis of five studies where triflusal treatment had better results than aspirin in the prevention of fatal ischemic stroke [12].

Acknowledgements

G. Vilahur is a Juan de la Cierva investigator of MEyC (Spain) and G. Vilahur and L. Badimon are members of CIBEROBN-Institute Carlos III and are funded by PNS 2006-10091 from MEC, Spain. This work was supported in part by Uriach, Fundació de Investigació Catalana Occidente, CIBEROBN 03/06, and SAF 2006/10091.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

References

- 1 Badimon L, Badimon JJ, Turitto VT, Vallabhajosula S, Fuster V. Platelet thrombus formation on collagen type I. A model of deep vessel

- injury. Influence of blood rheology, von Willebrand factor, and blood coagulation. *Circulation* 1988; **78**: 1431–42.
- 2 Badimon L, Badimon JJ. Mechanisms of arterial thrombosis in non-parallel streamlines: platelet thrombi grow on the apex of stenotic severely injured vessel wall. Experimental study in the pig model. *J Clin Invest* 1989; **84**: 1134–44.
 - 3 Lassila R, Badimon JJ, Vallabhajosula S, Badimon L. Dynamic monitoring of platelet deposition on severely damaged vessel wall in flowing blood. Effects of different stenoses on thrombus growth. *Arteriosclerosis* 1990; **10**: 306–15.
 - 4 Weitz JI, Hudoba M, Massel D, Maraganore J, Hirsh J. Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors. *J Clin Invest* 1990; **86**: 385–91.
 - 5 Weinberger J. Adverse effects and drug interactions of antithrombotic agents used in prevention of ischaemic stroke. *Drugs* 2005; **65**: 461–71.
 - 6 Albers GW, Amarenco P, Easton JD, Sacco RL, Teal P. Antithrombotic and thrombolytic therapy for ischemic stroke: the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest* 2004; **3**(Suppl.): 483S–512S.
 - 7 ISIS-2 (Second International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17,187 cases of suspected acute myocardial infarction: ISIS-2. *Lancet* 1988; **2**: 349–60.
 - 8 The Stroke Prevention in Reversible Ischemia Trial (SPIRIT) Study Group. A randomized trial of anticoagulants versus aspirin after cerebral ischemia of presumed arterial origin. *Ann Neurol* 1997; **42**: 857–65.
 - 9 Diener HC, Bogousslavsky J, Brass LM, Cimminiello C, Csiba L, Kaste M, Leys D, Matias-Guiu J, Rupprecht HJ. Aspirin and clopidogrel compared with clopidogrel alone after recent ischaemic stroke or transient ischaemic attack in high-risk patients (MATCH): randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2004; **364**: 331–7.
 - 10 Culebras A, Rotta-Escalante R, Vila J, Dominguez R, Abiusi G, Famulari A, Rey R, Bauso-Tosselli L, Gori H, Ferrari J, Reich E. Triflusal vs aspirin for prevention of cerebral infarction: a randomized stroke study. *Neurology* 2004; **62**: 1073–80.
 - 11 Matias-Guiu J, Ferro JM, Alvarez-Sabin J, Torres F, Jimenez MD, Lago A, Melo T. Comparison of triflusal and aspirin for prevention of vascular events in patients after cerebral infarction: the TACIP Study: a randomized, double-blind, multicenter trial. *Stroke* 2003; **34**: 840–8.
 - 12 Costa J, Ferro JM, Matias-Guiu J, Alvarez-Sabin J, Torres F. Triflusal for preventing serious vascular events in people at high risk. *Cochrane Database Syst Rev* 2005; CD004296.
 - 13 Weiss HJ, Aledort LM. Impaired platelet-connective-tissue reaction in man after aspirin ingestion. *Lancet* 1967; **2**: 495–7.
 - 14 McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA. Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 272–7.
 - 15 McNeely W, Goa KL. Triflusal. *Drugs* 1998; **55**: 823–33; discussion 834–825.
 - 16 Cruz-Fernandez J. Antiplatelet drugs in the treatment of acute coronary syndromes: focus on cyclooxygenase inhibitors. *Eur Heart J Suppl* 2001; **3**(Suppl. 1): I23–30.
 - 17 De la Cruz JP, Pavia J, Garcia-Arnes J, Sanchez de la Cuesta F. Effects of triflusal and acetylsalicylic acid on platelet aggregation in whole blood of diabetic patients. *Eur J Haematol* 1988; **40**: 232–6.
 - 18 Gonzalez-Correa JA, Arrebola MM, Urena IM, Ruiz-Villafranca D, Munoz-Marin J, Guerrero A, Sanchez de la Cuesta F, De La Cruz JP. Protective effect of triflusal and its main metabolite HTB in an in vitro model of anoxia-reoxygenation in rat brain slices: comparison with acetylsalicylic and salicylic acids. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2005; **371**: 81–8.
 - 19 Badimon L, Turitto V, Rosemark JA, Badimon JJ, Fuster V. Characterization of a tubular flow chamber for studying platelet interaction with biologic and prosthetic materials: deposition of indium 111-labeled platelets on collagen, subendothelium, and expanded polytetrafluoroethylene. *J Lab Clin Med* 1987; **110**: 706–18.
 - 20 Meyer BJ, Badimon JJ, Mailhac A, Fernandez-Ortiz A, Chesebro JH, Fuster V, Badimon L. Inhibition of growth of thrombus on fresh mural thrombus. Targeting optimal therapy. *Circulation* 1994; **90**: 2432–8.
 - 21 Meyer BJ, Badimon JJ, Chesebro JH, Fallon JT, Fuster V, Badimon L. Dissolution of mural thrombus by specific thrombin inhibition with r-hirudin: comparison with heparin and aspirin. *Circulation* 1998; **97**: 681–5.
 - 22 Badimon JJ, Lettino M, Toschi V, Fuster V, Berrozpe M, Chesebro JH, Badimon L. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques: effects of tissue factor pathway inhibitor on plaque thrombogenicity under flow conditions. *Circulation* 1999; **99**: 1780–7.
 - 23 Garcia Rafanell J, Forn J. Intravenous arachidonate-induced respiratory distress: comparative study of three in vivo models for the measurement of antithrombotic activity. *J Pharmacol Methods* 1982; **7**: 231–8.
 - 24 Rodriguez C, Alcludia JF, Martinez-Gonzalez J, Raposo B, Navarro MA, Badimon L. Lysyl oxidase (LOX) down-regulation by TNFalpha: a new mechanism underlying TNFalpha-induced endothelial dysfunction. *Atherosclerosis* 2008; **196**: 558–64.
 - 25 Llorente-Cortes V, Otero-Vinas M, Sanchez S, Rodriguez C, Badimon L. Low-density lipoprotein upregulates low-density lipoprotein receptor-related protein expression in vascular smooth muscle cells: possible involvement of sterol regulatory element binding protein-2-dependent mechanism. *Circulation* 2002; **106**: 3104–10.
 - 26 Rosamond W, Flegal K, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Hailpern SM, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell C, Roger V, Sorlie P, Steinberger J et al. Heart disease and stroke statistics–2008 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2008; **117**: e25–146.
 - 27 Catella-Lawson F, Crofford LJ. Cyclooxygenase inhibition and thrombogenicity. *Am J Med* 2001; **110**(Suppl 3A): 28S–32S.
 - 28 Schonbeck U, Sukhova GK, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1999; **155**: 1281–91.
 - 29 Stemme V, Swedenborg J, Claesson H, Hansson GK. Expression of cyclo-oxygenase-2 in human atherosclerotic carotid arteries. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000; **20**: 146–52.
 - 30 FitzGerald GA. Cardiovascular pharmacology of nonselective non-steroidal anti-inflammatory drugs and coxibs: clinical considerations. *Am J Cardiol* 2002; **89**: 26D–32D.
 - 31 Xu XM, Sansores-Garcia L, Chen XM, Matijevic-Aleksic N, Du M, Wu KK. Suppression of inducible cyclooxygenase 2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 5292–7.
 - 32 Fernandez de Arriba A, Cavalcanti F, Miralles A, Bayon Y, Alonso A, Merlos M, Garcia-Rafanell J, Forn J. Inhibition of cyclooxygenase-2 expression by 4-trifluoromethyl derivatives of salicylate, triflusal, and its deacetylated metabolite, 2-hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid. *Mol Pharmacol* 1999; **55**: 753–60.
 - 33 Murdoch D, Plosker GL. Triflusal: a review of its use in cerebral infarction and myocardial infarction, and as thromboprophylaxis in atrial fibrillation. *Drugs* 2006; **66**: 671–92.
 - 34 Grosser T, Fries S, FitzGerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest* 2006; **116**: 4–15.
 - 35 Cheng Y, Austin SC, Rocca B, Koller BH, Coffman TM, Grosser T, Lawson JA, FitzGerald GA. Role of prostacyclin in the cardiovascular response to thromboxane A2. *Science* 2002; **296**: 539–41.
 - 36 Fetalvero KM, Martin KA, Hwa J. Cardioprotective prostacyclin signaling in vascular smooth muscle. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2007; **82**: 109–18.
 - 37 Marcus AJ. Aspirin as an antithrombotic medication. *N Engl J Med* 1983; **309**: 1515–7.



Exogenous in vivo NO-donor treatment preserves p53 levels and protects vascular cells from apoptosis

Xavier Duran^{a,1}, Gemma Vilahur^{a,b,1}, Lina Badimon^{a,b,c,*}

^a Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Barcelona, Spain

^b CIBEROBN CB06/03, Instituto de Salud Carlos III, Spain

^c Càtedra Investigació Cardiovascular (UAB), Catalana-Occidente, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 October 2007

Received in revised form 27 August 2008

Accepted 18 November 2008

Available online 25 November 2008

Keywords:

Nitric oxide donors

Apoptosis

Vascular smooth muscle cells

ABSTRACT

Objective: Nitric oxide (NO) is critical in cardiovascular protection. However, NO production is impaired in atherosclerosis resulting in thrombosis, vasoconstriction, and restenosis. Exogenous NO-donors (NOD) have proven protection against ischemia and thrombosis. However, their effect on vascular cell function remains unknown. Our objective was to determine the effect of NOD on vascular smooth muscle cell (VSMC) survival.

Methods: Pigs ($N=16$) were randomly distributed in the following treatment groups: (I) LA419 (nitratethiol; 10-day p.o. 0.9 mg/kg bid); (II) LA816 (nitrosothiol; 2 h i.v. infusion, 6.6 nmol/(kg min)); (III) nitroglycerine (GTN, 2 h i.v. infusion, 2.5 mg/kg); and (IV) placebo-control. After sacrifice, pig aortic arch explants were either frozen or incubated with 20% homologous pig serum for different time periods (18 h, 2 and 10 days). Bcl2/bax ratio, phosphorylated-p53, cyclin-D2, casp-3, casp-8, and bax mRNA levels and protein expression were evaluated by real-time PCR and western blot, respectively.

Results: Within the first 2 days explants from NOD-treated animals had an increased pro-survival Bcl2/bax ratio compared with placebo-control ($5\times$ higher in LA816 and GTN i.v.-treated animals and $10\times$ higher in 10-day orally treated LA419 animals; $P<0.05$). Phosphorylated-P53-protein levels were consistently increased by all NOD-treatments vs. placebo-control ($P<0.05$) and p53 mRNA levels showed an increase in placebo-controls at day 10 while they did not rise in NOD-treated animals ($P<0.05$). Cyclin-D2, casp-3, and bax mRNA content were $6\times$ lower in NOD-treated animals than in control explants at day-10 ($P<0.001$). No changes were detected on caspase-8.

Conclusions: Taken together, our findings suggest that exogenous in vivo NO treatment seems to preserve VSMC from mitochondrial-dependent apoptosis and drive cells to quiescence through p53 increase.

© 2008 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs) from the tunica media into the intima and subsequent proliferation (i.e., intimal hyperplasia) are important components of the pathogenesis of atherosclerosis and a principal underlying cause of restenosis after angioplasty and arteriovenous bypass grafts [1,2]. VSMC migration and proliferation mainly derives from a complex interaction of multiple growth factors (e.g., mitogenic factors), an imbalance of cell-cycle regulator molecules (e.g., the tumor suppressor protein p53 and the Bcl2 family genes) [3] and a reduction in nitric

oxide (NO) synthesis [4]. In fact, our group has previously described [5] that p53 maintains VSMC quiescence in the healthy vascular wall whereas exposure to serum-related mitogens (i.e., fetal calf serum), induces a time-dependent suppression of p53 and subsequent VSMC migration. Conversely, and depending on the nature and intensity of the stimuli and the cellular context, expression of p53 may lead to growth arrest (i.e., quiescence), adaptation, or apoptosis [6]. Indeed, activated p53, through its downstream effectors (e.g., cyclins) may regulate cell cycle G1/S transition leading cells to quiescence. P53 activation may also enhance bax expression (a pro-apoptotic Bcl2 homologous protein) committing cells to death through caspase-dependent and independent pathways [7].

Vascular injury and atherosclerosis are associated with NO-impairment. NO is a key molecule in terms of cardiovascular protection since inhibits platelet aggregation, the synthesis of extracellular matrix, leukocyte interaction with the vessel wall, and promotes vasodilation [8]. Moreover, in the past years several

* Corresponding author at: Cardiovascular Research Center, C/Sant Antoni M^a Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. Tel.: +34 93 556 59 00; fax: +34 93 556 55 59.

E-mail addresses: lbadimon@csic-iccc.santpau.es, lbadimon@csic-iccc.org

(L. Badimon).

¹ Both authors have equally contributed to the work.

studies in cultured VSMCs exogenously supplied with NO have been conducted in order to ascertain NO's role in cell proliferation [9]. On one hand, physiological NO concentrations have been proposed to promote cell cycle arrest through p53 activation and accumulation [10,11]. On the other hand, high cytotoxic NO levels have shown to switch from NO-mediated proliferative arrest to NO-mediated apoptotic cell death [8,12]. Nevertheless, reduction in NO production, already detected on the primary disease step of endothelial dysfunction or after vessel mechanical injury promotes VSMC proliferation [13].

In summary, previous *in vitro* studies have suggested that atherosclerotic VSMC outgrowth partly results from mitogen-related p53 down-regulation [5] and/or the absence of cell-growth inhibitory mediators such as NO. However, the modulatory effects of *in vivo* NO administration on VSMCs remains to be elucidated. Hence, we conducted this study in order to examine the effect of *in vivo* donation of different NO releasing compounds on explanted VSMC survival in culture in the context of our overall interest to better characterize NO-donor biological effects. In fact, due to the clinical implications of the decrease of NO bioavailability, there is great interest in developing NO-donor compounds able to restore physiological NO levels and subsequently re-establish NO-related cardiovascular protective roles.

2. Materials and methods

2.1. Animals and drug administration

Pigs ($N = 16$; ≈ 36 kg) were housed for 1 week before any experimental procedure. In order to evaluate the effect of both oral and intravenous exogenous NO-donation on VSMC migration and proliferation, pigs were randomly distributed in the following treatment groups: (I) 10-day oral administration of LA419 (a neutral sugar organic nitrate with a protected thiol group in its molecular structure) [14–16]; (II) 2 h intravenous administration of LA816 (a non-natural amino acid that is *S*-nitrosylated) [17]; and (III) 2 h intravenous administration of nitroglycerine (glyceryl trinitrate; GTN). All animals were sacrificed just after the treatment period had concluded. LA419 and LA816 are novel platelet-selective NO donors currently under clinical research whereas GTN is a common NO-donor compound currently used in the clinical setting. All compounds were administered at therapeutic doses. Thus, LA419 was given at 0.9 mg/kg bid [14,16] whereas LA816 and GTN were administered intravenously at 6.6 nmol/(kg min) [17] and 2.5 mg/kg [18], respectively. A placebo-control (non-treated) group was also evaluated for comparative purposes. All procedures in this study conform with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

2.2. Preparation of pig aortic arch explants

All animals were sedated with Azaperone and euthanized with an overdose of pentobarbital. The aortic arch of each animal was exposed, isolated from the surrounding tissues, washed in PBS and immersed in a sterile dissecting medium consisting of DMEM (GIBCO) with penicillin-streptomycin (100 units/ml and 100 μ g/ml, respectively). The blood vessel was cleaned from the adventitia and connective tissue in a tissue culture hood. Uniform 1–2 mm² explants were prepared and either directly frozen (time=0; no incubation) or placed in tissue plates (10 explants per petri dish) for further culture.

2.3. Evaluation of serum-related effects on VSMC outgrowth and vascular tissue survival

Before proceeding to tissue explant culture and based upon our previous publication on the effect of fetal calf serum (FCS)-related

mitogens on p53 loss, we analyzed the effect of homologous PS in VSMC outgrowth [5]. Indeed, the use of PS not only closely resembles the *in vivo* scenario (i.e., pig tissue vs. pig serum) thus avoiding interspecies related-stress signals but may also reduce mitogen concentration in the culture media. For this purpose, after sacrifice pig aortic arch explants from non-treated animals were directly frozen (time=0, without incubation period) or incubated with culture medium supplemented with either 20% (v/v) of FCS or PS. Medium was replaced every 2 days and explanted cultures were maintained at 37 °C in a humidified atmosphere of 5%CO₂/95% air for 18 h, 2 days, and 10 days. At each time-point, explants were microscopically examined for the presence of outgrowing VSMC cells and counted by a blinded observer (cells/field). Some explants pieces removed, washed with cold PBS, and frozen in liquid N₂ for further mRNA and protein analysis of p53 and cleaved casp-3 expression.

FCS was obtained from Biological Industries, Ltd. PS was obtained in our lab as follows. Blood from adult non-treated healthy pigs was drawn, spontaneously coagulated for 1 h, centrifuged (2400 rpm, 20 min, 10 °C), inactivated at 56 °C for 30 min, and filtered under sterile conditions.

2.4. Aortic arch explants from exogenous NO-donor treated animals

Based on the results obtained above, explants were directly frozen (time=0) upon aortic arch dissection or incubated with PS (20%, v/v)-supplemented medium for 18 h, 2 days, and 10 days as already described.

2.5. Real time polymerase chain reaction

Frozen aortic explants were pulverized and homogenized in Tripure for RNA and protein isolation according to the manufacturer's instructions. P53, Bcl2, bax, and casp-3, mRNA levels were analyzed by real time PCR-7000 Sequence Detection System of ABI PRISM (Applied Biosystems). TaqMan fluorescent Real-Time PCR primers and probes (6-FAM-MGB) were designed by use of Primer Express 2.0 software from Applied Biosystems and were as follows; p53: probe (5'-tccgtccagcaagttgacctg-3') (250 nM), forward primer (5'-ccatctcaccatcatcacact-3') (300 nM) and reverse primer (5'-gcacaacacgcacctcaaa-3') (300 nM); cyclin D2: probe (5'-ttcgccatgtaccgc-3') (250 nM), forward primer (5'-ctctgtgcccactgacttc-3') (300 nM) and reverse primer (5'-ttcgccatgtaccgc-3') (300 nM); Bcl-2: probe (5'-tcgtggcctcttt-3') (250 nM), forward primer (5'-acgggtggagagactctca-3') (900 nM), reverse primer (5'-tgacgtctccacacatgac-3') (300 nM); bax: probe (5'-agctccatgttacttcca-3') (250 nM), forward primer (5'-ctcaagcgcattggagatgaa-3') (300 nM), reverse primer (5'-cacggctgcatcatct-3') (300 nM); caspase-8: probe (5'-gctgctgctctctctt-3') (250 nM), forward primer (5'-tgggaagcatatgagctattcaa-3') (300 nM), reverse primer (5'-ttccggagctatctgtgagta-3') (300 nM); casp-3: probe (5'-agcatccacatctgtacca-3') (250 nM), forward primer (5'-ccggaatggcatgtcgat-3') (300 nM), reverse primer (5'-tgaaggtctccctgagatttgc-3') (900 nM). The specificity and the optimal primer and probe concentrations were previously tested. The threshold cycle (Ct) values were determined and normalized to the housekeeping gene 18S rRNA in order to adjust for equal amounts of RNA.

2.6. Western blots

Protein concentrations were determined by the BCA protein assay (Pierce). Equal amounts of proteins (50 μ g) were electrophoresed according to Laemmli in SDS-polyacrylamide gel for blotting against cleaved casp-3, p53, and phosphorylated-p53. After

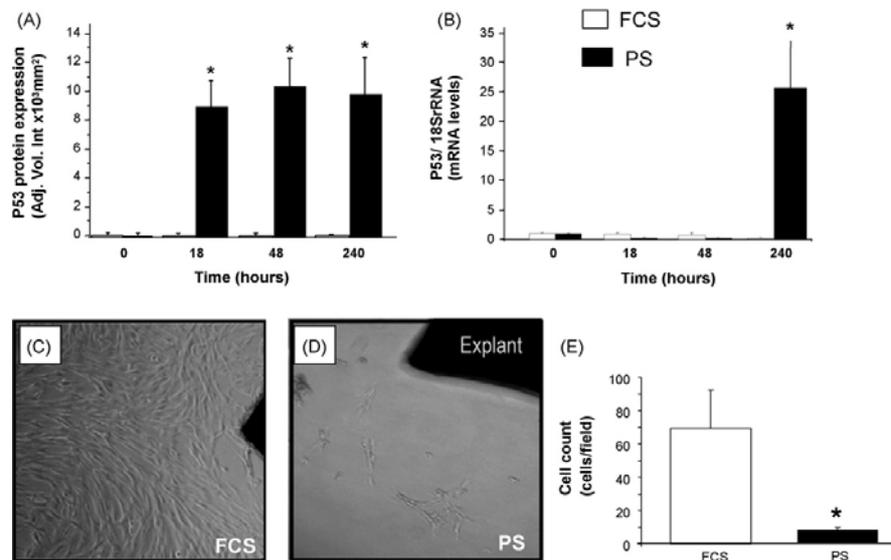


Fig. 1. Pig serum (PS)- and fetal calf serum (FCS)-related effects on p53 protein (A) and mRNA (B) expression in aortic arch explants obtained from non-treated animals at time 0 (directly frozen) and 18 h, 48 h, and 10 days after tissue culture. Representative microphotograph showing vascular smooth muscle cell (VSMC) migration and outgrowth from the explanted tissue cultured in FCS (C) and in PS (D). Bar-graph quantification of cell-outgrowth (E). * $P < 0.001$ vs. time = 0 and explants incubated with 20% FCS.

incubation with peroxidase-labeled immunoglobulins, antibody visualization was performed by the chemiluminescent method SuperSignal[®] (Pierce). The signal was captured by a standard system of chemiluminescent and quantified by a transilluminator (Bio-Rad). Subsequently, the same membranes were incubated with a polyclonal antibody against porcine α -actin in order to ensure equal loading of protein. Primary monoclonal antibodies against p53, phospho-p53, and active casp-3 were obtained from Santa Cruz Biotechnology whereas α -actin was purchased from DAKO.

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by a Kruskal Wallis test followed by the Mann–Whitney- U test to assess specific group differences. The results are expressed as mean \pm S.E.M., and a value of $P < 0.05$ was considered significant.

3. Experimental results

3.1. Serum-related effects on cell outgrowth

PS and FCS-related effects on p53 mRNA and protein expression in aortic arch explants obtained from non-treated animals are shown in Fig. 1. In agreement with our previous findings [5], p53 protein amount in explants incubated with 20% FCS was maintained at a low, almost undetectable level, at any tested time-point (Fig. 1A). In contrast, aortic explants incubated with 20% PS showed a rapid and maintained increase in p53 protein levels from 18 h onwards when compared to both the original tissue (directly frozen without PS incubation, time = 0) and explants incubated with 20% FCS at all time-points ($P < 0.001$). Regarding p53 mRNA expression, real time PCR also revealed a time-dependent rise in p53 in those explants previously incubated with 20% PS that reached a 25-fold increase 10 days after the onset of incubation ($P < 0.001$ vs. time = 0 and 20% FCS; Fig. 1B). On the contrary, explants incubated with medium supplemented with FCS did not show p53 mRNA expression at any tested time.

VSMC cultured with FCS showed cell outgrowth and migration (≈ 70 cells/field) whereas VSMC scarcely migrated from explants incubated with 20% PS-supplemented medium (≈ 10 cells/field; Fig. 1C–E; $P < 0.05$). Therefore, p53 levels seem likely dependent on external mitogen signals and homologous PS, because of its lower mitogenic stimulus, may render cells quiescent. There was no apoptotic induction since active casp-3 remained at negligible levels in PS- and FCS-incubated cells even 10 days after the onset of incubation (data not shown).

3.2. In vivo NO-donation upregulates p53 synthesis, expression, and activity

In light of the results obtained above and with the purpose of isolating the effect of in vivo NO-donation on cell-survival, explants obtained from both placebo-control and NO-donor treated animals were directly frozen (time = 0) or incubated with homologous PS for the following time-periods: 18 h, 2 days, and 10 days.

Overall, all groups showed a significant increase in both p53 and phospho-p53 protein levels already detected 18 h after the onset of PS incubation when compared to time = 0 ($P < 0.05$; Fig. 2A and B). While explants from placebo-control, LA419- and GTN-treated-animals had already reached a maximum p53 protein levels at 18 h (LA419 and GTN increased p53 content by 30% and 57%, respectively, when compared to placebo-control; $P < 0.05$), explants from LA816-treated animals showed a time-dependent rise in p53 expression (at 10 days there was a further 37% increase in p53 levels in comparison to 18 h). At all time points, LA816 explants showed the highest p53 levels among all evaluated groups ($P < 0.001$). Nevertheless, phosphorylated p53 showed a similar and significant increase in the explants obtained from all NO donor-treated animals when compared to control explants from 48 h onwards ($P < 0.001$; Fig. 2B). Regarding p53 mRNA levels, NO-donation was associated with a continuous low expression pattern (almost undetectable mRNA expression) whereas placebo-control explants showed a significant 25-fold increase 10 days after the onset of incubation ($P < 0.001$; Fig. 2C).

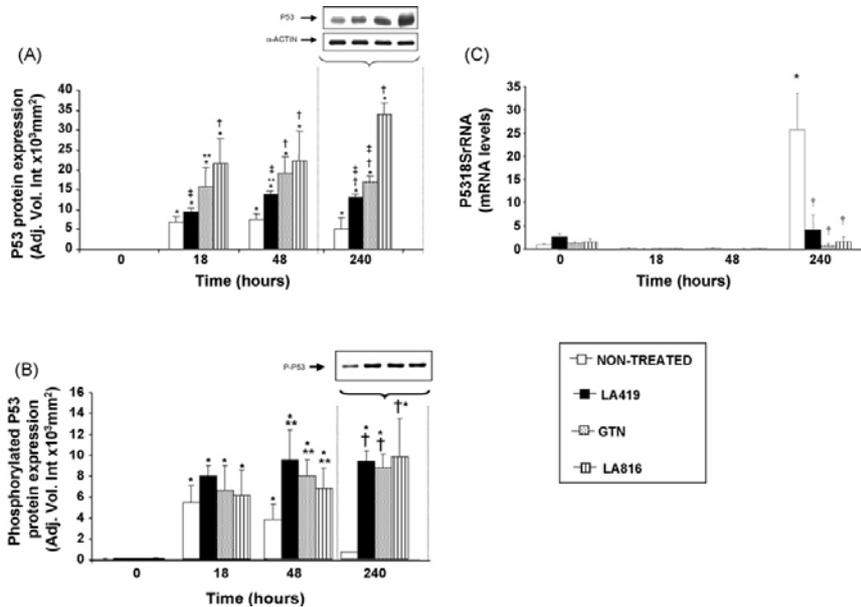


Fig. 2. Protein levels of p53 (A), phosphorylated p53 (B), and p53 mRNA levels (C) in aortic arch explants obtained from placebo-control and in vivo nitric oxide donor-treated animals. Analysis was performed at time 0 (directly frozen) and 18 h, 48 h, and 10 day after tissue culture. A representative image of the Western Blot analysis at day 10 is shown in Fig. 2A and B. * $P < 0.0001$ vs. time = 0; ** $P < 0.05$ vs. placebo-control; † $P < 0.001$ vs. placebo-control; ‡ $P < 0.05$ vs. LA816-treated animals.

3.3. In vivo NO donation effects on vascular wall tissue cell survival

We evaluated cyclin-D2, Bcl2/bax, caspase-8, and caspase-3 gene expression and the presence of activated casp-3 in order to ascertain whether p53 protein accumulation, predominantly detected in explants derived from NO-treated animals, was either associated with cell arrest (quiescence) or cell apoptosis.

Within the first 2 days explants obtained from all NO donor-treated animals showed an increased pro-survival Bcl2/bax mRNA ratio compared with placebo-control ($P < 0.05$; Fig. 3A). Interestingly, within the NO donor-treated tissues, Bcl2/bax ratio was about fivefold higher in explants derived from acutely LA816 and GTN-treated animals (2-h intravenous infusion) whereas it was 10-fold higher in explants from animals orally treated during 10 days with LA419. Nevertheless, at day 10, all explants had already declined the expression of both Bcl2 family-related genes to almost undetectable levels. Interestingly, at this time-point, cyclinD2 gene expression was markedly lower in the NO-donor-derived explants when compared to placebo-control explants (LA816: 8.1 ± 7.1 ; GTN: 6.3 ± 4.4 ; LA419: 25.7 ± 9.9 , and placebo-control: 45.0 ± 21.5 ; $P < 0.05$). Pro-apoptotic bax expression was also decreased vs. control-explants (Fig. 3B). Furthermore, cleaved casp-3 protein expression was relatively low in all groups indicating the abrogation of apoptosis whereas casp-3 mRNA levels were approximately six-times lower in explants derived from NO donor-treated animals than placebo-control (LA816: 4 ± 0.1 , GTN: 5 ± 0.4 , LA419: 8 ± 2 , and placebo-control: 30 ± 1 , $P < 0.001$; results are expressed in Arbitrary Units; Fig. 4). No changes were detected between the different groups in caspase-8 mRNA (data not included).

In summary, treatment with NO prevented the increase in casp-3, bax, and cyclin D2 levels 10 days after explant culture resulting in the retention of Bcl2/bax ratio at levels 4- to 10-fold higher than non-treated tissues.

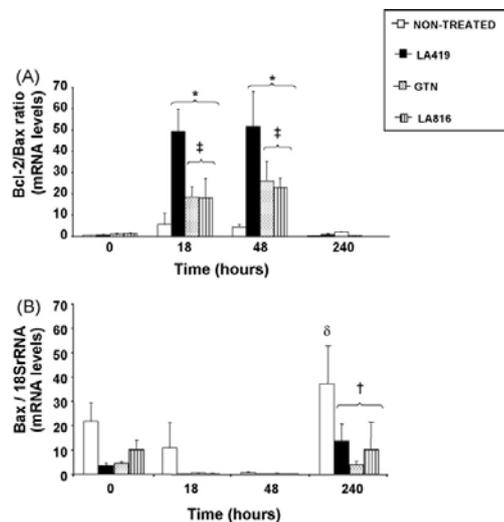


Fig. 3. Effect on in vivo NO donation on vascular wall tissue cell survival assessed by the bcl-2/bax ratio (mRNA levels) (A) and Bax mRNA levels (B) in aortic arch explants obtained from placebo-control and nitric oxide donor-treated pigs at time 0 (directly frozen) and 18 h, 48 h, and 10 day after tissue culture. * $P < 0.05$ vs. placebo-control; † $P < 0.001$ vs. placebo-control; ‡ $P < 0.05$ vs. LA419-treated animals; § $P < 0.05$ vs. T=0.

4. Discussion

Migration of VSMCs from the media to the intima and subsequent proliferation contributes to the intimal thickening of the arteries, playing an important role in atherosclerosis and spe-

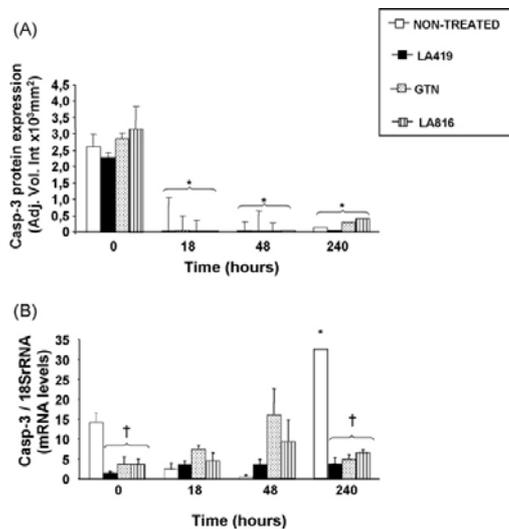


Fig. 4. Caspase-3 protein expression (A) and mRNA levels (B) in aortic arch explants obtained from placebo-control and nitric oxide donor-treated pigs at time 0 (directly frozen) and 18 h, 48 h, and 10 day after tissue culture. * $P < 0.05$ vs. time 0; † $P < 0.05$ vs. placebo-control animals.

cially in restenosis after percutaneous transluminal angioplasty [1]. Therefore, agents that restrict VSMC growth may contribute towards a potentially efficient preventive strategy for coronary heart disease. Herein, we report that three different NO-releasing compounds (two novel platelet-selective NO-donors – LA419 and LA816 – and GTN) are capable of modulating VSMC survival while likely limiting proliferation and migration, effects that are beyond their previously reported antithrombotic and anti-ischemic properties [14–17].

NO has several biochemical activities including mediating vasodilation, directly scavenging superoxide, attenuating leukocyte adhesion and activation, inhibiting platelet aggregation, and maintaining endothelial integrity [19]. Moreover, NO has shown to exert antiproliferative properties for VSMCs in vitro and in vivo suggesting an important role of NO in atherogenesis [20]. Indeed, upon vascular damage the subsequent disruption in NO production enhances VSMC proliferation. Concretely, VSMCs undergo a “phenotypic modulation” and migrate from the media to the intima where they begin to proliferate and produce collagen further straining vascular architecture (i.e., vascular remodelling) [21]. In this regard, here we have shown that in vivo treatment with three differently structured NO-releasing compounds, when given at therapeutical doses for antiplatelet and anti-ischemic effects, exhibit a significant increase in both p53 content and activity. Activation of the tumour suppressor p53 is best known for its ability to block VSMC proliferation during the formation of atherosclerotic lesions either by transiently arresting the cell cycle or inducing apoptosis [22,23]. NO has previously shown to produce a dual effect in VSMC apoptosis depending on the concentration used. It has been reported that physiological amounts of NO have an anti-apoptotic effect [24] while relatively higher concentrations promote apoptosis [25]. Our results provide evidence that exogenous donation of NO at the doses used, both administered acutely (i.e., GTN or LA816) and orally (i.e., LA419), promote vascular cells quiescence rather than apoptosis, an effect that is maintained for at least 10 days after the withdrawal of NO donation. As such,

NO treatment was associated with a clear reduction in the p53 downstream effector cyclin-D2. Indeed, cyclin D1/D2 by associating to Cdc4/6 is essentially involved in the transition from one cell phase to another. Thus, our results demonstrate the ability of exogenous NO-donation to block cell cycle progression likely driving cells to quiescence [26]. These findings were further supported by the detected down-regulation in the p53 apoptotic target Bax, key mediator of the mitochondrial-dependent apoptotic pathway. In fact, we did not observe any alterations of caspase-8 expression likely excluding NO-effects on the intrinsic apoptotic pathway [27]. Furthermore, exogenous NO donation is also associated with an increased bcl-2/bax ratio further attenuating the pro-apoptotic signals and subsequently favouring a pro-survival state [28]. In fact, active caspase-3 (a well-known irreversible effector of the apoptotic signal) [29] was barely apparent in vascular explants derived from NO-treated animals within the periods analyzed herein. In summary, administration of LA419, LA816, and GTN at therapeutical doses preserves VSMC from apoptosis. Moreover, taking into consideration our previous findings, showing that p53 suppression in VSMC is associated with a marked cell out-growth, we hypothesize that NO treatment may limit VSMC proliferation and migration thus rendering an overall protective mechanism against atherogenesis and vascular remodelling. Further studies are needed to properly address these issues.

We have previously reported in pigs and healthy human subjects the powerful antithrombotic effects associated with the administration of LA816 and LA419 (two novel platelet-selective NO-donor compounds) [14–17] further supporting their use far beyond their anti-ischemic properties. Vascular remodelling after balloon dilatation is also mediated by an increased thrombus formation. Indeed, upon vascular damage platelets interact with the vessel wall leading to thrombus formation. Once activated platelets release local concentrations of platelet-derived mitogens that further promote VSMC proliferation [30] and long-term vascular remodeling. In this regard, since we have previously demonstrated the powerful antiplatelet effects associated to LA419 and LA816 administration under the same conditions used to carry out this study, NO donation with these NO donors not only may reduce thrombus formation but may also influence VSMC behavior indirectly through their effects on platelets.

It deserves to be acknowledged that our study was carried out in healthy animals. Certainly, further studies in relevant disease models (NO-deficiency, etc.) seem required to provide further relevant proof-of-concept preclinical data.

In conclusion, proliferation of VSMC has drawn a lot of interest due to its importance during atherogenesis and vascular remodelling. In our study we have elucidated the contribution of three different NO donor compounds (LA419, LA816, and GTN) to VSMC survival. We have shown that exogenous in vivo NO treatment preserves VSMC from apoptosis while renders cells quiescence thus likely limiting proliferation and further migration. Adding this atheroprotective effect to the previously described powerful antithrombotic and anti-ischemic properties, NO-donors show a potential valuable therapeutic profile for prevention and treatment of coronary heart disease and vascular remodelling.

Funding

This work has been supported by the funds provided by CIBER-OBN CB06/03, PN-SAF 2006/10091, and FIC-Catalana Occidente.

Conflict of interest

No conflict of interest to disclose.

Acknowledgements

We thank Lacer S.A, Spain, for providing the compounds and authors thank P. Catalina and M^a.A. Cánovas for their technical support. GV is a Juan de la Cierva Investigator of the MEyC of Spain.

References

- [1] Chesebro J, Lam J, Badimon L, Fuster V. Restenosis after arterial angioplasty: a hemorrhheologic response to injury. *Am J Cardiol* 1987;60:10B–6B.
- [2] Angelini GD, Newby AC. The future of saphenous vein as a coronary artery bypass conduit. *Eur Heart J* 1989;10:273–80.
- [3] Vousden KH. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochim Biophys Acta* 2002;1602:47–59.
- [4] Villalobo A. Nitric oxide and cell proliferation. *FEBS* 2006;273:2329–44.
- [5] Rodriguez-Campos A, Ruiz-Enriquez P, Faraudo S, Badimon L. Mitogen-induced p53 downregulation precedes vascular smooth muscle cell migration from healthy tunica media and proliferation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;2:214–9.
- [6] Brüne B, von Knethen A, Sandau K. Transcription factors p53 and HIF-1 α as targets of nitric oxide. *Cell Signal* 2001;13:525–33.
- [7] Auchon D, Jiang X, Morgan D, et al. Three-dimensional structure of the apotosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 2002;9:423–32.
- [8] Walford G, Loscalzo J. Nitric oxide in vascular biology. *J Thromb Haemost* 2003;1:2112–8.
- [9] Jeremy JY, Rowe D, Emsley A, Newby A. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 1999;43:580–94.
- [10] Sarkar R, Gordon D, Stanley J, Webb R. Cell cycle effects of nitric oxide on vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1997;272:H1810–8.
- [11] Tanner F, Meier P, Greutert H, et al. Nitric oxide modulates expression of cell cycle regulatory proteins: a cytostatic strategy for inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation. *Circulation* 2000;101:1982–9.
- [12] Messmer U, Brüne B. Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signaling pathways. *Biochem J* 1996;319:299–305.
- [13] Jeremy JY, Rowe D, Emsley AM, Newby AC. Nitric oxide and the proliferation of vascular smooth muscle cells. *Cardiovasc Res* 1999;43:580–94.
- [14] Vilahur G, Segales E, Casani L, Badimon L. A novel anti-ischemic nitric oxide donor inhibits thrombosis without modifying haemodynamic parameters. *Thromb Haemost* 2004;91:1035–43.
- [15] Urooj Zafar M, Vilahur G, Choi BG, et al. A novel anti-ischemic nitric oxide donor (LA419) reduces thrombogenesis in healthy human subjects. *J Thromb Haemost* 2007.
- [16] Vilahur G, Pena E, Padro T, Badimon L. Protein disulphide isomerase-mediated LA419-NO release provides additional antithrombotic effects to the blockade of the ADP receptor. *Thromb Haemost* 2007;97:650–7.
- [17] Vilahur G, Segales E, Salas E, Badimon L. Effects of a novel platelet nitric oxide donor (LA816), aspirin, clopidogrel, and combined therapy in inhibiting flow-and lesion-dependent thrombosis in the porcine ex vivo model. *Circulation* 2004;110:1686–93.
- [18] Manabe T, Yamamoto A, Satoh K, Ichihara K. Tolerance to nitroglycerin induced by isosorbide-5-mononitrate infusion in vivo. *Biol Pharm Bull* 2001;24:1370–2.
- [19] Loscalzo J. Nitric oxide insufficiency, platelet activation, and arterial thrombosis. *Circ Res* 2001;88:756–62.
- [20] Garg UC, Hassid A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* 1989;83:1774–7.
- [21] Geng YJ, Libby P. Progression of atheroma: a struggle between death and procreation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:1370–80.
- [22] Ihling C, Menzel G, Wellens E, Monting JS, Schaefer HE, Zeiher AM. Topographical association between the cyclin-dependent kinases inhibitor P21, p53 accumulation, and cellular proliferation in human atherosclerotic tissue. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:2218–24.
- [23] Bennett MR, Littlewood TD, Schwartz SM, Weissberg PL. Increased sensitivity of human vascular smooth muscle cells from atherosclerotic plaques to p53-mediated apoptosis. *Circ Res* 1997;81:591–9.
- [24] Dimmeler S, Haendeler J, Nehls M, Zeiher AM. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1 β -converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein (CPP)-32-like proteases. *J Exp Med* 1997;185:601–7.
- [25] Pollman MJ, Yamada T, Horiuchi M, Gibbons GH. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. Countervailing influences of nitric oxide and angiotensin II. *Circ Res* 1996;79:748–56.
- [26] Sancar A, Lindsey-Boltz LA, Unsal-Kacmaz K, Linn S. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu Rev Biochem* 2004;73:39–85.
- [27] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407:770–6.
- [28] Xie K, Huang S, Wang Y, et al. Bcl-2 protects cells from cytokine-induced nitric oxide-dependent apoptosis. *Cancer Immunol Immunother* 1996;43:109–15.
- [29] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309–12.
- [30] Janssens S, Flaherty D, Nong Z, et al. Human endothelial nitric oxide synthase gene transfer inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and neointima formation after balloon injury in rats. *Circulation* 1998;97:1274–81.

3.- INFORME DEL DIRECTOR I ÍNDEX D'IMPACTE

Na Lina Badimon Maestro, com a directora de la tesi doctoral presentada per en Francesc Xavier Duran sanmartí, titulada "efectes protectors de dues estratègies de control de risc cardiovascular sobre la paret vascular", informa:

Que el factor d'impacte dels dos manuscrits del Xavier presentats en aquesta tesi doctoral és el següent:

Duran et al. 2008 [Factor d'Impacte = 6.291]

Duran X, Sánchez S, Vilahur G, Badimon L. Protective effects of triflusal on secondary thrombus growth and vascular cyclooxygenase-2. *J Thromb Haemost* 2008; 6: 1385-92.

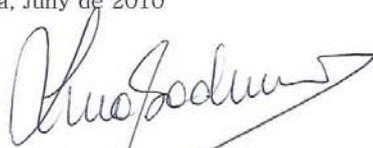
En Xavier va contribuir a aquest manuscrit donant suport tècnic en l'experimental amb els animals i realitzant les tècniques bioquímiques, amb el suport tècnic de S.S., i de cultius. A més, ha contribuït en l'escriptura del manuscrit així com la realització de les figures 4, 5 i 6.

[Duran et al. 2009] [Factor d'Impacte = 4.601]

Duran X, Vilahur G, Badimon L. Exogenous in vivo NO-donor treatment preserves p53 levels and protects vascular cells from apoptosis. *Atherosclerosis* 205 (2009) 101-106.

En Xavier va contribuir a aquest manuscrit donant suport tècnic en l'experimental amb els animals i realitzant les tècniques bioquímiques i de cultius. A més ha contribuït en l'escriptura del manuscrit així com la realització de totes les figures.

Barcelona, Juny de 2010



Lina Badimon Maestro

Directora de tesi

Vist-i-plau de la Tutora,

Roser Iglesias Coll

Tutora de tesi

ANNEX

Contribució en altres publicacions

ORIGINAL ARTICLE

Short-term myocardial ischemia induces cardiac modified C-reactive protein expression and proinflammatory gene (cyclo-oxygenase-2, monocyte chemoattractant protein-1, and tissue factor) upregulation in peripheral blood mononuclear cells

G. VILAHUR,*† R. HERNÁNDEZ-VERA,*† B. MOLINS,*† L. CASANÍ,*† X. DURAN,* T. PADRÓ* and L. BADIMON*†‡

*Cardiovascular Research Centre, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona; †CIBEROBN-Instituto Salud Carlos III, Barcelona; and ‡Cardiovascular Research Chair, UAB, Barcelona, Spain

To cite this article: Vilahur G, Hernández-Vera R, Molins B, Casaní L, Duran X, Padró T, Badimon L. Short-term myocardial ischemia induces cardiac modified C-reactive protein expression and proinflammatory gene (cyclo-oxygenase-2, monocyte chemoattractant protein-1, and tissue factor) upregulation in peripheral blood mononuclear cells. *J Thromb Haemost* 2009; 7: 485–93.

Summary. *Background:* Prompt coronary thrombus resolution, reducing time of ischemia, improves cardiac recovery. The factors triggered by ischemia that contribute to the clinical outcome are not fully known. We hypothesize that unabated inflammation due to cardiac ischemia may be a contributing factor. *Aims:* As a proof-of-concept, we evaluated the effect of short-term myocardial ischemia on the local and systemic inflammatory response. *Methods:* Pigs underwent either 90-min mid-left anterior descending (LAD) coronary artery balloon occlusion (infarct size 25% ± 1% left ventricle; 29% heart function deterioration) or a sham-operation procedure. Peri-infarcted and non-ischemic cardiac tissue was obtained for histopathologic, molecular and immunohistochemical analysis of inflammatory markers [interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), modified C-reactive protein (mCRP), and human alveolar macrophage-56 (HAM-56)]. Blood (femoral vein) was withdrawn prior to myocardial infarction (MI) induction ($t = 0$) and at 30 and 90 min to evaluate: (i) systemic cytokine levels (IL-6, TNF- α , CRP); (ii) proinflammatory gene and protein expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) of tissue factor (TF), cyclo-oxygenase-2 (Cox-2), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), and CRP; and (iii) platelet activation (assessed by perfusion studies and RhoA activation). *Results:* Short-term ischemia triggered cardiac IL-6 and TNF- α expression, recruitment of inflammatory cells, and mCRP expression in infiltrated macrophages ($P < 0.05$ vs.

$t = 0$ and sham). PBMC mRNA and protein expression of MCP-1, Cox-2 and TF was significantly increased by ischemia, whereas no differences were detected in CRP. Ischemia increased cardiac troponin-I, IL-6 and TNF- α systemic levels, and was associated with higher platelet deposition and RhoA activation ($P < 0.001$ vs. $t = 0$ and sham). *Conclusion:* Short-term myocardial ischemia, even without atherosclerosis, induces an inflammatory phenotype by inducing local recruitment of macrophages and systemic activation of mononuclear cells, and renders platelets more susceptible to activation.

Keywords: inflammation, ischemia, mCRP, mononuclear cells, myocardial infarction, platelets.

Occlusive intracoronary thrombosis leads to myocardial ischemia and to cardiac dysfunction. Several studies have shown that serum cardiac troponin levels are associated with myocardial tissue injury and are powerful predictors of both short-term and long-term adverse outcomes in patients with ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) [1]. Thus, early detection of acute myocardial infarction (AMI) and prompt coronary thrombus resolution (i.e. fibrinolytic therapy or mechanical reperfusion) may reduce the extent of necrosis and facilitate myocardial function recovery. The factors contributing to the impact of symptom-onset-to-reperfusion time on clinical outcomes and even mortality are not fully known. It is our hypothesis that unabated inflammation due to ischemia may be a contributing factor.

Although there is overwhelming evidence that an inflammatory outburst is associated with acute coronary syndromes, the causes and nature are still largely unknown. Indeed, it is widely recognized that the atherosclerotic process and its thrombotic complications constitute a source of inflammatory stimuli [2,3].

Correspondence: Lina Badimon, Cardiovascular Research Centre, c/Sant Antoni M^oClaret 167, 08025 Barcelona, Spain.
Tel.: +34 935 565880; fax: +34 935 565559.
E-mail: lbadimon@csic-iccc.org

Received 4 August 2008, accepted 20 November 2008

However, several reports have postulated the existence of alternative inflammatory sources [4]. In this regard, reperfusion of the ischemic heart has been shown to play a prominent role in the inflammatory response, either by recruiting inflammatory cells to the site of injury [5,6] or through the overproduction of reactive oxygen radicals, further enhancing the local inflammatory milieu [7]. In addition, myocardial necrotic tissue has also been suggested to contribute to the release of proinflammatory cytokines, including interleukin-6 (IL-6), interleukin-1, and tumor necrosis factor- α (TNF- α), which in turn induce hepatic production of native C-reactive protein (nCRP), a key systemic inflammatory marker [8]. Indeed, serum levels of the acute-phase reactant nCRP have been linked to myocardial necrosis in STEMI patients [4], indicating the ability of myocyte damage to disseminate the local inflammatory response to distal organs through C-reactive protein (CRP). However, AMI patients generally present an atherosclerosis burden concurrently with a combination of risk factors, which makes it difficult to determine the individual contribution of each proinflammatory stimulus to the overall inflammatory phenotype. Hence, the precise site, stimulus and mechanisms that cause a systemic inflammatory response after AMI are not completely understood and remain controversial. Furthermore, to the best of our knowledge, whether ischemia itself, without underlying coronary vascular disease, may acutely cause a local and systemic inflammatory response has not been formerly addressed in a human-like animal model of coronary occlusion. Thus, the aim of our study was to evaluate, in a pig model of closed-chest total coronary occlusion, the effect of ischemia *per se* on local and systemic inflammatory responses. Here we report, as a proof-of-concept, that short-term myocardial ischemia suffices to induce activation of myocardium-recruited and circulating peripheral mononuclear cells and to render platelets more susceptible to activation and deposition.

Materials and methods

Experimental procedures

AMI induction Crossbred commercial pigs (Landrace-Largewhite; $n = 19$) weighing 35–40 kg were acclimated for 1 week before any experimental procedure. Twelve hours before the experimental coronary occlusion, a loading dose of clopidogrel (150 mg) was administered to avoid thrombotic complications due to catheter manipulation. AMI ($n = 15$) was experimentally induced by complete balloon occlusion in the left anterior descending (LAD) coronary artery as previously described [9] (see Supporting Information). The study protocol was approved by an institutional animal research committee and conformed to the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals published by the US National Institutes of Health. A sham-operated group of animals ($n = 4$) underwent the same experimental procedure (antithrombotic therapy, anesthesia, catheterization, etc.) but without balloon occlusion.

Animal monitoring The hemodynamic parameters (heart rate, mean systemic arterial pressure, mixed venous oxygen saturation) were recorded for all animals throughout the study. We used two-dimensional echocardiograms (Phillips iE33, Amsterdam, the Netherlands) to assess global heart function (i.e. left ventricle ejection fraction) in all animals at baseline (T0) and 90 min after the onset of ischemia (T90).

Histopathologic evaluation of the infarcted myocardium

After 90 min, animals from both groups (sham-operated, $n = 4$; animals subjected to ischemia, $n = 7$) were killed; hearts were perfused with cold phosphate-buffered saline (PBS), and subjected to a 1-h freeze cycle at -20°C in order to stiffen the tissue for further slicing. Hearts from both ischemic and non-ischemic animals were sliced into 5-mm-thick slices from the apex towards the atrioventricular groove. Consecutive slices were alternately collected for triphenyl tetrazolium chloride staining for infarct size measurement (% left ventricle), as previously described [9], and molecular and histologic examination of the perinecrotic area (3 mm surrounding the necrotic core) and the topographically corresponding area in non-ischemic animals. For these purposes, samples were either directly frozen in liquid nitrogen for mRNA and protein analysis of several inflammatory markers (described below), or embedded in optimal cutting temperature compound (OCT) and frozen. Four 5- μm sections were obtained from each of these latter samples, and mounted on gelatinized slides for: (i) conventional hematoxylin–eosin staining for nuclear staining and inflammatory infiltration visualization; (ii) modified CRP (mCRP) detection (porcine mCRP antibody kindly provided by L. A. Potempa); and (iii) macrophage staining [human alveolar macrophage-56 (HAM-56) antibody, Dako]. Images were captured with an Olympus Vanox AHB3 microscope and digitalized with a Sony 3CCD.

Blood sampling

Once the animal was fully anesthetized and the vital signs were stable, the femoral vein was accessed percutaneously with an 18-gauge needle and a 6F arterial sheath for blood withdrawals. Blood was drawn at three different time points: T0 (baseline), which was 20 min after heparin bolus administration and just prior to the start of LAD coronary artery occlusion; T30 (30 min after onset of ischemia); and T90 (90 min after start of ischemia). The first 3 mL of blood were discarded, and blood was withdrawn gently to minimize shear-induced platelet activation. Blood from sham-operated animals was drawn at the same time points.

Cardiac troponin-I (cTnI) levels Blood was induced to clot (20 min at 37°C) to obtain serum (4 $^{\circ}\text{C}$, 15 min, 1800 g) that was stored at -80°C until cTnI analysis. The quantitative determination of pig cTnI in serum was performed by using an ADVIA Centaur Automated Chemiluminescence System

(Bayer Corporation) in a medical analysis laboratory. The sensitivity threshold for cTnI was 0.01 ng mL⁻¹. Values above 0.1 ng mL⁻¹ were considered to be positive for cTnI.

Hematologic, coagulation and biochemical parameters Blood was collected in sodium citrate (0.16 mol L⁻¹), gently mixed, and immediately centrifuged at 2800 × *g* to obtain plasma for subsequent hematologic determinations (System 9000, Serono-Baker Diagnostics, Allentown, Philadelphia, PA, USA), coagulometry [fibrinogen concentration, standard prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT); ST4, Diagnostica Stago] and routine biochemical analysis (glucose, lipids, and liver and kidney parameters).

Circulating cytokines and nCRP measurement: Cytokines (IL-6 and TNF- α) and nCRP were analyzed in plasma and serum, respectively, using commercially available enzyme-linked immunosorbent assay kits (porcine IL-6 and porcine TNF- α from Quantikine Porcine Kits from R&D Systems; porcine nCRP from Immunological Consultant Laboratories). According to the manufacturers, the minimum detection limits for IL-6, TNF- α and nCRP are 10 pg mL⁻¹, 3.7 pg mL⁻¹, and 20 ng mL⁻¹, respectively.

Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) isolation: Twenty milliliters of blood were collected into EDTA tubes at the three tested time points (T0, T30, and T90) from all animals. All blood samples were immediately subjected to Ficoll-paque Plus (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) density gradient centrifugation to isolate PBMCs. Samples were counted and then directly frozen in liquid nitrogen and stored at - 80 °C until mRNA and protein evaluation.

Real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis

Perinecrotic and non-ischemic myocardial tissue, and PBMC mRNA and protein, were extracted with Tripure Reagent (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) according to the manufacturer's instructions. Tissue factor (TF), cyclo-oxygenase (Cox)-2, CRP and monocyte chemo-attractant protein-1 (MCP-1/CCL2) mRNA levels were analyzed by real-time PCR (7000 Sequence Detection System of ABI PRISM; Applied Biosystems) in both PBMCs and the perinecrotic myocardium. In addition, IL-6 and TNF- α gene expression was also evaluated in the cardiac tissue. TaqMan fluorescent real-time PCR primers and probes (6-FAM-MGB) were designed with the use of PRIMER EXPRESS 2.0 software from Applied Biosystems, and real-time PCR was performed (see Supporting Information). The threshold cycle (C_t) values were determined and normalized to the housekeeping gene 18S rRNA in order to adjust for equal amounts of RNA.

Immunoblotting

The protein phase recovered from the Tripure Reagent was quantified by using the bicinchonic acid method (Pierce

Biotechnology, Rockford, IL, USA). Samples (30 μ g per lane) were subjected to sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis and blotted onto nitrocellulose membranes. Blots were blocked for 2 h at room temperature, and then incubated overnight at 4 °C with antibodies known to cross-react with pig proteins, including anti-TF (American Diagnostica, Greenwich, CT, USA), anti-Cox-2 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), anti-MCP-1/CCL2 (Cell Signaling), and anti-mCRP (monoclonal mCRP; kindly provided by L. A. Potempa). Thereafter, membranes were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and detected with a SuperSignal chemiluminescence system (Pierce). Protein expression was determined using a computerized software package (QUANTITY-ONE; Bio-Rad), and β -actin was used as a protein loading control.

Platelet activation assays

Platelet adhesion Type I collagen-coated slides were prepared and placed in a parallel plate chamber, described in detail elsewhere [10]. Briefly, the flow chamber was assembled and filled with Tyrode's buffer. A peristaltic pump was used to perfuse the buffer through the chamber. After 1 min of buffer preperfusion, blood was introduced into the chamber at a constant shear rate of 1500 s⁻¹ for 5 min. At the end of blood perfusion, buffer was again circulated for 1 min through the chamber under identical flow conditions. The entire system was kept at 37 °C. After perfusions, collagen-coated slides were carefully removed from the system, rinsed with PBS, and fixed with paraformaldehyde for 15 min. The fixed slides were then washed with PBS and mounted on glass slides with Glycerol Mounting Medium (Dako Cytomation, Copenhagen, Denmark). Five fields along the adhesion surface were systematically acquired for total platelet deposition (field: 750 × 750 μ m). Images were analyzed with a commercial software package (METAMORPH; Universal Imaging Corp., West Chester, PA, USA). The surface covered by platelets was expressed as the area covered by platelets per field analyzed (μ m²/field). Further information regarding platelet adhesion analysis is provided in the supporting information.

Western blot analysis of platelet-activated RhoA Blood was collected in acid citrate dextrose solution for platelet RhoA antigen determination (anti-RhoA; Santa Cruz Biotechnology). Platelets were isolated and subfractionated for both total and cytosolic/membrane RhoA fraction evaluation, as previously described [11].

Statistical analysis

Continuous variables are expressed as mean \pm standard error of the mean. The differences between different time periods and animal groups were evaluated using a one-way ANOVA followed by Scheffé's comparison. A *P*-value < 0.05 was considered to be significant. All statistical analyses were performed with the statistical software package STATVIEW.

Results

Successful LAD coronary artery occlusion was achieved in all 19 cases, and was associated with the expected electrocardiographic pattern of total coronary occlusion (ST-segment elevation). One animal died due to refractory ventricular fibrillation during the procedure. Therefore, 18 pigs were used (14 pigs undergoing AMI, and four sham-operated control animals). All animals showed a similar mean heart rate (69 ± 5 beats min^{-1}) and P_{O_2} ($97\% \pm 1\%$) during the procedure.

Myocardial damage assessment

All animals showed a comparable percentage of LAD artery occlusion ($72.7\% \pm 2\%$ LAD artery occlusion). Ninety minutes of ischemia resulted in an infarct size of the left ventricle of $25\% \pm 1\%$ and a 29% deterioration in heart function ($74\% \pm 3\%$ vs. $45\% \pm 2\%$ left ventricle ejection fraction; $P < 0.05$).

Serum levels of cTnI were elevated 30 min after the onset of ischemia when compared to T0 (0.14 ± 0.03 ng mL^{-1} vs. 0.02 ± 0.005 ng mL^{-1} , respectively; $P < 0.001$) and further increased after 90 min of coronary occlusion (0.25 ± 0.06 ng mL^{-1} ; $P < 0.001$ vs. T30 and T0), indicating a progressive ischemia-induced myocardial cell injury. cTnI levels in sham-operated animals were below the positive detection limit (0.1 ng mL^{-1}) throughout the evaluated period (mean: 0.029 ± 0.005 ng mL^{-1}).

Myocardial response to ischemia

Histopathologic analyses of both non-infarcted hearts (sham-operated animals; $n = 4$) and the peri-infarcted myocardial zone of pigs that underwent 90 min of ischemia ($n = 7$) are shown in Fig. 1. In comparison to sham-operated non-ischemic hearts (Fig. 1A,B), 90 min of ischemia induced a high interstitial inflammatory response in the injured myocardium (Fig. 1C–E).

Real-time PCR analysis of peri-infarcted cardiac tissue from ischemic hearts vs. sham-operated animals revealed similar gene expression levels of Cox-2 (0.86 ± 0.11 vs. 1.11 ± 0.2), MCP-1/CCL2 (0.52 ± 0.06 vs. 0.49 ± 0.12), and TF (0.47 ± 0.05 vs. 0.46 ± 0.08). In contrast, there was marked upregulation ($P < 0.05$) of IL-6, TNF- α and mCRP mRNA and protein expression in the peri-infarcted myocardium when compared to non-ischemic tissue (Fig. 2A–D). Immunohistochemical analysis corroborated the marked mCRP overexpression that was associated with myocardial infiltrated macrophages (HAM-56-positive cells; Fig. 3).

Evolution of the hematologic, biochemical and coagulation parameters

Red blood cell, hematocrit, platelet and white blood cell counts were all within the normal physiological range for

2.5-month old pigs at T0, T30 and T90 in both groups of animals (subjected to ischemia and sham-operated animals; Table SA). Furthermore, the distribution of lymphocytes, granulocytes and monocytes in peripheral whole blood was also similar among the different time points. Biochemical parameters, measured at baseline and at the end of the ischemic period, were within physiological ranges (Table SB). PT and fibrinogen levels remained similar between the different tested periods, whereas APTT mean ratio was decreased from T30 onwards (Table SC; $P < 0.05$), according to the metabolization of the bolus of heparin in all animals.

Time of ischemia increases PBMC activation

mRNA expression Ischemia induced a time-dependent increase in TF, Cox-2 and MCP-1/CCL2 gene transcription when compared to baseline and sham-operated animals, as shown in Fig. 4A–C. Thus, at 30 min after the onset of ischemia, there was a trend ($P = 0.09$) towards an increase in TF mRNA levels that reached significance at T90, with a two-fold increase when compared to baseline ($P < 0.05$). Cox-2 mRNA expression was already enhanced at T30 ($P < 0.05$ vs. baseline), and longer ischemia periods (T90) further increased Cox-2 gene expression, there being a two-fold increase vs. T0 ($P < 0.05$ vs. T30; $P < 0.001$ vs. T0). Thirty minutes of ischemia sufficed to induce high expression of MCP-1/CCL2 mRNA (2.5-fold higher than baseline), which remained high at T90. Interestingly, sham-operated animals showed no changes in TF, Cox-2 and MCP-1 gene expression at any tested time periods, with levels comparable to baseline values in animals subjected to ischemia. Finally, CRP levels in PBMCs were similar in all studied animals (data not shown).

Antigen levels TF protein levels showed a highly significant increase at T90 (2.5-fold increase vs. baseline and sham-operated animals; $P < 0.05$; Fig. 4D). Ischemia also time-dependently increased Cox-2 total protein content in PBMCs. Thus, 30 min of ischemia caused a 34% increase in Cox-2 protein expression vs. baseline amounts ($P < 0.05$), whereas a further 60 min of ischemia (T90) was associated with an additional 56% increase ($P < 0.05$ vs. T30) in Cox-2 expression (89% increase vs. baseline; $P < 0.001$; Fig. 4E). MCP-1 protein expression reached a plateau at 30 min after the onset of ischemia (2.2-fold increase vs. baseline; $P < 0.05$; Fig. 4F). Again, protein levels of TF, Cox-2 and MCP-1 in sham-operated animals remained constant during the 90-min experimental procedure, and were comparable to baseline values ($t = 0$) in animals subjected to ischemia.

Time effect of ischemia on circulating IL-6, TNF- α and nCRP levels

There was a time-dependent rise in systemic plasma levels of IL-6 and TNF- α in animals subjected to ischemia, as detailed in Table 1. No variations were detected in serological nCRP levels

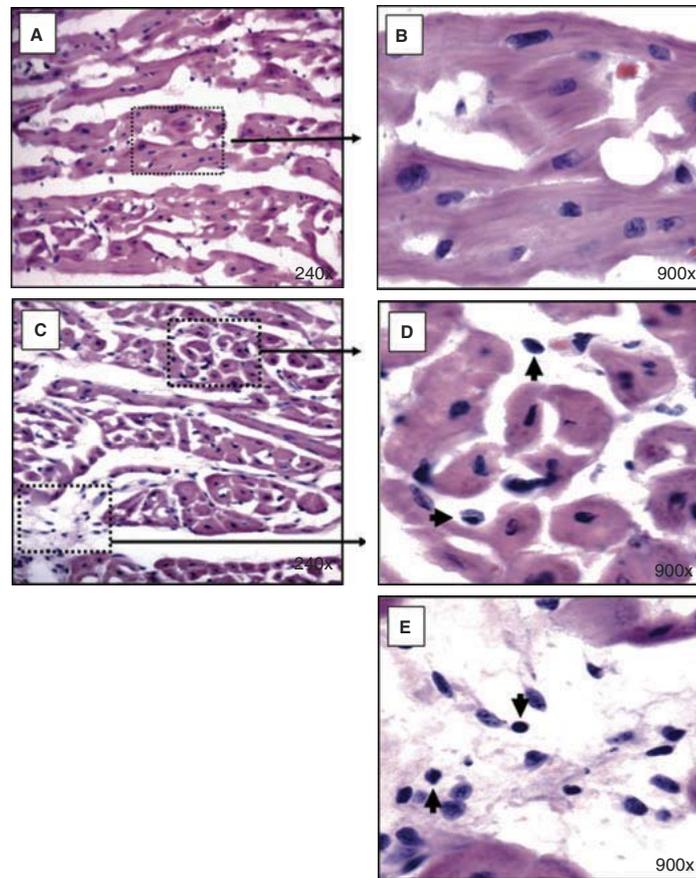


Fig. 1. Histopathologic analysis of the peri-infarcted myocardial zone. Ninety minutes of ischemia was associated with inflammatory infiltrate in the peri-infarcted myocardium (C–E), as assessed by hematoxylin–eosin staining, when compared to non-infarcted myocardium (A, B) from sham-operated animals. Black arrows indicate inflammatory infiltrate.

between all animals (mean: $34.4 \pm 3.6 \text{ ng mL}^{-1}$), with values being within the range for healthy pigs [12,13].

Ischemia increases platelet activation

Platelet adhesion Platelet activation was evaluated by measuring adhesion to collagen type I fibrils perfused at a wall shear rate of 1500 s^{-1} . Ischemia significantly increased platelet deposition (five-fold increase vs. baseline and sham-operated animals at all tested time points; Fig. 5); the surface covered by platelets significantly increased from $0.23 \pm 0.09 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ at T0 to $1.07 \pm 0.029 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ and $1.03 \pm 0.021 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ at 30 and 90 min of ischemia, respectively ($P < 0.001$). Sham-operated animals displayed a mean platelet-covered area of $0.21 \pm 0.026 \times 10^5 \mu\text{m}^2$.

RhoA activation As shown in Fig. 6, 30 min of ischemia increased RhoA translocation to the platelet membrane,

indicating platelet activation ($P < 0.001$ vs. baseline and sham-operated animals), whereas sham-operated animals displayed similar RhoA cytosol/membrane ratios throughout the procedure.

Discussion

In the present study, we have demonstrated, in an experimentally induced STEMI-like model without atherosclerosis, that myocardial injury as the result of short-term ischemia triggers the activation of recruited and circulating peripheral mononuclear cells and renders circulating platelets more susceptible to activation and deposition. Indeed, 90 min of coronary occlusion resulted in an increase in IL-6, TNF- α and mCRP cardiac expression, histopathologic evidence of leukocyte infiltrates surrounding the necrotic area, higher levels of circulating proinflammatory cytokines, enhanced PBMC gene and protein expression of Cox-2, MCP-1, and TF, and increased platelet

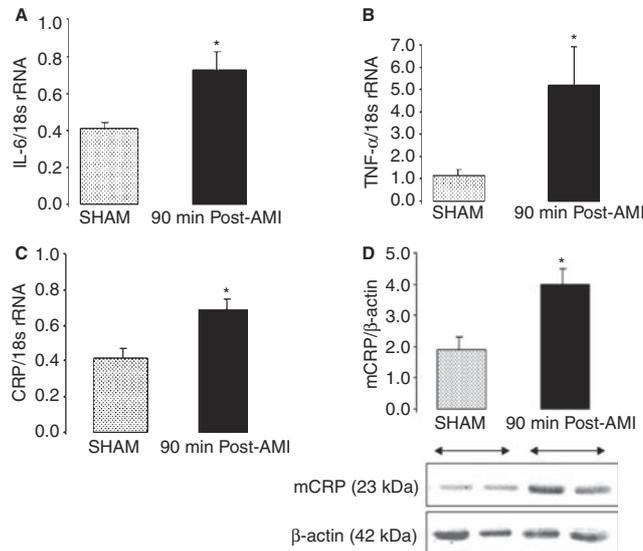


Fig. 2. Interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and C-reactive protein (CRP) mRNA analysis in the peri-infarcted myocardium. Coronary occlusion for 90 min was associated with clear upregulation of IL-6, TNF- α and CRP gene expression levels in the peri-infarcted myocardial zone when compared to non-ischemic animals (sham-operated animals). Modified CRP protein was also enhanced after the ischemic period (C). AMI, acute myocardial infarction; mCRP, modified CRP. * $P < 0.05$ vs. sham-operated animals.

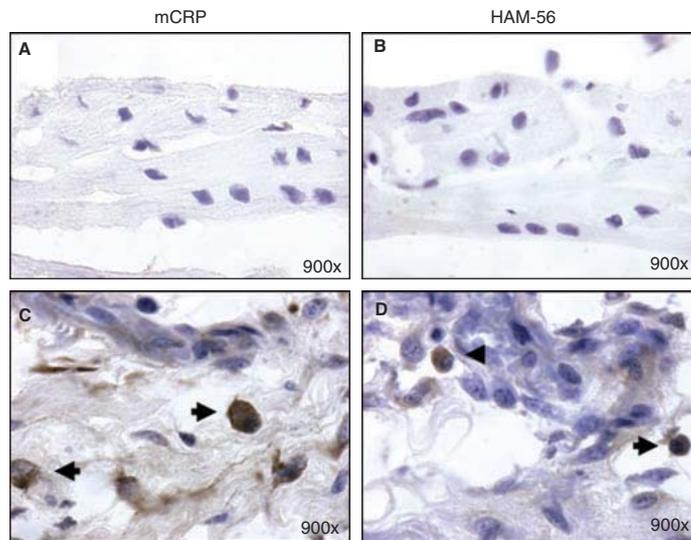


Fig. 3. C-reactive protein (CRP) immunohistochemical localization in the peri-infarcted myocardium. Modified CRP (mCRP; A, C) and macrophage [human alveolar macrophage-56 (HAM-56); B, D] content was assessed by immunohistochemical analysis in both sham-operated animals (A, B) and ischemic animals (C, D). Immunostaining of the peri-infarcted myocardium indicates mCRP-positive staining in cardiac infiltrated macrophages (see black arrows). Perinecrotic myocardium shows loss of integrity because of ischemic injury.

adhesion to collagen-coated surfaces. In addition, we report for the first time that infiltrated cardiac macrophages express mCRP. Certainly, our results do not exclude the expression of mCRP by other cardiac resident or infiltrating cells. Recently,

distinct isoforms of CRP with different activities and functions have been described; the classically studied serum CRP, the pentameric or native CRP (nCRP) [14], and the monomeric or modified CRP (mCRP) found in fibrous tissues of normal and

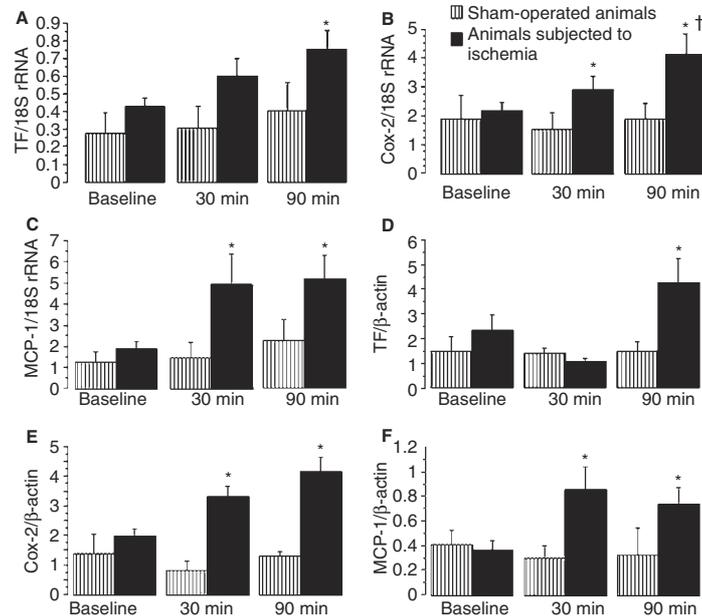


Fig. 4. Effects of time of ischemia on circulating mononuclear cells. (A–C) Effect of time of ischemia (30 and 90 min) on tissue factor (TF) (A), cyclo-oxygenase-2 (Cox-2) (B) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) (C) mRNA expression in peripheral mononuclear cells. (D–F) Effect of time of ischemia on TF (D), cyclo-oxygenase-2 (Cox-2) (E) and MCP-1/CCL (F) protein expression in peripheral mononuclear cells. * $P < 0.05$ vs. baseline (T0) and sham-control animals; † $P < 0.05$ vs. T30.

Table 1 Circulating interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) levels

		Animals subjected to ischemia			Sham-operated animals		
		Baseline	30 min	90 min	Baseline	30 min	90 min
TNF- α (pg mL $^{-1}$)	Mean	93.27	236.74**	240.38**	82.89	88.73	99.68
	SEM	5.06	44.50	29.30	8.64	19.54	14.14
IL-6 (pg mL $^{-1}$)	Mean	18.91	20.28	28.08*	18.75	18.25	18.73
	SEM	0.98	1.17	4.30	1.60	1.04	0.83

SEM, standard error of the mean. * $P < 0.05$ vs. baseline and $t = 30$; ** $P < 0.001$ vs. baseline.

atherosclerotic plaques [15,16]. We have recently shown that mCRP, unlike nCRP, is able to induce thrombosis upon exposure to blood [17] and has proinflammatory effects [18–20]. Moreover, we have also demonstrated the ability of CRP to directly promote angiogenesis [21]. Further cell culture studies are in progress to elucidate both the link between ischemia and cardiac CRP stimulation and its role within the different cell types that gather upon tissue damage.

The early, marked, ischemia-related upregulation of proinflammatory cytokines (IL-6 and TNF- α) in the perinecrotic myocardium probably contributed to macrophage recruitment via chemokine synthesis. In fact, we detected a concomitant time-dependent increase in circulating cytokines. Once in the myocardium, macrophages were subsequently challenged to express mCRP, amplifying the proinflammatory stimulus. Interestingly, neither PBMC mCRP gene expression nor nCRP systemic levels showed variations throughout the study.

Indeed, hepatic production of nCRP is mainly regulated by IL-6, and thus it would be expected that an IL-6 rise would precede hepatic nCRP synthesis. nCRP has been shown to peak at about 48 h [22], and that a period of 10 h must elapse between the initiation of nCRP synthesis and the time when nCRP levels become measurable in the serum. Our results also revealed early upregulation (30 min after onset of ischemia) of MCP-1/CCL2 gene and protein expression in systemic circulating PBMCs. MCP-1/CCL2 regulates migration and infiltration of monocytes into tissues, probably initiating a positive proinflammatory/chemotactic feedback loop. However, MCP-1 has also been shown to elicit a variety of other pathologic responses affecting thrombosis, restenosis, proliferation and migration of vascular smooth muscle cells, angiogenesis, and oxidative stress [23]. Additionally, inducible Cox-2 and TF expression were also induced in PBMCs. On the one hand, ischemia time-dependently increased the expression of the

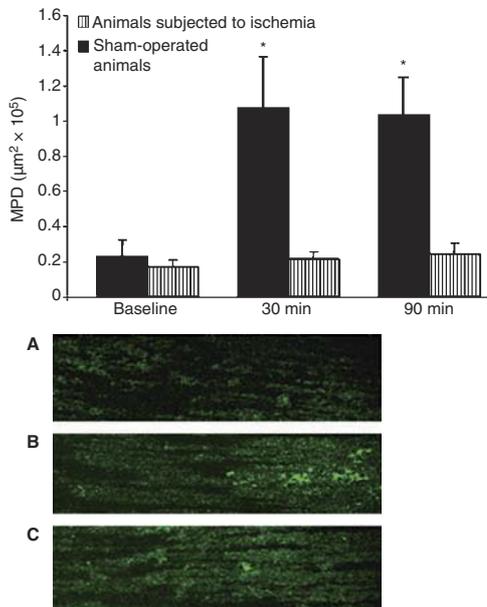


Fig. 5. Effect of ischemia on mean platelet deposition (MPD). (A) T0 or baseline. (B) T30. (C) T90. Results are expressed as mean values of surface covered by platelets per analyzed field ($\mu\text{m}^2/\text{field}$) \pm standard error of the mean. * $P < 0.005$ vs. $t = 0$ and sham-operated animals.

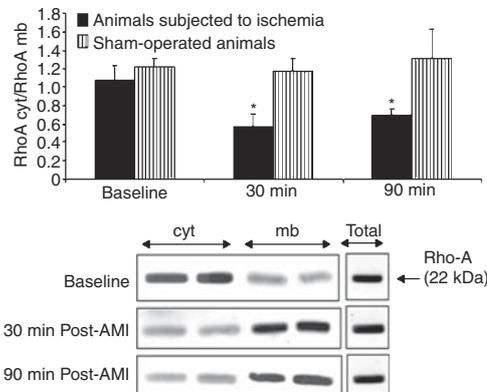


Fig. 6. Evaluation of RhoA activation in platelets. The total amount of RhoA was unchanged throughout the tested periods, whereas 30 min of ischemia markedly increased RhoA translocation, measured as cytosol (cyt)/membrane (mb) ratio. AMI, acute myocardial infarction. * $P < 0.05$ vs. $t = 0$ and sham-operated animals.

proinflammatory Cox-2 enzyme, which, via prostaglandin generation, may boost the proinflammatory milieu (e.g. increased vascular permeability, and chemotaxis) [24]. On the other hand, a 90-min ischemic period also resulted in a significant increase in TF, which is a key player in the activation of the thrombotic pathway, eventually leading to thrombin generation, platelet activation, and fibrin clot formation [25].

Ischemia, however, not only seemed to exert an acute proinflammatory triggering effect on the white cell lineage, but also rendered platelets more susceptible to activation, despite animals being pretreated with clopidogrel. Thus, platelet hyper-responsiveness associated with ischemia was confirmed at both the functional level (platelet adhesion on collagen under flow) and the molecular level (RhoA membrane translocation in non-stimulated circulating platelets). In this latter regard, the small-GTPase RhoA is involved in actin cytoskeleton reorganization leading to platelet receptor activation (e.g. glycoprotein IIb/glycoprotein IIIa) [26]. However, besides promoting cell adhesion and aggregation, activated platelets accelerate and enhance the already established inflammatory process [27]. In fact, over the past decade, compelling clinical and preclinical evidence has emerged connecting the inflammatory response and thrombosis and vice versa through the CD40–CD40L system [28,29]. Unfortunately, as a limitation of the study and because of species-related lack of recognition antibodies, we were unable to analyze the CD40–CD40L axis.

In summary, besides the ongoing inflammatory reaction in systemic atherosclerosis and/or the coronary culprit plaques, onset of acute ischemia induces an additional ischemia-related inflammatory boost in acute coronary syndromes. Taking into consideration that the magnitude of the systemic inflammatory response seems to be a strong predictor of future cardiovascular events [2], strategies aimed at reducing the inflammatory response seem to be needed. In fact, the recently reported Jupiter Trial [30] has demonstrated rosuvastatin-related beneficial effects (reduction in cardiovascular morbidity and mortality) through CRP reduction in patients with no evidence of pre-existing cardiovascular disease and normal low-density lipoprotein cholesterol. On the other hand, although the mechanisms that lead to atherothrombotic coronary occlusion at a given time point are as yet uncontrolled, both TF and enhanced platelet reactivity are critical triggers for acute thrombus formation. Our results demonstrating an acute and time-dependent effect of ischemia (probably through damaged myocardium/cytokine networks) on circulating PBMCs and platelets may contribute to a better understanding of the complex mechanisms that may underlay the benefits of rapid revascularization upon coronary occlusion.

Acknowledgements

The authors had full access to the data and take responsibility for its integrity. All authors have read and agree to the manuscript as written. P. Catalina, S. Huertas, O. García, M. Cánovas and O. Juan-Babot were vital for the proper conduct of the basic experiments. We thank L. A. Potempa for kindly providing the anti-mCRP antibody. G. Vilahur, R. Hernández-Vera, B. Molins, L. Casaní and L. Badimon are members of CIBEROBN Pathophysiology of Obesity and Nutrition-Institute Carlos III and are funded by PNS 2006-10091 from MEC (Spain). G. Vilahur is a recipient of a grant from the Science and Education Spanish Ministry (JdC-MEC, Spain),

R. Hernández-Vera is a pre-doctoral CSIC fellow (JAE-CSIC, Spain), and B. Molins is a pre-doctoral fellow of Generalitat de Catalunya. X. Duran and T. Padró state that they have no conflict of interest.

Disclosure of Conflict of Interests

The authors state that they have no conflict of interest.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Methods (Supplemental file).

Table S1. Follow-up of hematologic (A), biochemical (B) and coagulation (C) parameters in sham-operated animals (SHAM) and animals subjected to ischemia (acute myocardial infarction). * $P < 0.05$ vs. baseline.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

References

- Heidenreich PA, Alloggiamento T, Melsop K, McDonald KM, Go AS, Hlatky MA. The prognostic value of troponin in patients with non-ST elevation acute coronary syndromes: a meta-analysis. *J Am Coll Cardiol* 2001; **38**: 478–85.
- Ross R. Atherosclerosis is an inflammatory disease. *Am Heart J* 1999; **138**: S419–20.
- Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; **420**: 868–74.
- Cusack MR, Marber MS, Lambiase PD, Bucknall CA, Redwood SR. Systemic inflammation in unstable angina is the result of myocardial necrosis. *J Am Coll Cardiol* 2002; **39**: 1917–23.
- Hoffman M, Blum A, Baruch R, Kaplan E, Benjamin M. Leukocytes and coronary heart disease. *Atherosclerosis* 2004; **172**: 1–6.
- Kukielka GL, Smith CW, Manning AM, Youker KA, Michael LH, Entman ML. Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium. Potential role in postreperfusion inflammatory injury. *Circulation* 1995; **92**: 1866–75.
- Kakio T, Matsumori A, Ono K, Ito H, Matsushima K, Sasayama S. Roles and relationship of macrophages and monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the ischemic and reperfused rat heart. *Lab Invest* 2000; **80**: 1127–36.
- Libby P, Ridker PM. Novel inflammatory markers of coronary risk: theory versus practice. *Circulation* 1999; **100**: 1148–50.
- Ibanez B, Prat-Gonzalez S, Speidl WS, Vilahur G, Pinero A, Cimmino G, Garcia MJ, Fuster V, Sanz J, Badimon JJ. Early metoprolol administration before coronary reperfusion results in increased myocardial salvage: analysis of ischemic myocardium at risk using cardiac magnetic resonance. *Circulation* 2007; **115**: 2909–16.
- Lawrence MB, McIntire LV, Eskin SG. Effect of flow on polymorphonuclear leukocyte/endothelial cell adhesion. *Blood* 1987; **70**: 1284–90.
- Bulhak A, Roy J, Hedin U, Sjoquist PO, Pernow J. Cardioprotective effect of rosuvastatin in vivo is dependent on inhibition of geranylgeranyl pyrophosphate and altered RhoA membrane translocation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2007; **292**: H3158–63.
- Tam CS, Wong M, Tam K, Aouad L, Waters KA. The effect of acute intermittent hypercapnic hypoxia treatment on IL-6, TNF-alpha, and CRP levels in piglets. *Sleep* 2007; **30**: 723–7.
- Martinez-Subiela S, Eckersall PD, Campbell FM, Parra MD, Fuentes P, Ceron JJ. A time-resolved immunofluorometric assay for porcine C-reactive protein quantification in whole blood. *Luminescence* 2007; **22**: 171–6.
- Wu Y, Wang HW, Ji SR, Sui SF. Two-dimensional crystallization of rabbit C-reactive protein monomeric subunits. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2003; **59**: 922–6.
- Diehl EE, Haines GK 3rd, Radosevich JA, Potempa LA. Immunohistochemical localization of modified C-reactive protein antigen in normal vascular tissue. *Am J Med Sci* 2000; **319**: 79–83.
- Krupinski J, Turu MM, Martinez-Gonzalez J, Carvajal A, Juan-Babot JO, Iborra E, Slevin M, Rubio F, Badimon L. Endogenous expression of C-reactive protein is increased in active (ulcerated noncomplicated) human carotid artery plaques. *Stroke* 2006; **37**: 1200–4.
- Molins B, Pena E, Vilahur G, Mendieta C, Slevin M, Badimon L. C-reactive protein isoforms differ in their effects on thrombus growth. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2008; **28**: 2239–46.
- Khreiss T, Jozsef L, Potempa LA, Filep JG. Opposing effects of C-reactive protein isoforms on shear-induced neutrophil–platelet adhesion and neutrophil aggregation in whole blood. *Circulation* 2004; **110**: 2713–20.
- Khreiss T, Jozsef L, Potempa LA, Filep JG. Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells. *Circulation* 2004; **109**: 2016–22.
- Potempa LA, Zeller JM, Fiedel BA, Kinoshita CM, Gewurz H. Stimulation of human neutrophils, monocytes, and platelets by modified C-reactive protein (CRP) expressing a neoantigenic specificity. *Inflammation* 1988; **12**: 391–405.
- Turu MM, Slevin M, Matou S, West D, Rodriguez C, Luque A, Grau-Olivares M, Badimon L, Martinez-Gonzalez J, Krupinski J. C-reactive protein exerts angiogenic effects on vascular endothelial cells and modulates associated signalling pathways and gene expression. *BMC Cell Biol* 2008; **9**: 47.
- Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest* 1993; **91**: 1351–7.
- Egashira K. Molecular mechanisms mediating inflammation in vascular disease: special reference to monocyte chemoattractant protein-1. *Hypertension* 2003; **41**: 834–41.
- Linton MF, Fazio S. Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 2004; **4**: 116–23.
- Badimon L, Badimon JJ, Vilahur G, Segales E, Llorente V. Pathogenesis of the acute coronary syndromes and therapeutic implications. *Pathophysiol Haemost Thromb* 2002; **32**: 225–31.
- Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 1992; **70**: 389–99.
- Gawaz M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. *Cardiovasc Res* 2004; **61**: 498–511.
- Henn V, Slupsky JR, Grafe M, Anagnostopoulos I, Forster R, Muller-Berghaus G, Kroczeck RA. CD40 ligand on activated platelets triggers an inflammatory reaction of endothelial cells. *Nature* 1998; **391**: 591–4.
- Henn V, Steinbach S, Buchner K, Presek P, Kroczeck RA. The inflammatory action of CD40 ligand (CD154) expressed on activated human platelets is temporally limited by coexpressed CD40. *Blood* 2001; **98**: 1047–54.
- Ridker PM, Fonseca FA, Genest J, Gotto AM, Kastelein JJ, Khurmi NS, Koenig W, Libby P, Lorenzatti AJ, Nordestgaard BG, Shepherd J, Willerson JT, Glynn RJ. Baseline characteristics of participants in the JUPITER trial, a randomized placebo-controlled primary prevention trial of statin therapy among individuals with low low-density lipoprotein cholesterol and elevated high-sensitivity C-reactive protein. *Am J Cardiol* 2007; **100**: 1659–64.



Contents lists available at ScienceDirect

Atherosclerosis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/atherosclerosis

Induction of RISK by HMG-CoA reductase inhibition affords cardioprotection after myocardial infarction[☆]

Gemma Vilahur^{a,b}, Laura Casaní^{a,b}, Esther Peña^{a,b}, Xavier Duran^a, Oriol Juan-Babot^a, Lina Badimon^{a,b,c,*}

^a Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Barcelona Spain

^b Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, CIBEROBN-Instituto Salud Carlos III, Barcelona, Spain

^c UAB, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 December 2008

Received in revised form 20 January 2009

Accepted 5 February 2009

Available online 20 February 2009

Keywords:

RISK pathway
Myocardial infarction
Apoptosis
Molecular biology
Heart function

ABSTRACT

Objectives: Coronary occlusion and revascularization leads to myocardial damage and heart function deterioration. Statins can regress atherosclerosis and modulate platelet function, but their effect on post-acute myocardial infarction (AMI) injury remains to be fully determined. We sought to examine whether rosuvastatin (R) exerts any effect on the RISK/apoptosis pathway when administered early after coronary reperfusion.

Methods: Pigs were fed 10 days a hypercholesterolemic diet before AMI induction and thereafter for 7 days randomly distributed to receive R or placebo (C) with the same diet. At sacrifice, hearts were sliced and alternatively collected for MI size and molecular analysis (gene and protein expression) in the peri-infarcted and remote myocardium. The RISK components (PKC, Erk2, and Akt/PKB) and downstream targets (HIF-1 α and VEGF), and cell survival/apoptosis markers (Bcl-2, Bax, and Caspase-3) were analyzed. Annexin-V, Mito-Tracker staining, and inflammatory infiltration were also evaluated.

Results: R enhanced PKC, Erk2, Akt/PKB and its downstream effectors, and attenuated inflammation and cardiomyocyte apoptosis in the peri-infarcted zone ($p < 0.05$). No changes were detected in the remote myocardium. Infarct size was smaller in R than in C pigs (7% absolute reduction; 36% relative reduction; $p < 0.05$) and was associated with an absolute 12% recovery of LVEF (24% relative restoration; $p < 0.05$ vs. post-AMI).

Conclusions: HMG-CoA inhibition early after reperfusion activates RISK kinases, reduces the extent of damaged myocardium, and improves heart function.

© 2009 Published by Elsevier Ireland Ltd.

1. Introduction

Total occlusion of coronary arteries by thrombosis leads to myocardial infarction inducing necrosis, apoptosis, and reprogramming of myocyte function. Several landmark clinical trials have demonstrated that administration of HMG-CoA reductase inhibitors reduce the risk of coronary events and mortality in patients with CAD [1–3]. Statins have also shown to retard progression or stimulate regression of human coronary plaques [4,5], improve endothelial function, decrease inflammation, and reduce thrombogenicity. All these anti-atherothrombotic effects are due to systemic cholesterol-lowering mechanisms [1,2]. However, sub-

group analysis of large clinical trials [2,6] and clinical studies [7,8] have suggested that lipid levels modification alone cannot explain all of the clinical benefits associated to statin treatment [9]. It has become increasingly apparent that statins are involved not only in immunomodulation [10], neuroprotection [11], and cellular senescence [12], but also in cardiovascular protection on ischemia/reperfusion (I/R) injury [13,14], and oxidative stress reduction [15]. Early reperfusion is a requirement to salvage viable myocardium, following an acute MI. Reperfusion of ischaemic myocardium, however, can paradoxically result in myocyte death: a phenomenon termed lethal reperfusion-induced injury [16]. Indeed, fairly recent evidence has involved apoptotic cell death, during the phase of reperfusion, as an important contributor to the extent of MI [17]. Hence, targeting anti-apoptotic mechanisms of cellular protection at the time of reperfusion may offer a potential approach to attenuate reperfusion-induced cell death.

The RISK pathway includes a group of pro-survival anti-apoptotic protein kinases such as Akt/PKB, PKC, and the MAPK Erk1/2 (p44/p22) that by inhibiting mitochondrial permeability

[☆] This study was partially presented at the European Society of Cardiology 2008 receiving the Young Investigation Award in Thrombosis.

* Corresponding author at: Cardiovascular Research Center, c/Sant Antoni M^o Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. Tel.: +34 935565880; fax: +34 935565559.

E-mail address: Lbadimon@csic-iccc.org (L. Badimon).

transition pore (mPTP) opening, prevent cell death at the time of myocardial reperfusion [18]. Multiple preclinical studies have demonstrated that the cardioprotective effects associated to several pharmacological agents (e.g., insulin, transforming growth factor- β , etc.) [19] are linked to the activation of the RISK pathway. Moreover, previous studies performed in small animal models have shown that statins may exert cardioprotection through kinases and vascular eNOS activation [14,20,21]. However, the potential effect of statins on both the RISK and apoptotic pathway components and their eventual outcome in heart function has not been previously addressed. Here we demonstrate, in a pig experimental model of closed-chest balloon occlusion, that early treatment with rosuvastatin after coronary reperfusion: (1) activates the Akt/PKB-Erk2/p42-PKC pathway and the downstream targets HIF-1 α /VEGF; (2) prevents myocardiocytes apoptosis and inflammatory-cell infiltration into the ischemic border zone limiting infarct size and (3) recovers heart function.

2. Materials and methods

2.1. Animal model and experimental design

Twelve pigs were fed over 10 days a hypercholesterolemic diet (20%-fat, 2%-cholesterol, 1%-colic acid) before being subjected to a closed-chest, 60 min mid-LAD balloon occlusion. Then, all hypercholesterolemic pigs were randomly distributed to either receive rosuvastatin 80 mg/day (R; 2.4 mg/kg; kindly provided by AstraZeneca) or placebo-control (C). The first rosuvastatin dose was administered 3 h post-infarction, and thereafter, it was given in a daily-basis (by hand) for the following 7 days because the average time of patient hospitalization after MI is 1 week. Animals were kept under the same hypercholesterolemic diet. This dose of rosuvastatin results in plasma concentrations close to those obtained in humans [22]. The study protocol was approved by the Institutional animal research committee.

2.2. Acute myocardial infarction model

Acute MI was experimentally induced as we have previously described [23]. The angioplasty balloon was inflated after the first diagonal branch of the LAD (complete occlusion was verified by fluoroscopy) for 60 min. At the end of the ischemic period the balloon was deflated and removed, the ischemic area allowed to reperused (again verified by angiography) and the animals were allowed to recover.

Within the procedure, one pig in the R group died because of severe reperfusion arrhythmias, and one pig in the C group presented such heart collateral circulation that besides proper balloon inflation in the LAD it was not associated with the expected ECG pattern of coronary occlusion. Hence, we decided to exclude both animals from the data analysis.

2.3. Cardiac function evaluation

In all animals a two-dimensional echocardiogram (Phillips iE33) was performed with an apical two chamber view according to Simpson's rule for LVEF assessment. Global left ventricle function (LVEF) was performed before coronary occlusion (baseline), after 60 min LAD occlusion (day AMI induction), and 7 days post-AMI (sacrifice).

2.4. Histological infarct size analysis

Following the sacrifice of the animals, hearts were firstly submerged in saline to wash off blood and secreted molecules and cut into 5-mm thick short-axis slices. Consecutive slices were alternatively collected for either TTC staining or molecular evaluations.

mRNA and protein determinations of RISK pathway and downstream targets (HIF-1 α and VEGF), cell survival/apoptotic markers, eNOS, and RhoA were performed in the infarct border zone. Taking into consideration our recently published data with MRI characterization of the infarct area, the peri-necrotic area would represent around 6–8% of the LV (around 5 mm of tissue surrounding the necrotic area) [23]. In addition, tissue samples from the same zone were embedded in OCT for confocal microscopy analysis of mitochondrial morphology (Mito-Tracker[®]) and Annexin-V surface expression. Indeed, the collection of tissue samples for both molecular studies and infarct size analysis from each heart increases the strength and reliability of our data. However, such an approach unable the determination of area-at-risk by Evan's Blue staining that interferes with molecular determinations [24]. To exclude significant collection of non-ischemic tissue as a contaminant to the peri-necrotic sample, tissue from remote non-ischemic left ventricle was collected for control testing in protein expression.

For infarct size analysis, slices were completely covered in 1% TTC (Sigma-Aldrich) and then in 4% paraformaldehyde to delineate viable from infarcted myocardium. The surviving tissue turned a deep red whereas the infarcted-necrotic tissue remained unstained. For each section, images were taken and areas of TTC negative/positive tissue measured by an independent blinded observer by planimetry (Image J). Infarct borders were defined and volumes of infarcted tissue calculated in terms of percentage of the left ventricular myocardial volume.

2.5. Blood measurements, lipid levels and LDL oxidation

Blood samples were collected at baseline, the day of AMI induction, and at sacrifice, for haematological, biochemical (liver transaminases GOT and GPT), serum cholesterol levels analysis, LDL oxidation potential [25], and quantitative determination of troponin-I. Values above 0.1 ng/ml were considered positive for cardiac troponin-I.

2.6. Immunoblotting

Tissue samples obtained from the peri-infarcted myocardium (Fig. 1) and remote non-ischemic myocardium of all animal were subjected to SDS-PAGE. Blots were incubated with antibodies anti-phospho-Akt (P-Akt; Cell Signalling), anti-Akt-1 (Santa Cruz Biotechnology); anti-Erk-2, and anti-Bcl-2 (Santa Cruz Biotechnology); anti-PKC (Bioscience), anti-Bax (StressGen), anti-caspase-3 (StressGen) and anti-eNOS (Cell Signalling). Membrane-bound secondary antibodies were detected using the SuperSignal chemiluminescence system (Pierce). Protein expression was determined using a computerized software package (Quantity-One, Bio Rad) and β -actin was used for protein loading control.

RhoA antigen was determined (anti-RhoA, Santa Cruz Biotechnology) in both total and cytosolic-membrane fractions. Briefly, tissue powder was homogenized (1 mol/L NaCl, 20 mmol/L Tris pH 7.4, 1 mmol/L DTT and protease inhibitors) and centrifuged (100,000 \times g, 45 min, 4 °C). The supernatant was collected (referred to as the cytosolic fraction) and pellets were resuspended, and the membrane proteins were extracted by incubation in 500 mmol/L Tris-HCl pH 7.4, 20% sodium dodecyl sulfate, 100 mmol/L sodium orthovanadate, and protease inhibitors. The extract was centrifuged at 12,000 \times g for 10 min at 15 °C. The supernatant was collected as the membrane fraction.

2.7. Real-time PCR analysis

Powder tissue was homogenized in Tripure isolation reagent (Roche Molecular Biochemicals) for RNA isolation. We evaluated by real-time PCR analysis (7000-ABI PRISM, Applied Biosystems)

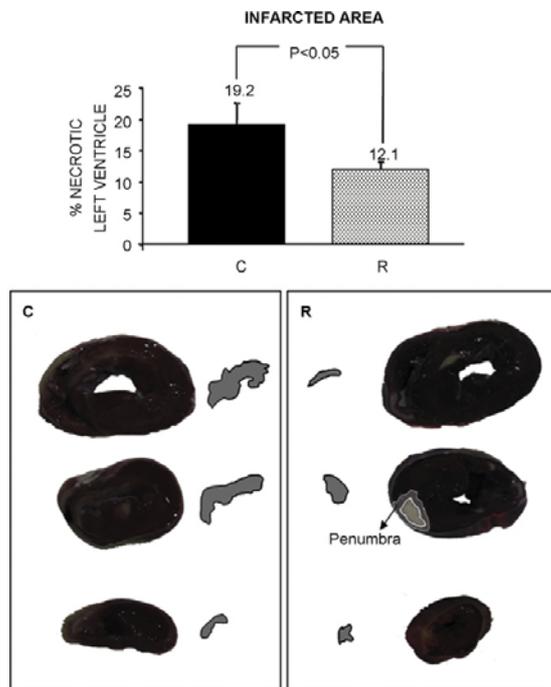


Fig. 1. Histological infarct size analysis. Bar graphs indicating the % of necrotic left ventricle and representative histological images of the infarct size in the control (C)- and rosuvastatin (R)-treated groups. The negative-TTC staining (i.e., lack of dehydrogenase activity) represents the infarcted myocardium whereas the red-coloured region represents the healthy and viable myocardial tissue. This figure also contains a representative example of the penumbra region (i.e., peri-infarcted cardiac tissue) obtained for molecular analysis. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

the following genes: (1) Erk-2 downstream target factor hypoxia inducible factor (HIF)-1 α and vascular endothelial growth factor (VEGF), and the p38 MAPK and c-Jun N-terminal kinases (JNK); (2) PKC; (3) caspase-3; and (4) eNOS. TaqMan fluorescent real-time PCR primers and probes (6-FAM-MGB) were designed by use of Primer Express 2.0 software from Applied Biosystems and are detailed in Table I (Supplemental file). The specificity and the optimal primer and probe concentrations were previously tested. The threshold cycle (C_t) values were determined and normalized to the housekeeping gene 18S rRNA in order to adjust for equal amounts of RNA.

2.8. Confocal microscopy studies

Non-permeabilized OCT-embedded specimens were cut into 5- μ m thick sections in order to examine the mitochondrial by Mito-Tracker Red staining and apoptosis by Annexin-V-PE bound to phosphatidylserine (Invitrogen). Hoechst (Molecular Probes) was used for nuclear staining. Images were acquired with the Leica inverted fluorescence confocal microscope (Leica TCS SP2-AOBS, Germany). Myocardial cells were viewed with objective HCX/PL/APO 63x/0.7 IMM CORR. Fluorescent images were acquired in a scan format of 1024 \times 1024 pixels in a spatial data set and were processed with the Leica Standard Software TCS-AOBS. Images are shown as both fluorescent and merged with transmitted light field. Annexin-V quantification analysis was performed (five

fields/animal) using a computer-based quantitative colour image analysis system (Image J) to assess the stained area (%) for each section.

2.9. Myocardial white cells infiltration

Serially cut 5 μ m sections from OCT-embedded samples were obtained from the peri-infarcted myocardial zone (four sections/animal) and mounted on gelatinized slides for haematoxylin-eosin staining of the inflammatory infiltration. Images were captured with an Olympus Vanox AHB3 microscope at 100x and digitalized (Sony 3CCD) to assess, by Image J, the percentage of inflammatory area for each section.

2.10. Colony forming units (CFU) assay

Both, after AMI induction and at sacrifice, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from 20 ml of citrate/dextran anticoagulated peripheral blood by Ficoll density gradient centrifugation. PBMCs were then resuspended in EGM-2 medium (PromoCell) and plated in six-well culture plates coated with 10 μ g/ml human fibronectin (Harbor Bioproducts Inc.). After 2 days non-adherent cells were removed and fresh medium was added. At day 7, adherent cells were analyzed by phase-contrast microscopy and counted by their ability to develop CFUs by a blinded observer.

2.11. Statistical analysis

Continuous variables are expressed as mean \pm standard error of the mean. After testing for normal distribution and equality of variances with the *F* test, paired *t*-test was used to compare within groups the change from randomization to study conclusion (e.g., LVEF and Tn-I) whereas unpaired *t*-test was used for all single time-point measurements (e.g., infarct size, Western blot, RT-PCR, etc.) to compare between R and C animals. A value of $p < 0.05$ was considered significant. The statistical analyses were performed with the statistical software package Statview.

3. Results

3.1. Effects of rosuvastatin in infarct size

Infarct size was significantly reduced by rosuvastatin (Fig. 1). Treatment, that was initiated early after reperfusion and maintained throughout a 7-day period, induced a significant 7% absolute reduction on infarct size (relative 36% reduction) in comparison to C animals ($p < 0.05$).

Serum levels of Tn-I were elevated in both groups 7 days after AMI induction (R: 0.13 ± 0.04 ng/ml; C: 0.17 ± 0.05 ng/ml) when compared to pre-AMI values (R: 0.02 ± 0.003 ; C: 0.02 ± 0.006 ng/ml; $p < 0.05$).

3.2. Cardiac function and haemodynamic parameters

All animal groups displayed a significant and similar deterioration in global LVEF 60 min after balloon occlusion (visualized by a marked akinesia) that remained unchanged in control animals (Table 1 panels A–C; $p < 0.0005$). A 7-day R treatment was able to recover cardiac function with a significant absolute improvement of 12% in LVEF (~24% relative restoration) (Table 1C; $p < 0.0006$) whereas C animals showed a minor 3% relative recovery ($p < 0.05$). No variations were detected in cardiac rate and oxygen levels between the different groups of animals (data not shown).

3.3. Serum cholesterol levels and liver enzymes

Rosuvastatin treatment did not produce any significant difference in blood cell or platelet counts (data not shown). With regards to liver transaminases, untreated control animals showed a significant increase at day 7th in both GOT (75 ± 17 IU vs. 36 ± 6 IU) and GPT (66 ± 5 vs. 48 ± 3 IU) ($p < 0.05$) with respect to baseline pre-intervention values, whereas no changes were detected after a 7-day treatment with rosuvastatin (GOT: 45 ± 17 IU vs. 36 ± 3 IU; GPT: 34 ± 7 vs. 41 ± 11 IU). As shown in Table II (Supplemental file) and as expected due to the short treatment period, no variations in plasma lipid levels were detected among R-treated and C animals at the different tested periods. All animals were maintained throughout the entire experimental period under a hypercholesterolemic diet (favouring cholesterol absorption over synthesis) in order to exclude any systemic cholesterol lowering effects of rosuvastatin. LDL oxidation, measured as maximal conjugated dienes (MaxDC) was similar in both groups (382.7 ± 47.2 vs. 382.0 ± 82.2 ; $p = N.S.$).

3.4. Molecular studies

3.4.1. Immunoblot and real-time PCR analysis

Rosuvastatin was associated with higher protein expression of the RISK kinases Akt/PKB (p-Akt/Akt ratio), MAPK Erk-2/p44, and

PKC in the myocardial border zone (Fig. 2 and Fig. 1 Supplemental file). In addition, R-treated animals showed an up-regulated expression ($p < 0.05$) of PKC and the Erk-2/p44 cardioprotective downstream targets HIF-1 α and VEGF genes (Fig. 3). No changes were detected in the other MAPK cJNK and p38 between the different groups (data not shown). Regarding the expression of pro-apoptotic/anti-apoptotic signals, R lead to a higher pro-survival Bcl-2/Bax ratio and conversely, a twofold decrease in cleaved-caspase-3 protein expression (Fig. 2 and Fig. 1 Supplemental file). Caspase-3 mRNA expression was also significantly decreased by R treatment ($72 \pm 8\%$ of control; $p < 0.05$; Fig. 3). In the remote myocardium pAkt, Erk-2, PKC, Bcl-2, Bax, and Truncated Casp-3 protein levels were significantly lower than in the peri-necrotic (penumbra) area and did not differ between the two groups (data not shown).

Neither eNOS mRNA nor protein levels were affected by a 7-day treatment with a non-lipid lowering dose of rosuvastatin ($99.8 \pm 6\%$ of control, $p = 0.98$; Fig. 1 Supplemental file).

Total myocardial RhoA protein as well as both the cytosolic (inactive) and membrane (active) fractions was determined by immunoblotting. As depicted in Fig. 4A the total amount of RhoA was unchanged. However, R markedly decreased RhoA translocation, measured as membrane-to-cytosol ratio ($p < 0.001$ vs. C; Fig. 4B).

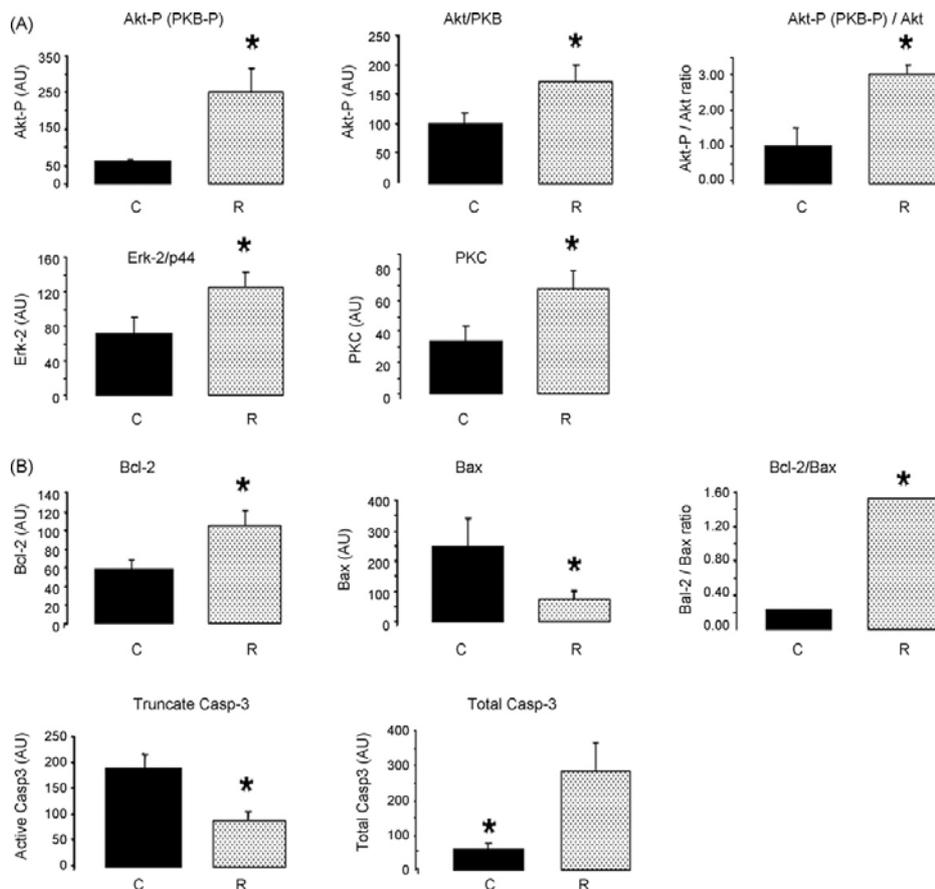


Fig. 2. Protein expression levels in the infarct border zone of several components of the RISK pathway (A) and apoptotic cascade (B) in both control (C) and rosuvastatin-treated animals (R). * $p < 0.05$ vs. control animals (C).

Table 1
Echocardiography analysis of heart function (left ventricle ejection fraction).

	BSL	Post-AMI	Sacrifice
A			
R			
Mean	77.5	54.5 [*]	66.6 [†]
S.E.M.	3.2	4.2	3.3
C			
Mean	75.4	59.5 [*]	61.4 ^{**}
S.E.M.	4.5	3.4	3.8
	BSL vs. Post-AMI		Post-AMI vs. SAC
B			
R			
Mean	23.0 [*]		-12.21 [†]
S.E.M.	1.4		1.6
C			
Mean	15.9 [*]		-1.9 ^{**}
S.E.M.	2.1		0.4
	BSL vs. post-AMI (% change)		Post-AMI vs. SAC (% change)
C			
R			
Mean	-30.1 [*]		23.7 [†]
S.E.M.	2.5		4.5
C			
Mean	-21.0 [*]		3.1 ^{**}
S.E.M.	2.2		0.5

* $p < 0.0005$ vs. baseline.† $p < 0.0006$ vs. post-AMI.** $p < 0.05$ vs. post-AMI.**3.4.2. Mito-Tracker[®] and Annexin-V detection by confocal analysis**

When compared to R-treated animals cardiac tissue from C animal showed both an evident “ballooning/swelling” of the mitochondria (Fig. 5-I) and a marked exposition of phosphatidylserine (PS) on the outer leaflet of the cell surface. Annexin positive area was reduced an average 87% in rosuvastatin-treated animals ($1.5 \pm 0.4\%$ in C animals and $0.2 \pm 0.06\%$ in R-treated animals; $p < 0.05$; Fig. 5-II).

3.4.3. Leukocyte infiltration

Histopathologic analysis of the peri-infarcted myocardial zone showed a significant reduction in inflammatory-cell infiltrates ($23.8 \pm 4.6\%$ vs. $9.3 \pm 2.3\%$; $p < 0.05$; Fig. II Supplemental file).

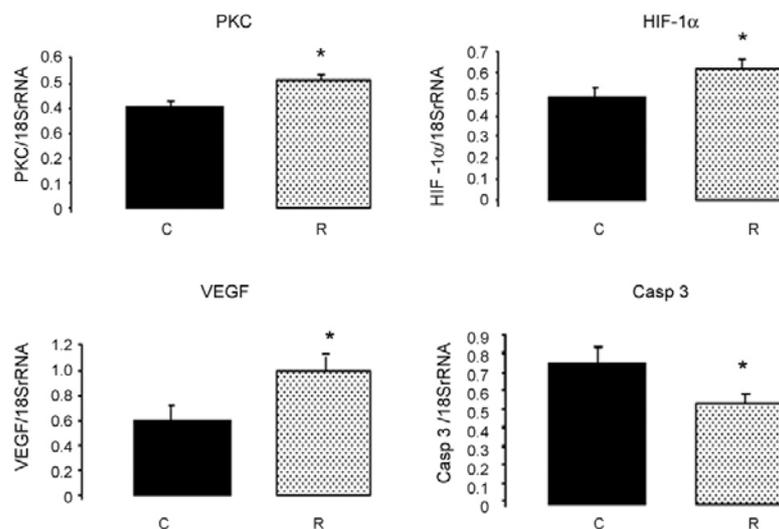
3.5. Effect of rosuvastatin on CFUs development

PBMCs obtained from C and R-treated animals showed a comparable ability to form CFUs at both tested periods, just at AMI induction (14 ± 7 and 31 ± 8 CFUs/ 1×10^6 cells in C group and the group to be treated with R, respectively) and at sacrifice (46 ± 13 and 56 ± 11 CFUs/ 1×10^6 cells in C and R-treated animals, respectively). Indeed, the increase in CFU during the 7 days post-AMI were similar in C (32 ± 6 CFUs/ 1×10^6 cells) and R group (25 ± 3 CFUs/ 1×10^6 cells).

4. Discussion

The results of the present study show that inhibition of HMG-CoA reductase by oral administration of rosuvastatin in the early hours after MI and for 7 days thereafter is associated with: (1) a marked activation of the cardioprotective RISK signalling transduction pathway; (2) increase in pro-survival anti-apoptotic markers; (3) reduction in the extent of infarct size by 7% (a relative reduction of 36%); and (4) heart function restoration by 12% (a relative recovery of 24%). Moreover, all these effects were observed with no variations in plasma lipid levels suggesting that rosuvastatin cardioprotection was likely derived from blocking the isoprenylation and subsequent membrane translocation of members of the Rho GTPase family, for instance RhoA [26].

It is well established that the final MI size is a major determinant of mortality and post-MI remodeling. Thus, investigation of strategies for the amelioration and preservation of myocardial cell viability is a matter of great interest [16,27]. Recent experimental studies have demonstrated the cardioprotective actions of both lipophilic [13] and hydrophilic [28] statins in the setting of MI beyond cholesterol effects. The mechanisms by which statins induce myocardial salvage have been independently associated to either activation of the PI3K/Akt/eNOS pathway, to antioxidant and anti-inflammatory actions, or to stem cell mobilization [13,21,28,29]. However, a system biological approach analysing

**Fig. 3.** Gene expression in the peri-infarcted myocardium assessed by real-time PCR in both control (C)- and rosuvastatin (R)-treated animals. * $p < 0.05$ vs. control animals (C).

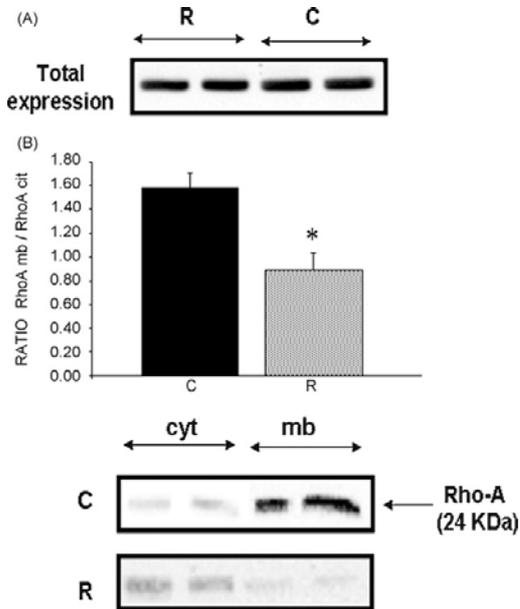


Fig. 4. Evaluation of RhoA activation in the peri-infarcted myocardium determined by western blot analysis. (A) Total RhoA protein expression. (B) Cytosolic (inactive) and membrane (active) RhoA fractions. * $p < 0.001$ vs. C.

HMG-CoA/myocardial RhoA effects, activation of the RISK signalling pathway, myocyte damage reduction and restoration of heart function, as demonstrated in the present study, has not been addressed previously. Indeed, the attenuation of inflammatory-cell recruitment to the peri-infarcted area detected in rosuvastatin-treated animals might have also contributed to rescue the infarcted heart.

The primary beneficial effects derived from HMG-CoA reductase inhibitors is the inhibition of cholesterol synthesis and subsequent plasma lipid lowering. However, in order to exclude such lipid-lowering beneficial effects we maintained the animals in a hypercholesterolemic diet throughout all the study. This model allowed us to mainly attribute rosuvastatin cardioprotective effects to the prevention of isoprenylation of small G-protein functions. In fact, we observed a pronounced inhibition of RhoA translocation to the membrane (i.e., inactivation). In its turn, RhoA inhibition by statins has shown to activate protein kinase B (i.e., Akt) [30]. Our results not only support these previous findings, but also attribute to statin treatment a marked up-regulation of PKC (downstream target of Akt) and Erk-2/p44 MAPK and its downstream cardioprotective targets HIF-1 α and VEGF (Fig. III Supplemental file). Furthermore, such statin-derived cardioprotective effects seemed unrelated to both JNK and p38 MAPKs. Our data also suggests that activation of the RISK pathway may lead to the triggering of several anti-apoptotic signals such as Bcl-2 increase and Bax reduction, avoiding mitochondria depolarization and further its release of mitochondrial-related mediators (e.g., cytochrome-c). Rosuvastatin's halt of the apoptotic process through mitochondria preservation was histologically evidenced by the nearly normal mitochondrial staining observed in rosuvastatin-treated animals. This overall increase in pro-survival signals eventually translated in less phosphatidylserine exposure, reduced truncated caspase-3 detection, lower infarct size, and improved heart function

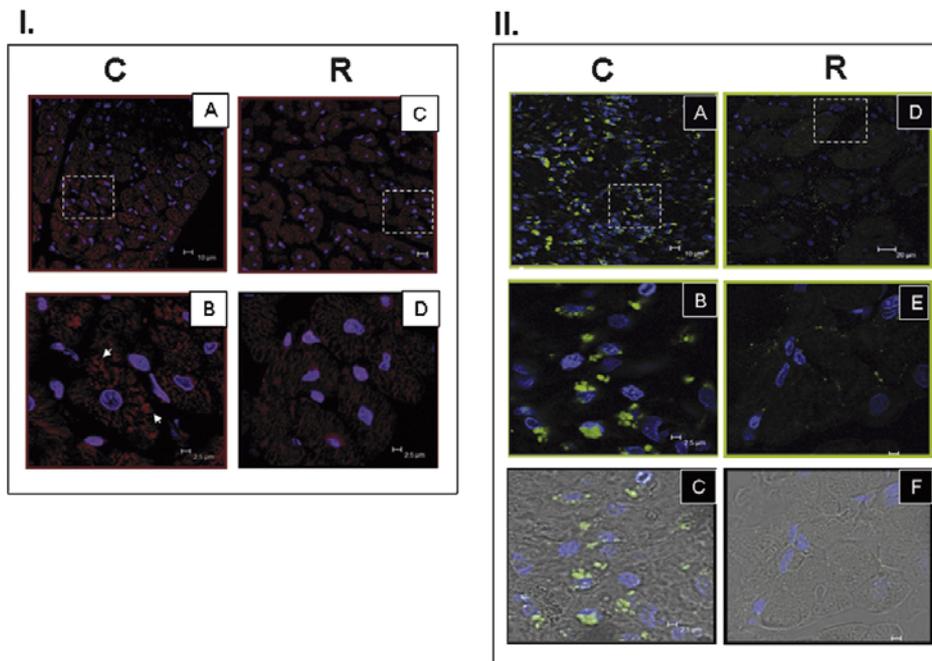


Fig. 5. Mitochondrial shape analysis and Annexin-V staining by confocal microscopy. (I) Cardiac tissue from control (C) animals (A and B) showed an evident "ballooning" of the mitochondria as compared to the nearly normal mitochondrial staining observed in rosuvastatin (R)-treated animals (C and D). (II) Heart sections from C (A–C) and R (D–F)-treated animals. R treatment exhibited a marked reduction in Annexin-V signal (green) when compared to C animals. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

(Fig. III Supplemental file). These potential RISK-related protective effects of rosuvastatin on the apoptotic cascade are detected after a 7-day treatment, starting early after MI-revascularization. Because apoptosis develops progressively and peaks in the later phase of reperfusion (after several days) [31], the switch off induced by rosuvastatin seems very relevant.

Blockade of the HMG-CoA reductase has shown to exert anti-inflammatory actions and increase eNOS expression and activity in various organs. We observed a marked reduction in inflammatory-cell recruitment (also likely through RhoA inhibition) [32] in the peri-infarcted area, however, we did not detect any differences in cardiac eNOS gene and protein expression between rosuvastatin and control animals. Indeed, whereas some studies have attribute to statin therapy a marked increase in both mRNA and protein expression levels [20,21], other reports have not [22]. We cannot exclude effects on eNOS bioactivity without affecting enzyme expression in our study. In addition, we could neither evidence any difference between both groups in CFU formation, likely excluding statin-related acute mobilization of endothelial progenitor cells (EPCs) as a mechanism to explain the improvement in myocardial function herein measured.

Our methodological approach for sample collection is based in our previous experience with MRI analysis in this model [23]. We observed that in the conditions of ischemia/reperfusion used in this study the penumbra area shown by MRI is of approximately 5 mm around the infarct. However, to completely rule out a “contamination” of peri-necrotic samples with non-ischemic tissue, we collected remote non-ischemic myocardium. Since we have detected a much lower expression of the tested proteins in the remote myocardium, the occurrence of a confounding tissue sampling would at most undervalue our findings of regulatory effects of treatment in the peri-necrotic tissue.

As a limitation in this study we have analyzed rosuvastatin effects in the whole cardiac tissue without in depth analysis of individual cellular components (e.g., myocytes, fibroblasts, white cells infiltrate). Undoubtedly, further studies will be required to investigate specific rosuvastatin-related cellular and molecular regulation of cardiac function restoration.

In summary, the present study demonstrates that HMG-CoA inhibition early after reperfusion of an occluded artery coordinately activates the salvage RISK kinases and reduces the extent of damaged myocardium distal to the culprit coronary injury restoring heart function.

Acknowledgements

We thank AstraZeneca for kindly providing Rosuvastatin. GV, EP, LC, and LB are members of CIBEROBN-Institute Carlos III. GV is a Juan de la Cierva Investigator of MEC (Spain). Authors are indebted to P. Catalina, M.A. Cánovas, S. Huertas, O. García, and M.A. Velasco for their technical help.

Funding: This work was supported by PNS 2006-10091 (to LB) from the Spanish Ministry of Science; Grant-in-Aid of Spanish Society of Atherosclerosis (to GV); Lilly Foundation (to LB) and CIBER OBN06 (to LB). We thank Fundacion Jesus Serra, Barcelona, for their continuous support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.atherosclerosis.2009.02.009.

References

- Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group. *N Engl J Med* 1995;333:1301–7.
- Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1999;344:1383–9.
- Ray KK, Cannon CP. Intensive statin therapy in acute coronary syndromes: clinical benefits and vascular biology. *Curr Opin Lipidol* 2004;15:637–43.
- Nissen SE, Nicholls SJ, Sipahi I, et al. Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial. *JAMA* 2006;295:1556–65.
- Jensen LO, Thyssen P, Pedersen KE, Stender S, Haghfelt T. Regression of coronary atherosclerosis by simvastatin: a serial intravascular ultrasound study. *Circulation* 2004;110:265–70.
- Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation* 1998;97:1440–5.
- Massy ZA, Keane WF, Kasiske BL. Inhibition of the mevalonate pathway: benefits beyond cholesterol reduction? *Lancet* 1996;347:102–3.
- Treasure CB, Klein JL, Weintraub WS, et al. Beneficial effects of cholesterol-lowering therapy on the coronary endothelium in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1995;332:481–7.
- Casani L, Sanchez-Gomez S, Vilahur G, Badimon L. Pravastatin reduces thrombogenicity by mechanisms beyond plasma cholesterol lowering. *Thromb Haemostasis* 2005;94:1035–41.
- Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med* 2001;7:687–92.
- Kivipelto M, Solomon A, Winblad B. Statin therapy in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol* 2005;4:521–2.
- Brouillette SW, Moore JS, McMahon AD, et al. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet* 2007;369:107–14.
- Lefer DJ, Scalia R, Jones SP, et al. HMG-CoA reductase inhibition protects the diabetic myocardium from ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 2001;15:1454–6.
- Bell RM, Yellon DM. Atorvastatin, administered at the onset of reperfusion, and independent of lipid lowering, protects the myocardium by up-regulating a pro-survival pathway. *J Am Coll Cardiol* 2003;41:508–15.
- Chen MS, Xu PP, Wang YZ, et al. Statins initiated after hypertrophy inhibit oxidative stress and prevent heart failure in rats with aortic stenosis. *J Mol Cell Cardiol* 2004;37:889–96.
- Rodriguez-Sinovas A, Abdallah Y, Piper HM, Garcia-Dorado D. Reperfusion injury as a therapeutic challenge in patients with acute myocardial infarction. *Heart Fail Rev* 2007;12:207–16.
- Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994;94:1621–8.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. The mitochondrial permeability transition pore: its fundamental role in mediating cell death during ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2003;35:339–41.
- Hausenloy DJ, Yellon DM. Reperfusion injury salvage kinase signalling: taking a RISK for cardioprotection. *Heart Fail Rev* 2007;12:217–34.
- Jones SP, Gibson MF, Rimmer 3rd DM, et al. Direct vascular and cardioprotective effects of rosuvastatin, a new HMG-CoA reductase inhibitor. *J Am Coll Cardiol* 2002;40:1172–8.
- Di Napoli P, Taccardi AA, Grilli A, et al. Chronic treatment with rosuvastatin modulates nitric oxide synthase expression and reduces ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Cardiovasc Res* 2005;66:462–71.
- Bulhak AA, Gourine AV, Gonon AT, et al. Oral pre-treatment with rosuvastatin protects porcine myocardium from ischaemia/reperfusion injury via a mechanism related to nitric oxide but not to serum cholesterol level. *Acta Physiol Scand* 2005;183:151–9.
- Ibanez B, Prat-Gonzalez S, Speidl WS, et al. Early metoprolol administration before coronary reperfusion results in increased myocardial salvage: analysis of ischemic myocardium at risk using cardiac magnetic resonance. *Circulation* 2007;115:2909–16.
- Sharma RK, Otsuka M, Pande V, Inoue J, Joao Ramos M, Evans Blue is an inhibitor of nuclear factor-kappa B (NF-kappaB)-DNA binding. *Bioorg Med Chem Lett* 2004;14:6123–7.
- Casani L, Segales E, Vilahur G, Bayes de Luna A, Badimon L. Moderate daily intake of red wine inhibits mural thrombosis and monocyte tissue factor expression in an experimental porcine model. *Circulation* 2004;110:460–5.
- Brown JH, Del Re DP, Sussman MA. The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits. *Circ Res* 2006;98:730–42.
- Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 1998;97:276–81.
- Bao N, Minatoguchi S, Kobayashi H, et al. Pravastatin reduces myocardial infarct size via increasing protein kinase C-dependent nitric oxide, decreasing oxyradicals and opening the mitochondrial adenosine triphosphate-sensitive potassium channels in rabbits. *Circ J* 2007;71:1622–8.
- Tiefenbacher CP, Kapitzka J, Dietz V, Lee CH, Niromand F. Reduction of myocardial infarct size by fluvastatin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H59–64.
- Liao JK. Statin therapy for cardiac hypertrophy and heart failure. *J Invest Med* 2004;52:248–53.
- Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP, et al. Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion. *Apoptosis* 2001;6:279–90.
- Cordle A, Koenigsnecht-Talboo J, Wilkinson B, Limpert A, Landreth G. Mechanisms of statin-mediated inhibition of small G-protein function. *J Biol Chem* 2005;280:34202–9.