

TESI DOCTORAL

**Mecanismes de formació del trombe en condicions de flux arterial:
efecte de la proteïna C-reactiva i de la rosuvastatina**

Blanca Molins Monteys

Directors: Dra. Lina Badimon i Dr. Carlos Mendieta

Tutor: Dr. Santiago Ambrosio

Programa de Doctorat de Biomedicina (bienni 2005-2007)

Departament de Ciències Fisiològiques II

Facultat de Medicina

Universitat de Barcelona

Barcelona juliol 2009

Universitat de Barcelona
Facultat de Medicina
Departament de Ciències Fisiològiques II
Programa de Doctorat de Biomedicina (bienni 2005-2007)

**Mecanismes de formació del trombe en condicions de flux arterial: efecte
de la proteïna C-reactiva i de la rosuvastatina**

Memòria presentada per l'Enginyera Química Blanca Molins Monteys per aspirar al grau de Doctora per la Universitat de Barcelona. Aquest treball ha estat realitzat sota la direcció de la Dra. Lina Badimon Maestro i el Dr. Carlos Mendieta Fiter a l'Institut Català de Ciències Cardiovasculars, CSIS-ICCC.

Els directors

El tutor

La doctoranda

AGRAÏMENTS

Sois muchos y muy variados los que me habéis aguantado, enseñado, soportado, animado y ayudado en esta broma de la tesis. A todos mil gracias!!!

En primer lloc, Lína, gràcies per oferir-me l'oportunitat i el repte de treballar amb tu en el teu grup. Gràcies per tot. Gràcies per dedicar-me el teu temps, gràcies per totes les converses, tots els consells i, sobretot sobretot, gràcies per confiar en mí!

Gràcies al Dr. Carlos Mendieta i al Departament d'Odontostomatologia per acollir-me al seu grup. Gràcies a L'AGAUR per les beques FI i BE. Gràcies també al Dr. Santiago Ambrosio per accedir a fer de tutor i per l'ajut amb els papers i tràmits de la tesi.

Elazer, thank you for giving me the opportunity to join your lab as an undergraduate and introducing me to science (a good friend of you). Thank you for your advice during all these years.

Bueno Esther, gràcies! Aquesta tesi és gairebé teva. Gràcies per aquests 5 anys, per suportar-me i aconsellar-me des del primer dia. Gràcies per les hores a proteòmica, per les classes de biologia, per les interminables sessions al confocal. Saps que treballo amb plaquetes? Gràcies pels Halls, per l'ordinador, per la taula, pels cafès (te debo un café), pel medi de muntatge sense bombolles..., per tot.

Gracias a todos los de la UEA; A Laura por las lecciones de anatomía porcina, a Pablo y Mari por todos los manolillos pinchados y a Carol y los de Cardio por proporcionarme muestra siempre que la he pedido.

Al laboratorio 004, gracias por aguantar mi desorden durante mi paso por proteómica. Gracias sobre todo a Maísa, por conseguir que me gustara jugar con el MALDI y a José Luis ,por la ayuda con el Image Master, con los listados y por las clases de lingüística.

Al 005, mil gracias por hacer la tesis conmigo. Turu, my friend, gracias por todo, por los consejos, por las caipís y por tantas risas. Y qué? Gràcies per preocupar-te per mí. Juakins, gracias por las historias amenizantes y por la oferta musical del labo. Te imaginas?. Pinche Rodri, gracias por tu paciencia, güey, y por estar siempre siempre dispuesto a ayudar en lo que sea. Mónica P, moltíssimes gràcies pel teu ajut en tants experiments i

extraccions i per les lliçons de perruqueria. Raquel gràcies pels teus consells RNAsa free. Javier gracias por tu amabilidad desde las 8 am y, Blanca O, gracias por estar siempre de buen humor.

Maribel, Nía, Sonia H, gràcies per ensenyar a un enginyer a fer westerns. Olaya, gracias por la ayuda de estos últimos meses y por entender mi desorden. Crespo, gracias por las sesiones de citometría sin isotipos.

A los no fumadores exentos de ibuprofenos y aspirinas en los últimos 10 días muchííííísimas gracias por vuestras plaquetas!

Gemma Arderiu, M^a Borrell, Mónica T, Chema, Rosa A, Mark Slevin, Oriol J, John, y Pablo F gracias (thank you) por las conversaciones científicas y por los ánimos de estos últimos meses. Gemma V, gràcies per tot i per les revisions setmanals enviades des de NY, vaig aprendre molt. Vicenta, gracias por tu interés por todo y por tener la puerta del despacho siempre abierta.

A los compis del pínpon gracias por todas las partidas. A María de Burgos, Jordi, Xevi, Javi F, Marta V gracias por vuestros ánimos incansables mientras escribía.

Judith gracias por el hulahop, por la SEA y por todo. Sandra gracias por tu ayuda con las estatinas, con RhoA, con el TF y con todo y gracias por los experimentos combinados que encima salieron bien!

Paulaaa gracias por todo, por tantas risas, por entender tan bien mi indecisión total (oojjjggh), por aguantar mi dosis de mal humor casi diaria de estos meses y por compartir la conquista de las Américas desde Rochester, Minnesota.

Al sector peperoni, Roberta, Ilaria, Valentina y Maurizio, grazie mille por vuestro buen humor y por "perfeccionar" mi nivel de italiano. Laura N y Marta C gracias por todo, por estar siempre dispuestas a ayudar en lo que sea de buen humor, sois la bomba. Vanessa gràcies per tot i per cuidar-nos tant. María y Elena gracias por todos estos años de buen humor. Roí, Jose, Carlota y los de Pepe, gracias por apuntaros a lo que sea!

A todos los que habéis pasado o todavía estáis en el ICC, gracias. A los que me cruzo por el pasillo (Jerónimo y su labo, Leif y todos los de Cardío). Gracias también a los que con vuestro trabajo nos facilitáis el día a día: Carmen gracias porque siempre tenemos puntas. Sílvia y M^a gracias por vuestra ayuda con papeleos varios. Montse S també gràcies per

estar sempre dispostada a donar un cop de mà. Núria gràcies pel teu interès des de l'altra banda del passadís.

I would like to thank Prof. Zaverio M. Ruggeri for giving me the opportunity to join his lab at Scripps not only once, but twice. Thank you for the biomechanics lessons, for all the help with the flow experiments in the microscope, and thank you for the Italian lessons and the Italian coffee. Patri, Alessandro, Anto, Mariko, Yuichi, Jennifer and all Ruggeri's lab thank you for your help and for making me feel part of the group from the very beginning. Gian Marco, now is my ciellino moment! Thank you for being like my big brother (or my grandpa) during all the time I stayed in SD. Thanks for all the time in front of Metamorph and the hours spent in the microscope and fighting with the beads. Thanks for making me feel like at "om". Ana, Pablo y Urtzi gracias por contribuir tanto en que mi estancia en SD fuese genial!

A las de la uni (yo también en estricto orden alfabético): Carla, Diana, Elsa, Fina y María, GRACIAS por todo. Gracias por estar ahí, por aguantar lo que sea, por hacerme reír tanto, por sacarme a paseaaaaaar...

A los braulís, (Perearniau, Padilla y Jaime), a Mercedes, Ana, Leti y a todos mis friends, muchas gracias por todo!

Y gracias a tooooooda mi familia; hermanos/as, primos/as, tíos/as, sobrinos/as, más primos/as, más tíos/as... Tío Jorge, gracias por fardar de sobrina en el dentista. Tito gracias por ser mi padrino, Eulalia gracias por dejarme ser una más de tus sobrinas preferidas! Primíns Rita y Carmen, gracias por todo y por seguir pensando que algún día os jubilaré.

Juan, Lourdes, Espe, Javier, Ori y Blanca, gracias! Gracias por todo lo que he aprendido de vosotros, por ejercer de hermanos mayores y de padres jovenzuelos.

Bueno papás, gracias por tantas cosas... Gracias por todas las oportunidades que me habéis dado, por haberme dejado aprovecharlas. Gracias por entender (más o menos) mis decisiones e indecisiones. Por todo, gracias!

Als meus pares

Als meus germans grans

ÍNDEX

ABREVIATURES	19
LLISTAT DE FIGURES	25
INTRODUCCIÓ	29
1. MALALTIES D'ORIGEN ATEROSCLERÒTIC	31
2. PARET VASCULAR	33
2.1. Íntima	33
2.2. Mèdia	34
2.3. Adventícia	34
2.4. Efecte de l'entorn biomecànic sobre la paret vascular	35
3. FISIOPATOLOGIA DE L'ATEROTROMBOSI	37
3.1. Inici i progressió de les lesions ateroscleròtiques	37
3.2. Complicació de la lesió ateroscleròtica	40
3.3. Factors causals en la progressió de l'aterosclerosi. Plaques d'alt risc	42
3.3.1. Inflamació	42
3.3.2. Neovascularització	44
3.3.3. Fatiga	44
3.3.4. Sang vulnerable	45
4. FORMACIÓ DEL TROMBE ARTERIAL. IMPLICACIÓ DE LES PLAQUETES	46
4.1. Efecte del flux en la formació del trombe	47
4.2. Morfologia de les plaquetes	48
4.2.1. Receptors plaquetars	50
4.3. Adhesió plaquetària	51
4.4. Activació plaquetària i activitat procoagulant	53
4.5. Canvi de forma de les plaquetes	55
4.5.1. Proteïnes Rho	56
4.6. Agregació plaquetària	57
4.7. Coagulació i fibrinolisi	57
5. FACTORS DE RISC DE L'ATEROTROMBOSI	59
5.1. Tabaquisme	59
5.2. Sedentarisme	60
5.3. Diabetis i obesitat	60
5.4. Hipertensió	60
5.5. Dislipèmies	61
6. ESTATINES EN ATROTROMBOSI	62
7. PAPER DE LA CRP COM A MARCADOR I MODULADOR DE L'ATEROTROMBOSI	65
7.1. CRP com a marcador de risc cardiovascular	65
7.2. Conformacions de la CRP	66

7.3. CRP nativa	67
7.3.1. Localització	67
7.3.2. Estudis <i>in vitro</i>	68
7.3.3. Models animals	69
7.4. CRP modificada.....	70
7.4.1. Localització	70
7.4.2. Estudis <i>in vitro</i>	71
7.4.3. Models animals	72
OBJECTIUS	75
METODOLOGIA	79
1. PREPARACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE natCRP I mCRP I DELS SEUS ANTICOSSOS ..	81
1.1. Obtenció de natCRP i mCRP	81
1.2. Caracterització dels anticossos	81
1.3. Caracterització de mCRP i natCRP: Electroforesi i dot blot	82
2. OBTENCIÓ DE SANG I PLAQUETES	84
3. EXPERIMENTS DE PERFUSIÓ IN VITRO AMB CAMBRA PLANA.....	85
3.1. Preparació de substrats trombogènics	85
3.2. Cambra de perfusió.....	85
4. VISUALITZACIÓ DE LA DEPOSICIÓ PLAQUETÀRIA I DE LA FORMACIÓ DEL TROMBE PER MICROSCOPIA LÀSER CONFOCAL	89
5. IMMUNOFLUORESCÈNCIA DE PLAQUETES	90
5.1. Plaquetes adherides	90
5.2. Plaquetes en suspensió	91
6. CITOMETRIA DE FLUX	92
7. PROTEÒMICA DE PLAQUETES	94
7.1. Extracció de proteïna	94
7.2. Electroforesi bidimensional (2-DE).....	95
7.3. Anàlisi diferencial d'imatge	96
7.4. Identificació de proteïnes per espectrometria de masses (MALDI-TOF).....	97
7.4.1. Preparació de les mostres.....	97
7.4.2. Espectrometria de masses	97
8. OBTENCIÓ DE PROTEÏNA. SUBFRACCIONAMENT DE PLAQUETES	99
8.1. Lisat total	99
8.2. Subfraccionament de plaquetes.....	99
9. WESTERN BLOT.....	100
10. IMMUNOPRECIPITACIÓ	101
11. TÈCNiques ADDICIONALS QUE ES DESCRUIEN AMB DETALL ALS ARTICLES	102

RESULTATS	103
ARTICLE i:.....	105
article ii:	123
ARTICLE III:	135
DISCUSSIÓ	171
CONCLUSIONS	183
BIBLIOGRAFIA	187
ANNEX	211

ABREVIATURES

2-DE: electroforesi bidimensional
AA: àcid araquidònic
ACTH: hormona adrenocorticotròpica
ADP: adenosina difosfat
ATP: adenosina trifosfat
AP1: proteïna activadora-1
ApoB: apolipoproteïna B
ApoE^{-/-}: apolipoproteïna E^{-/-}
ARA: antagonistes del receptor de l'angiotensina II
ARN: àcid ribonucleic
ARNm: ARN missatger
AT-1: angiotensina-1
BCA: àcid bicinconínic
BSA: albúmina de sèrum boví
cAMP: adenosin monofosfat cíclic
cGMP: guanosin monofosfat cíclic
CHO: *chinese hamster ovary*, ovari de hamster xinès
COX-2: ciclooxigenasa-2
CML: cèl·lules musculars llises
CRP: proteïna C-reactiva
CRPtg: transgènic de CRP humana
DAG: diacilglicerol
ECA: enzim convertidor de l'angiotensina
EDTA: àcid etilendiamino tetraacètic
FITC: isotiocianat de fluoresceïna
FS: *forward scatter*, mida relativa
GAP: proteïna acceleradora de l'activitat GTPasa
GDI: inhibidor de dissociació de GTP
GEFs: factors intercanviadors de nucleòtids
GP: glicoproteïna
GRP78: *78 kDa glucose-regulated protein*
GTP: guanosina-5'-trifosfat
HDL: lipoproteïnes d'elevada densitat
HMG-CoA: 3-hidroxi-3-metil-glutaril- Coenzim A
hsCRP: CRP ultrasensible
ICAM-1: molècula d'adhesió intercel·lular-1
IEF: isoelectroenfoc

IL-1 β : interleucina-1 β

IL-6: interleucina-6

IL-8: interleucina-8

IL-10: interleucina-10

IPG: *immobilized pH gradient*

I₃P: inositol-3-fosfat

LDL: lipoproteïnes de baixa densitat

LPS: lipopolisacàrids

LRP-1: proteïna relacionada amb el receptor de les LDL-1

MALDI-TOF: *matrix assisted laser desorption ionization-time of flight*

MAPK: *mitogen activated protein kinase*

MCP-1: proteïna quimiotàctica per monòcits tipus 1

mCRP: CRP modificada

MMP: metaloproteasa de matriu

MPs: micropartícules

NAD[P]H: nicotinamida adenin dinucleòtid fosfat

natCRP: CRP nativa

NF- κ B: *nuclear factor κ B*

NO: òxid nítric

PAI-1: inhibidor del plasminogen-1

PAR: receptor activat per proteasa

PBS: *phosphate buffer saline*

PCR: reacció en cadena de polimerasa

PDGF: factor de creixement derivat de plaquetes

PE: ficoeritrina

PGE₁: prostaglandina E₁

PGI₂: prostaglandina I₂

PKC: proteïna cinasa C

PLA₂: fosfolipasa A₂

PMF: *peptide mass fingerprint*, empremta peptídica

PMSF: *phenylmethanesulphonylfluoride*

PRP: plasma ric en plaquetes

RE: reticle endoplasmàtic

SC: *side scatter*

SDS: *sodium dodecyl sulfate*, dodecil sulfat sòdic

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, electroforesi en gel de poliacrilamida amb SDS

TBS: *tris buffer saline*

TF: factor tissular

t-PA: activador tissular del plasminogen

TNF- α : factor de necrosi tumoral- α

TXA₂: tromboxà A₂

uPA: activador del plasminogen tipus urocinasa

UPR: *unfolded protein response*, resposta a proteïnes no plegades

VASP: *vasodilator-stimulator phosphoprotein*

VCAM-1: molècula d'adhesió cel·lular vascular-1

vWF: factor de von Willebrand

LLISTAT DE FIGURES

- **Figura 1:** Evolució de la lesió ateroscleròtica
- **Figura 2:** Característiques dels vasos sanguinis
- **Figura 3:** Estructura de capes d'una artèria
- **Figura 4:** Representació esquemàtica de les forces hemodinàmiques que actuen a la paret arterial
- **Figura 5:** Inici de la lesió ateroscleròtica
- **Figura 6:** Formació de l'estria de greix i placa fibrosa
- **Figura 7:** Complicació de la lesió ateroscleròtica
- **Figura 8:** Artèries coronàries d'un individu que va patir mort sobtada
- **Figura 9:** Imatges de microscopia confocal de plaquetes activades
- **Figura 10:** Esquema d'una secció sagital d'una plaqueta
- **Figura 11:** Mecanisme d'adhesió plaquetària
- **Figura 12:** Mecanismes d'activació plaquetària
- **Figura 13:** Esquema de la via d'actuació de RhoA
- **Figura 14:** Via de la síntesi del colesterol
- **Figura 15:** Principals efectes beneficiosos relacionats amb les estatines
- **Figura 16:** Estructura de la rosuvastatina
- **Figura 17:** Estructura pentamèrica de CRP
- **Figura 18:** Efectes anti- i pro- inflamatoris de natCRP
- **Figura 19:** Efectes anti- i pro- inflamatoris de mCRP
- **Figura 20:** Afinitats d'unió a mCRP i natCRP dels anticossos anti-mCRP (clon 8C10) i anti nat-CRP (1D6)
- **Figura 21:** Electroforesi i dot blot de natCRP i mCRP.
- **Figura 22:** Esquema de la cambra plana de perfusió
- **Figura 23:** Relació de la velocitat de cisalla amb el cabal volumètric en funció de la geometria dels *gaskets*
- **Figura 24:** Representació del sistema de perfusió
- **Figura 25:** Imatge representativa de plaquetes marcades amb mepacrine adherides a col·lagen en experiments de perfusió.
- **Figura 26:** Imatge representativa d'immunofluorescència de plaquetes.
- **Figura 27:** Histograma representatiu d'una mostra de sang on es distingeix la població de plaquetes per la seva mida relativa (FS) i la seva complexitat interna (SC)
- **Figura 28:** Esquema de la formació de mCRP i el seu potencial efecte en la formació del trombe

INTRODUCCIÓ

1. MALALTIES D'ORIGEN ATEROSCLERÒTIC

Les malalties cardiovasculars són, segons l'Organització Mundial de la Salut, la primera causa de mortalitat total. S'estima que l'any 2005 van morir 17,5 milions de persones per causa d'aquestes malalties, el que representa un 30 % de la mortalitat arreu del món. Si no es prenen mesures apropiades, es preveu que l'any 2015 s'assolirà la xifra de 20 milions de defuncions anuals per malalties cardiovasculars (www.who.com Dades 2005). A Espanya, segons el Ministeri de Sanitat i Consum, els percentatges són similars, doncs l'any 2005 el percentatge de defuncions degut a malalties cardiovasculars va ésser del 32,8 % i a Catalunya del 30,9 %, essent la primera causa de mortalitat.

Les morts per malalties cardiovasculars afecten tant a homes com a dones per igual (les dones semblen estar més protegides gràcies a les hormones durant l'època fèrtil, però la incidència incrementa un cop arribada la menopausa) i, tot i que afecten de forma molt marcada a la població dels països desenvolupats, el 80 % de les morts es donen en països amb ingressos moderats o baixos.

L'aterosclerosi, complexa malaltia crònica de la paret vascular, és la causa de la majoria d'episodis patològics cardiovasculars entre els que s'inclou la malaltia cardíaca coronària (Fuster et al. 1992a; Fuster et al. 1992b; Stary 2000), les malalties cerebrovasculars i la malaltia vascular perifèrica. La major part dels casos d'infart agut de miocardi i infart cerebral són deguts, principalment, a obstruccions que impedeixen el pas de la sang als vasos que irriguen el cor i el cervell.

La naturalesa crònica del procés ateroscleròtic, que s'inicia durant les primeres dècades de la vida, condueix a la formació de la placa fibrosa, que consisteix en l'acumulació de material lipídic i proteoglicans, elements cel·lulars, teixit fibrós i dipòsits de calci. Segons l'Associació Americana del Cor, les lesions ateroscleròtiques es classifiquen en 8 tipus segons el seu grau de progressió. Les lesions ateroscleròtiques, a mesura que avancen, poden limitar eventualment el flux sanguini produint símptomes d'isquèmia crònica. Pel contrari, si la progressió produïda per una ruptura de la placa acompanyada de complicacions trombòtiques, es produeixen les síndromes agudes (Fuster et al. 1992a; Fuster et al. 1992b; Stary 2000) (Figura 1).

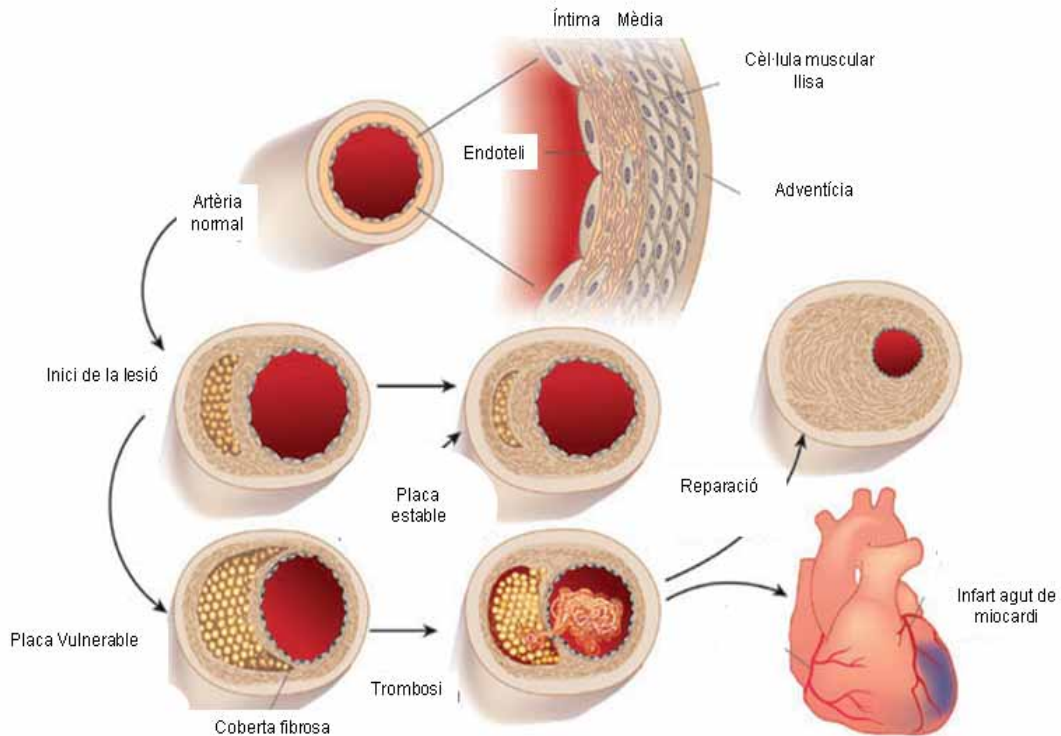


Figura 1. Evolució de la lesió ateroscleròtica. A les etapes inicials de l'aterogènesi el reclutament de cèl·lules inflamatòries i l'acumulació lipídica dona lloc a la formació del nucli lipídic. Si la inflamació perdura i prevaleixen els factors de risc, el nucli lipídic pot créixer. Aquests canvis poden debilitar la coberta fibrosa i fer que la placa sigui més propensa a la ruptura. La ruptura de la placa desencadena la formació del trombe. Si el trombe oclou el vas, es pot produir un infart de miocardi. Eventualment, el trombe pot reabsorbir-se i la resposta a la lesió dona lloc al remodelat vascular, que provoca l'engruiximent de la coberta fibrosa i l'expansió de la íntima, el que resulta en una constricció del lumen. Les lesions estenosades poden reduir el flux sanguini produint isquèmia, que sovint provoca símptomes com l'angina de pit. Les plaques estenòtiques avançades són més fibroses i són, per tant, menys susceptibles a la ruptura (Libby et al. 2002b).

2. PARET VASCULAR

El sistema vascular està compost d'artèries, arterioles, capil·lars, vènules i venes. Aquests tipus vasculars es distingeixen entre ells per la seva dimensió, morfologia i funció (Figura 2). Tot i aquestes diferències, tots els vasos sanguinis estan recoberts internament per una monocapa de cèl·lules endotelials. Depenent de la seva funció i localització, els vasos sanguinis poden variar molt en mida i propietats estructurals i mecàniques.

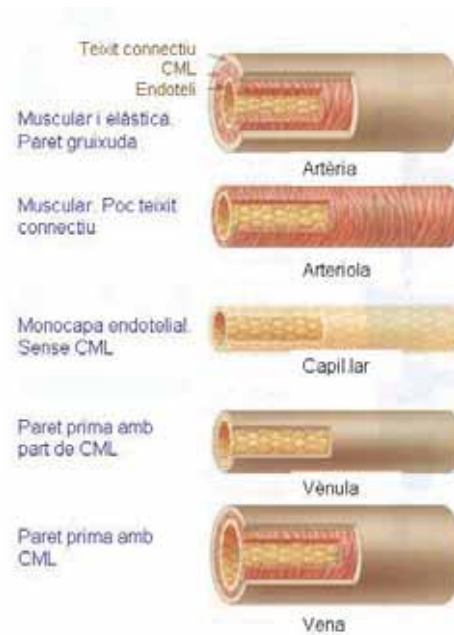


Figura 2. Característiques dels vasos sanguinis

La paret vascular arterial és un òrgan actiu i flexible, format per tres capes concèntriques de diferent composició cel·lular i material intersticial (Figura 3). Els diferents components formen un teixit dinàmic que s'adapta i reorganitza en resposta a diferents estímuls mecànics, tant fisiològics com patològics (Burke et al. 1997; Sambola et al. 2003).

2.1. Íntima

La túnica íntima és la capa més interna de l'artèria i està formada per l'endoteli i el subendoteli, que limita amb la làmina elàstica interna. L'endoteli està format per una monocapa de cèl·lules endotelials que recobreixen la llum del vas. L'endoteli manté l'homeòstasi vascular i actua com a barrera selectiva regulant l'intercanvi de molècules entre la sang i la paret vascular. L'endoteli juga un paper molt important en la regulació

del to vascular produint òxid nítric (NO) i prostaglandina I₂ (PGI₂) (Badimon et al. 2002). L'endoteli participa en la trombosi mitjançant la síntesi i alliberament de factors protrombòtics com l'inhibidor del plasminogen-1 (PAI-1), el factor VIII i el factor de von Willebrand (vWF) i factors antitrombòtics com l'activador tissular del plasminogen (t-PA), la trombomodulina, la ciclooxigenasa-2 (COX-2), el PGI₂ i el NO. El subendoteli és la làmina basal, constituïda per una fina capa de teixit conjuntiu. Per sota es troba la làmina elàstica interna, formada per una malla compacta d'elastina.

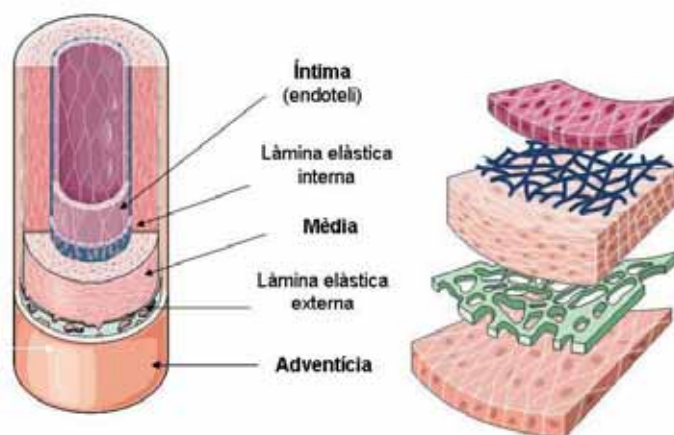


Figura 3. Estructura de capes d'una artèria

2.2. Mèdia

La túnica mèdia és la capa de major gruix. Està formada per cèl·lules musculars llisses de paret vascular (CML) disposades circular o helicoidalment respecte l'eix del vas, que s'encarreguen de mantenir el to vascular, i per matriu extracel·lular composta de diferents molècules com col·lagen i elastina. La túnica mèdia està delimitada exteriorment per la làmina elàstica externa i internament per la làmina elàstica interna.

2.3. Adventícia

La túnica adventícia és la capa més externa i està formada per teixit conjuntiu amb fibres de col·lagen, fibres elàstiques i fibroblasts. Aquest teixit conjuntiu es prolonga de forma gradual, relacionant-se amb les estructures veïnes. Per aquest teixit conjuntiu perivascular discorre una xarxa de vasos de molt poc calibre, els *vasa vasorum*, que ocasionalment penetren en la túnica mèdia i la seva funció sembla estar relacionada amb el metabolisme de la paret.

2.4. Efecte de l'entorn biomecànic sobre la paret vascular

Les cèl·lules de la paret vascular estan constantment exposades a forces mecàniques degut al flux sanguini. Les forces hemodinàmiques juguen un paper molt important en la fisiologia i patofisiologia de la paret vascular. Les principals forces hemodinàmiques generades a la vasculatura són l'esforç de cisalla a la paret, que actua tangencialment a l'eix longitudinal del vas degut al flux sanguini, l'esforç circumferencial, que canvia el diàmetre del vas com a conseqüència de la pulsilitat del flux sanguini i l'esforç de compressió, que actua perpendicular a la paret del vas degut a la pressió hidrostàtica (Dobrin et al. 1989) (Figura 4).

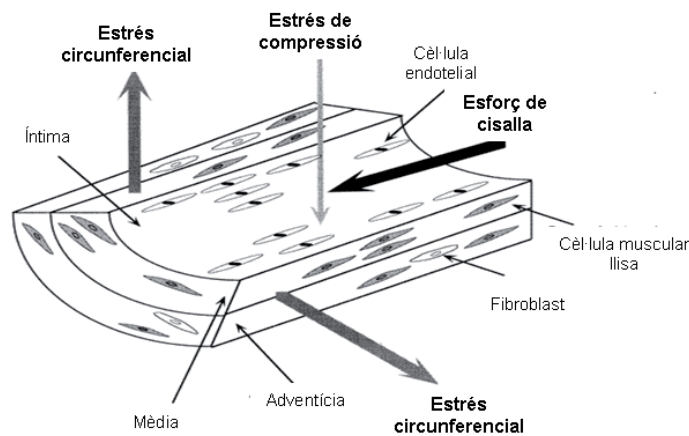


Figura 4. Representació esquemàtica de les forces hemodinàmiques que actuen a la paret arterial

Les cèl·lules endotelials estan constantment sotmeses a esforços de cisalla i esforços circumferencials, mentre que les capes subjacents de CML i fibroblasts estan principalment exposades a esforços circumferencials i nivells baixos d'esforç de cisalla provocats pel gradient de pressió transmural que produeix el flux intersticial a través de la paret vascular (Wang et al. 2000; Hahnet al. 2009). Les forces hemodinàmiques varien localment depenent de la geometria de les artèries. El rang de valors de cadascuna d'aquestes forces es mostra a la taula següent:

Taula 1. Forces hemodinàmiques als diferents tipus de vasos sanguinis

Paràmetre	Origen	Rang Fisiològic
Esforç de cisalla	Força de fricció deguda al flux	6-40 dines/cm ² artèries 8 dines/cm ² capil·lars 1-5 dines/cm ² venes
Esforç de compressió	Pressió hidrostàtica	1-5 dines/cm ² venes
Esforç circumferencial	Canvis en el diàmetre del vas	2-18 % artèries
Pulsatilitat	Batec del cor	1-2 Hz artèries 0 Hz capil·lars i venes

En regions rectes de les artèries la velocitat del flux sanguini canvia durant el cicle cardíac, però el flux és manté en la mateixa direcció amb perfil laminar. El flux laminar es caracteritza per làmines de fluid paral·leles, circulant a diferents velocitats sense barrejar-se, creant un perfil de velocitat parabòlic (Goldsmith et al. 1986). La velocitat és màxima a l'eix del flux sanguini, disminueix gradualment cap a la paret vascular, i es fa zero a la paret. D'aquesta manera es generen esforços de cisalla entre capes adjacents de fluid que esdevenen màxims a la paret. En canvi, a zones de la vasculatura com bifurcacions, curvatures i àrees estenosades apareixen perfils de flux complexos que inclouen velocitats de flux baixes, separació de flux, gradient de flux, flux revers i, en limitades ocasions, turbulència (Malek et al. 1999). Aquests perfils de flux s'engloben sota el terme "flux alterat".

Les forces hemodinàmiques modulen la funció vascular induint l'alliberament, per part de l'endoteli, de molècules implicades en el control del to i remodelat vascular i en les interaccions cèl·lula-cèl·lula (Davies 1995).

3. FISIOPATOLOGIA DE L'ATEROTROMBOSI

3.1. Inici i progressió de les lesions ateroscleròtiques

Les alteracions de l'endoteli es consideren un procés causal en el desenvolupament de les lesions ateroscleròtiques, ja que comprometen la capacitat de les cèl·lules endotelials de regular la seva funció i mantenir l'homeòstasi de la paret vascular (Ross et al. 1976a; Ross et al. 1976b).

La hipòtesi més estesa actualment descriu l'aterosclerosi com una malaltia inflamatòria crònica (Ross 1999) desencadenada per factors tant locals (hemodinàmics) com sistèmics (hipertensió, hipercolesterolèmia, infeccions, etc). La disfunció endotelial es considera un procés causal en l'aterosclerosi (Verma et al. 2002). Es caracteritza per una reducció de la biodisponibilitat de vasodilatadors, concretament de NO, i per un augment de factors contràctils, així com per un augment de la permeabilitat endotelial i d'estrès oxidatiu (Kinlay et al. 2001). L'augment de la permeabilitat endotelial facilita l'entrada de macromolècules, sobretot lipoproteïnes de baixa densitat (LDL) i fibrinogen. L'augment d'estrès oxidatiu es considera un procés rellevant en la patogènesi de la disfunció endotelial i podria ésser la via comú de l'efecte de factors de risc sobre l'endoteli. L'endoteli disfuncional promou la proliferació de CML, la síntesi o proteòlisi de matriu extracel·lular, la inflamació i l'activació de les plaquetes. La clara predisposició a desenvolupar lesions ateroscleròtiques de zones de l'arbre arterial en les que el flux sanguini es veu alterat (bifurcacions o curvatures) indica la importància de les condicions hemodinàmiques locals en el desenvolupament de l'aterosclerosi. De fet, s'ha demostrat que canvis aguts en el perfil del flux modulen l'expressió de gens a l'endoteli (Malek et al. 1999). L'endoteli disfuncional genera un ambient proaterogènic mitjançant la secreció de factors proinflamatoris, proliferatius i protrombòtics.

La disfunció endotelial promou el reclutament de leucòcits, degut a l'augment d'expressió de molècules d'adhesió, com la molècula d'adhesió cel·lular vascular-1 (VCAM-1), la molècula d'adhesió intercel·lular-1 (ICAM-1), E-selectina i la proteïna quimiotàctica per monòcits tipus 1 (MCP-1) (Dong et al. 1998; Collins et al. 2000). Els leucòcits adherits a l'endoteli transmigren a l'espai subendotelial, on es diferencien a macròfags, capten gran quantitat de molècules de colesterol i ésters de colesterol procedents de LDL i es transformen en cèl·lules escumoses (Kunjathoor et al. 2002), un dels components cel·lulars característics de la lesió ateroscleròtica (Fuster et al. 1992a; Fuster et al. 1992b). Un desequilibri en el balanç d'entrada i sortida de lipoproteïnes, així com la seva interacció amb la matriu extracel·lular i posterior modificació contribuiran a la progressió de la lesió ateroscleròtica inicial (Figura 5).

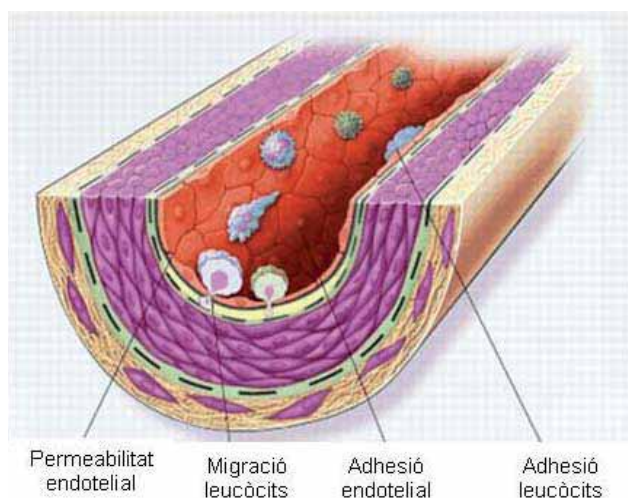


Figura 5. Inici de la lesió ateroscleròtica. Es produeixen alteracions a l'endoteli i infiltració de LDL. Es produeix un augment de molècules d'adhesió que afavoreix l'adhesió de leucòcits i la seva transmigració, així com l'acumulació de lípids i macròfags a l'íntima arterial (Ross 1999).

Estímuls inflamatoris continuats produeixen un augment de macròfags, limfòcits T i cèl·lules cebades a la neoíntima vascular (Hansson 2001). L'activació d'aquestes cèl·lules comporta l'alliberament d'enzims hidrolítics, citocines i factors de creixement que poden lesionar l'endoteli adjacent i provocar així zones focalment denudades, trobant-se sovint plaquetes adherides al teixit subendotelial exposat sobre les plaques madures. De la mateixa manera, plaquetes i microtrombes contribuiran 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. El factor de creixement derivat de plaquetes (PDGF), la trombina i el fibrinogen tenen propietats quimiotàctiques i mitogèniques. Per aquest motiu, les plaquetes són probablement decisives en l'evolució de les plaques madures. Existeixen altres factors mitogènics derivats de la sang i de la pròpia placa, com interleucina-1 β (IL-1 β), la serotonina, la trombospondina i també neurotransmissors (catecolamines) i hormones (angiotensina) que contribueixen al creixement de la lesió.

Les CML pateixen transformacions fenotípiques com a resposta a canvis en l'entorn biomecànic, com poden ésser factors de creixement/inhibició, influències mecàniques, interaccions intercel·lulars i cèl·lula-matriu i mediadors inflamatoris. S'ha proposat que l'eliminació de la barrera formada per la làmina basal, degut a l'acció de metaloproteases de matriu (MMPs) derivades de macròfags, CML i cèl·lules endotelials, i la consegüent interacció de les CML amb els components de la matriu (col·lagen I i fibronectina) facilita el canvi fenotípic i la migració d'aquestes cèl·lules (Barnes et al. 1999). Les CML de la túnica mitjana amb fenotip "contràctil", responsables de la vasoactivitat arterial, penetren a la túnica íntima i adquireixen un fenotip "sintètic". Aquest canvi fenotípic o desdiferenciació confereix a les CML una major activitat funcional augmentant la seva capacitat de migrar, dividir-se i de sintetitzar proteïnes de matriu extracel·lular com col·lagen, proteoglicans i elastina, el que suposa un major engruiximent de la túnica íntima i una reducció del lumen

arterial (angina estable). A més, CML amb fenotip sintètic internalitzen LDL modificades a través de receptors com la proteïna relacionada amb el receptor de les LDL-1 (LRP-1) (Llorente-Cortes et al. 2002a) i es transformen també en cèl·lules escumoses. Estudis recents han demostrat una elevada expressió de LRP1 en CML de lesions ateroscleròtiques i s'ha demostrat que la seva expressió ve regulada per la presència de LDL (Llorente-Cortes et al. 2002b; Llorente-Cortes et al. 2005) (Figura 6).

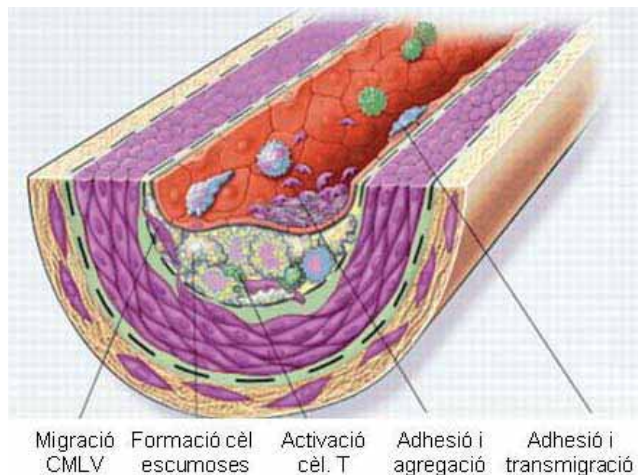


Figura 6. Formació de l'estria de greix i placa fibrosa.

Retenció i modificació de les LDL a l'espai subendotelial. Acumulació de cèl·lules escumoses derivades de la captació de LDL modificades pels macròfags i CML. Les plaques evolucionen incrementant l'acumulació de lípid extracel·lular, l'adhesió plaquetària i la secreció de factors de creixement que estimulen la migració de les CML (Ross 1999).

El col·lagen I és un dels components principals de la lesió vascular (Barnes et al. 1999). D'altra banda, glucosaminoglicans i fibres d'elastina són importants en la captació de lípid per part de la paret i contribueixen significativament a la calcificació de la placa ateroscleròtica. De fet, s'associa la progressió de la calcificació d'elastina amb el remodelat de la matriu extracel·lular. Es desconeixen els mecanismes moleculars que regulen la calcificació vascular. No obstant, s'ha proposat que, de la mateixa manera que en osteogènesi, es produeix un balanç entre inductors i inhibidors (proteïna Gla, osteocalcina, osteonectina, osteopontina, glucosaminoglicans) (Steitz et al. 2001). Estudis recents indiquen que algunes d'aquestes proteïnes, tals com la proteïna Gla i l'osteonectina no només intervenen en la mineralització de la placa, sinó també en la diferenciació de les CML. El procés de calcificació es veu afavorit pel retorn de les CML al seu fenotip contràctil (Steitz et al. 2001). S'ha descrit que els canvis en les CML miointimals són reversibles en quant a l'expressió de proteïnes contràctils. Per tant, els canvis fenotípics podrien ésser un requisit en el procés de reparació vascular, amb una disminució inicial, reflexant un canvi a un estat menys diferenciat caracteritzat per una elevada capacitat de creixement i, més tard, una rediferenciació de les cèl·lules i un retorn a un estat contràctil.

3.2. Complicació de la lesió ateroscleròtica

El mecanisme responsable de la transformació brusca d'una patologia vascular estable en una altra que posa en risc la vida del pacient acostuma a ésser la ruptura de la placa i la superposició de processos trombòtics (Fuster et al. 1992a; Fuster et al. 1992b).

El risc de ruptura de la placa ateroscleròtica depèn més de la seva composició i vulnerabilitat (tipus de placa) que del grau d'estenosi (mida de la placa). Les plaques amb baix contingut lipídic i fibroses (plaques estables) són dures i, en general, resistentes a la ruptura. Clínicament són sovint innòqües, però poden donar lloc a episodis d'isquèmia quan el flux es veu compromès. Són plaques que generalment oclueixen el vas lenta i progressivament, el que permet el desenvolupament de vasos col·laterals i, consegüentment, les manifestacions clíniques són escasses a llarg termini. Les plaques fibrolipídiques són molt més vulnerables a la ruptura, essent responsables de la majoria de complicacions clíniques (Dickson et al. 2003). Histològicament, les plaques vulnerables contenen un important nucli lipídic extracel·lular, una elevada densitat de cèl·lules escumoses, poca quantitat de CML i estan recobertes per una fina capa de teixit fibrós. Així doncs, aquestes plaques són poc estables i són més propenses a la ruptura que les plaques fibroses, riques en col·lagen. El debilitament de la coberta fibrosa predispone a la ruptura, la qual acostuma a produir-se en àrees on la coberta fibrosa és menys gruixuda i existeix una major infiltració de cèl·lules inflamatòries i on les forces mecàniques que actuen sobre la placa són majors. En el cas de plaques excèntriques, la ruptura sovint té lloc en zones laterals, on l'extrem de la placa s'uneix a la paret vascular adjacent, amb menor grau de lesió (Fuster et al. 1992a; Fuster et al. 1992b) (Figura 7).

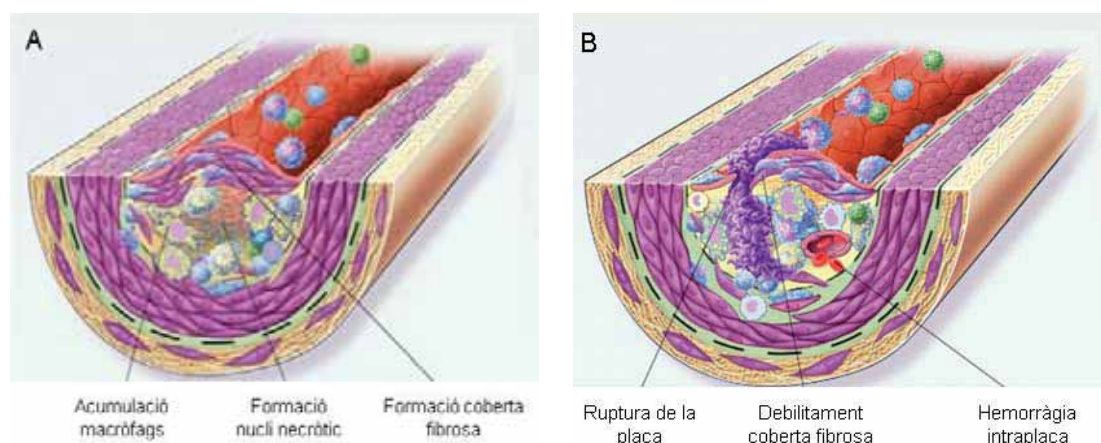


Figura 7. Complicació de la lesió ateroscleròtica. A) Lesió avançada. Augmenta la proliferació i migració de les CML que envolten el nucli lipídic. Incrementa la secreció de matriu extracel·lular per les CML, provocant l'engruiximent de la coberta fibrosa. **B) Ruptura de la placa.** L'activitat de determinats enzims com les MMPs contribueix a la ruptura de la coberta fibrosa i a la formació del trombe mural (Ross 1999).

La "ruptura de la placa" implica l'exposició al corrent sanguini del nucli lipídic i altres components de la placa, altament trombogènics, desencadenant la superposició d'un trombe, que oclou el vas sanguini (Figura 8). Per contra, "l'erosió de la placa" s'identifica com a pèrdua de la monocapa endotelial en segments arterials. La ruptura de la placa és de gran rellevància clínica, essent el procés subjacent en el 70 % de morts per síndromes coronàries agudes, mentre que els processos d'erosió constitueixen el 30 % dels casos de mortalitat deguda a trombosi coronària aguda. Els processos de ruptura tenen lloc amb més freqüència en homes menors de 50 anys, mentre que els d'erosió es donen amb igual freqüència en homes i dones d'aquest interval d'edat. El procés erosiu està incrementat en pacients fumadors i afecta especialment a dones premenopàusiques.

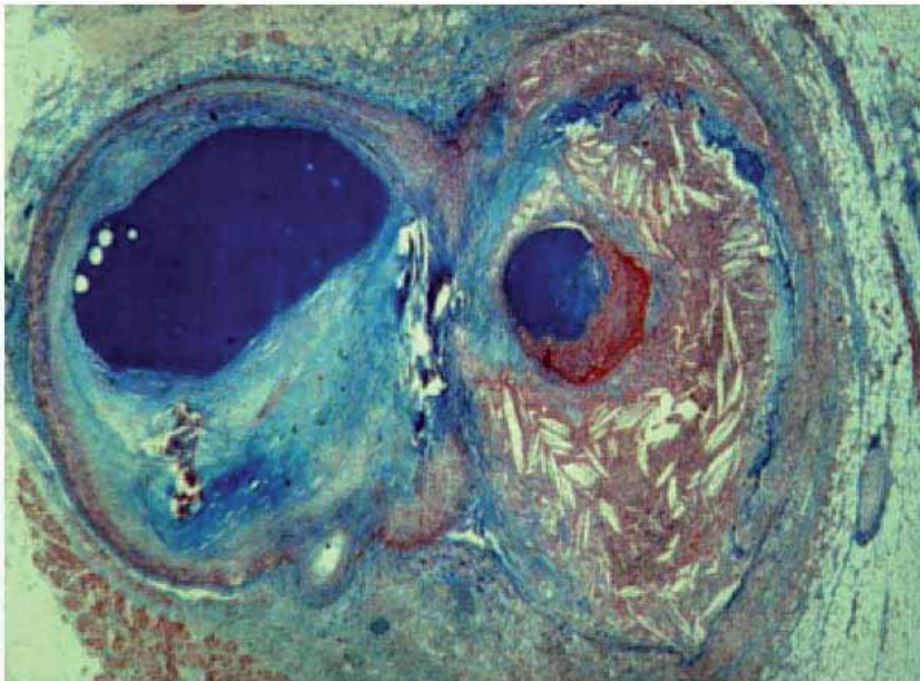


Figura 8. Artèries coronàries d'un pacient que va patir mort sobtada. L'artèria de l'esquerra presenta placa ateroscleròtica fibròtica (placa estable) mentre que la de la dreta presenta abundants cristalls de colesterol i superposició d'un trombe sobre una zona de ruptura (placa inestable).

3.3. Factors causals en la progressió de l'aterosclerosi. Plaques d'alt risc

3.3.1. Inflamació

Procés d'inflamació a la coberta fibrosa

Els processos inflamatoris no només promouen la iniciació i evolució de l'aterosclerosi, sinó que també contribueixen decisivament al procés de disrupció de la placa ateroscleròtica. La presència de macròfags activats es relaciona amb processos de ruptura de la placa. Així, les lesions causants de les síndromes coronàries agudes contenen molts més macròfags que les lesions que produeixen angina estable (14 % vs. el 3 % de placa ocupada per macròfags) (Moreno et al. 1994). Els macròfags tenen la capacitat de degradar la matriu extracel·lular per fagocitosis directa i mitjançant la secreció d'enzims proteolítics (col·lagenases, gelatinases i estromelinases) són capaços de degradar el col·lagen i la làmina elàstica de la placa ateroscleròtica (Galis et al. 2002). A més, els macròfags també secreten citocines i factors quimiotàctics, que atreuen al nucli ateromatós un major nombre de monòcits/macròfags, cèl·lules T i cèl·lules cebades. Juntament amb la generació de productes tòxics (radicals lliures i productes d'oxidació lipídica), aquests enzims faciliten el dany de la paret vascular, contribuint a la debilitació de la coberta fibrosa predisposant-la a la ruptura. En un intent de missió defensiva de protegir la paret vascular d'una excessiva acumulació de lipoproteïnes, els macròfags entren eventualment en apoptosi, alliberant el seu contingut en factor tissular (TF) (Littlewood et al. 2003). La ruptura d'aquestes lesions, riques en TF, desencadena la coagulació a l'entrar el TF en contacte amb la sang circulant (Moons et al. 2002). L'apoptosi dels macròfags podria representar un vincle d'unió entre la inflamació i les complicacions trombòtiques que tenen lloc al llarg de la malaltia ateroscleròtica.

La contribució d'altres estirps de cèl·lules inflamatòries (cèl·lules cebades, cèl·lules T, neutròfils) en la vulnerabilitat de les lesions està menys caracteritzada. Les cèl·lules cebades es localitzen preferentment en regions laterals de les plaques coronàries avançades (Kartinen et al. 1994), tot i que en proporció molt baixa si es compara amb el nombre de macròfags presents en les mateixes àrees (relació cèl·lules cebades i macròfags aproximadament 1:20). És important destacar que la majoria d'aquestes cèl·lules (85 %) es troben activades o degranulades, de manera que secreten potents enzims proteolítics i citocines proinflamatòries com el factor de necrosi tumoral- α (TNF- α) (Kartinen et al. 1996) i que els mediadors derivats de la seva degranulació poden induir events oclusius al desencadenar vasoespasme coronari. A més, contenen grànuls remanents que són alliberats i sovint fagocitats per macròfags adjacents, amb el que poden induir la producció

de cèl·lules escumoses. Estudis recents suggereixen que les cèl·lules cebades activades contribueixen al debilitament de la placa ateroscleròtica mitjançant la secreció de mediadors, com proteoglicans heparinoides i quimasa, que afecten al creixement, funcionalitat i apoptosi de les CML. A diferència de les cèl·lules cebades, els limfòcits T estan presents a totes les fases aterogèniques, suggerint que es dona una resposta immunitària dirigida a antígens específics, com és el cas de les LDL oxidades (Hansson 2001). Existeixen evidències que sostenen que les cèl·lules T podrien precedir als monòcits/macròfags en la lesió inicial. Els limfòcits T faciliten la propagació de la resposta immunitària (atraient més leucòcits cap al nucli de la lesió), estimulen monòcits/macròfags i redueixen la població de CML. D'altra banda, escassament es troben neutròfils en plaques intactes (Weiss 1989), però en ocasions poden trobar-se en plaques trencades situats per sota dels trombes coronaris, i es creu que penetren a la placa poc després de la ruptura.

Altres fonts d'inflamació

El procés ateroscleròtic i les seves complicacions trombòtiques per si mateixes són fonts d'estímuls inflamatoris (Ross 1999; Libby 2002a). No obstant, diversos estudis han postulat l'existència de fonts alternatives d'inflamació que contribueixen a la complicació de la malaltia ateroscleròtica (Cusack et al. 2002). En aquest sentit, la reperfusió del cor isquèmic ha demostrat jugar un important paper en la resposta inflamatòria, mitjançant el reclutament de cèl·lules inflamatòries a les zones danyades (Hoffman et al. 2004) o mitjançant la sobreproducció d'espècies reactives d'oxigen, realçant així la resposta inflamatòria local (Kakio et al. 2000). A més, també es creu que el propi teixit miocàrdic necròtic contribueix a l'alliberament de citocines proinflamatòries, com interleucina-6 (IL-6), IL-1 β i TNF- α que al mateix temps indueixen la producció hepàtica de proteïna C-reactiva (CRP), un marcador clau d'inflamació sistèmica (Libby et al. 1999).

D'altra banda, diversos estudis cas-control (Mattila et al. 1989; Mattila et al. 1993) i estudis longitudinals (Mattila et al. 1995; Beck et al. 1998) han suggerit que la malaltia periodontal podria contribuir al desenvolupament de la cardiopatia coronària isquèmica. Estudis longitudinals mostren que la malaltia periodontal precedeix a la malaltia coronària. Els pacients amb periodontitis agresives com periodontitis d'inici precoç, periodontitis refractàries i diabetes mellitus insulino-dependent presenten monòcits amb fenotip hiperinflamatori (Shapira et al. 1994). S'ha proposat que l'associació d'aquest fenotip amb la malaltia periodontal i l'aterosclerosi sigui el vincle entre ambdues malalties. Aquests monòcits juguen un paper molt important en la formació de la placa d'ateroma i al mateix temps, la interacció dels lipopolisacàrids (LPS) amb els monòcits és fonamental en l'alliberació de mediadors inflamatoris (IL-1 β , TNF- α), que condueixen a la destrucció periodontal. Aquests mediadors poden iniciar l'adhesió i agregació plaquetària i afavoreixen

la deposició de cèl·lules escumoses carregades de lípids i colesterol a la íntima. A més, les citocines alliberades pels monòcits, junt amb el PDGF incrementen la proliferació de CML augmentant el gruix de la paret vascular i disminuint així el lumen vascular.

3.3.2. Neovascularització

Les lesions vulnerables habitualment presenten neovascularització (de Boer et al. 1999). La presència de capil·lars angiogènics a l'íntima vascular està associada amb l'aparició de síndromes coronàries clíniques i amb la presència de malaltia oclusiva simptomàtica de caròtida. Estudis recents han demostrat un augment de densitat de microcapil·lars en les zones laterals de la placa amb hemorràgia interna i en fibroateromes amb coberta fibrosa debilitada, així com en lesions amb elevada infiltració de macròfags (Moreno et al. 2004). Aquestes observacions posen de manifest la relació entre inflamació i neovascularització. L'angiogènesi contribueix a la inestabilitat de la placa degut, en part, a una major exposició local a forces mecàniques en les àrees de neovascularització, així com a un augment d'infiltració de monòcits/macròfags, afavorida per l'existència de cèl·lules endotelials activades als neocapil·lars (Moreno et al. 2004). A més, s'ha observat que processos angiogènics a l'adventícia estimulen l'engruiximent de la túnica íntima (Khurana et al. 2004). S'ha postulat també que cèl·lules progenitores presents a la placa o circulants, procedents del moll de l'os, podrien originar aquests neocapil·lars. Igualment, degut a l'ambient proinflamatori en el que es desenvolupa el creixement dels vasos, es creu que els macròfags també podrien col·laborar en el procés de neovascularització.

3.3.3. Fatiga

A la inestabilitat de la placa ateroscleròtica també contribueixen un important nombre de factors mecànics com l'estirament, la pressió, la compressió, el plegament i la flexió. Aquests processos es produeixen de forma reiterada i cíclica, fatigant i debilitant la coberta fibrosa de la lesió, facilitant així la ruptura espontània. D'aquesta manera, si disminueix la freqüència (ritme cardíac) i la magnitud de la càrrega (relacionada amb l'esforç de cisalla i la pressió), es podria reduir el risc de ruptura de la placa (Hjalmarson et al. 1990). No obstant, l'efecte d'aquests factors mecànics depèn en gran part de les propietats mecàniques i elàstiques del material que compon la placa ateroscleròtica. Així, petits canvis estructurals a la placa, amb la consegüent variació de les seves propietats mecàniques, són suficients per produir la transició d'estabilitat a inestabilitat i viceversa (Finet et al. 2004).

3.3.4. Sang vulnerable

En un terç dels casos de síndrome coronària aguda, en particular mort sobtada, no es produeix ruptura de la placa ateroscleròtica vulnerable, sinó erosió superficial de la placa moderadament estenòtica i fibrosa (Virmani et al. 2000). La formació del trombe en aquests casos depèn principalment d'un estat hipertrombogènic de la sang, provocat per una sèrie de factors sistèmics (hiperlipèmia, tabaquisme, hiperglicèmia). Observacions recents suggereixen que la hipertrombogenicitat associada a aquests factors podria estar relacionada amb l'activació d'interaccions leucòcit-plaqueta associades amb l'alliberament del TF i l'activació de la trombina. Nivells alts de TF en sang s'han associat a hipertrombogenicitat en pacients amb angina inestable i malaltia coronària crònica. A més de macròfags apoptòtics, micropartícules (MPs) i CML activades presents a la placa ateroscleròtica semblen ésser una font de TF i, per tant, contribueixen a la complicació aterotrombòtica.

4. FORMACIÓ DEL TROMBE ARTERIAL. IMPLICACIÓ DE LES PLAQUETES

Plaquetes i fibrina són els components principals dels trombes formats en zones on es produeix la ruptura de la placa ateroscleròtica, però també participen activament en el desenvolupament i progressió de la mateixa. Així doncs, les plaquetes juguen un paper primordial en el procés aterotrombòtic.

Les plaquetes són cèl·lules sanguínies anucleades, que s'originen a partir del citoplasma dels megacariocits al moll de l'os (Hartwig et al. 2003) i tenen una vida mitja de 7-10 dies. Les plaquetes circulen com a "sentinelles" de la integritat vascular, on discriminen entre endoteli íntegre i àrees amb lesió. En condicions fisiològiques, aquesta funcionalitat de les plaquetes contribueix a l'hemostàsia, però en artèries danyades pot donar lloc a l'oclusió trombòtica del lumen vascular i l'obstrucció del flux sanguini amb les subsegüents complicacions clíniques (Badimon et al. 1992). El principal desencadenant de la formació del trombe hemostàtic en resposta al dany vascular és la pèrdua d'integritat de l'endoteli, que exposa el contingut extracel·lular de la placa ateroscleròtica altament trombogènic al torrent sanguini. La resposta de les plaquetes a aquest esdeveniment té lloc en tres etapes successives però integrades entre elles, que consisteixen en adhesió, activació i agregació.

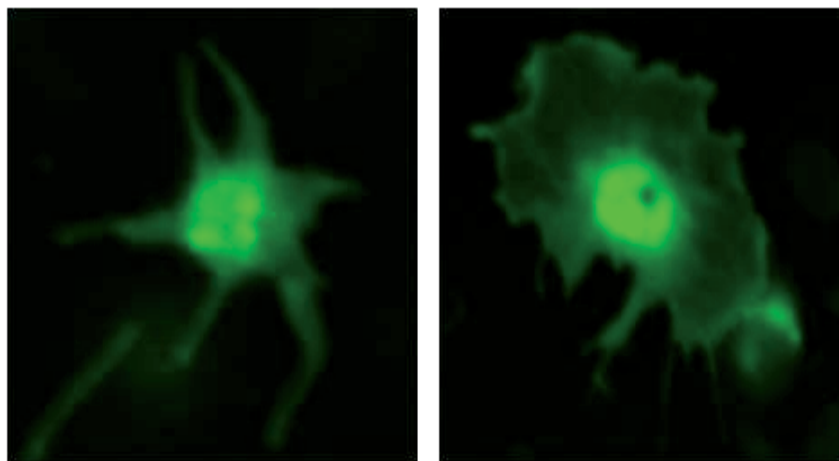


Figura 9. Imatges de microscopia confocal de plaquetes activades

4.1. Efecte del flux en la formació del trombe

Els paràmetres fluidodinàmics més rellevants que descriuen la influència del flux sanguini en la formació del trombe són la velocitat de cisalla (γ) i l'esforç de cisalla (τ). L'esforç de cisalla es defineix com la força tangencial per unitat d'àrea exercida en direcció del flux. L'esforç de cisalla està proporcionalment relacionat amb la velocitat de cisalla: $\tau = \eta \cdot \gamma$ on η és la viscositat de la sang ($\eta = 3$ cp). Els valors de velocitat i esforç de cisalla de diferents parts de la vasculatura es poden calcular a partir del diàmetre del vas i del cabal volumètric (Taula 2). En condicions fisiològiques les velocitats de cisalla són baixes als vasos grans i augmenten amb la disminució del diàmetre del vas, arribant a 5000 s^{-1} als capil·lars.

Taula 2. Paràmetres fluidodinàmics

Vas	Diàmetre (cm)	Velocitat de cisalla (s^{-1})	Esforç de cisalla (dina/cm ²)
Aorta ascendent	2,3-4,5	50-300	2-10
Artèria femoral	0,5	350	11
Artèries petites	0,03	1500	55
Capil·lars	0,0006	2000-5000	-
Venes grans	0,5-10	200	7
Vena cava inferior	2,0	50	2
Artèries estenosades	0,025	20000	3000

Les velocitats de cisalla en artèries estenòtiques poden ésser extremadament elevades, superant els 20000 s^{-1} a l'àpex d'estenosis severes (Roux et al. 1991; Slack et al. 1993; Strony et al. 1993; van Zanten et al. 1994). S'ha de tenir en compte que els càlculs de la velocitat i l'esforç de cisalla es basen en un model simplificat, assumint flux estacionari i no flux pulsàtil. A més, la sang no és un fluid Newtonià, ja que la viscositat de la sang no és constant sinó que disminueix amb la velocitat de cisalla. Les propietats no-Newtonianes de la sang es deuen a la presència de cèl·lules vermelles, que constitueixen la major part del volum cel·lular de la sang. Tot i aquestes limitacions, la velocitat i l'esforç de cisalla descriuen les propietats del flux a la paret vascular i defineixen les condicions del flux quan s'inicia la formació del trombe. Subsegüentment, els perfils de velocitat i esforç de cisalla canvien contínuament degut a l'arquitectura del trombe creixent, l'oclusió del lumen i al corresponent canvi local en el flux sanguini (mL/min). D'altra banda, les forces de cisalla poden produir la fragmentació, translocació o embolització del trombe mural.

L'augment de velocitat de cisalla provoca la migració dels eritròcits cap a l'eix del flux, creant un gradient de concentració heterogeni d'eritròcits al llarg del flux. En conseqüència, les plaquetes, al ésser més petites, es concentren a la paret del vas amb l'augment de la velocitat de cisalla. A més, els moviments rotatius dels eritròcits amb el flux empenyen encara més les plaquetes cap a la paret (Goldsmith et al. 1986; Aarts et al. 1988), augmentant així la concentració de plaquetes a la paret del vas. Així, la formació de trombes plaquetars augmenta gradualment amb l'augment de la velocitat de cisalla. L'adhesió plaquetària augmenta amb la velocitat de cisalla fins als 2000 s^{-1} , després es manté constant fins valors al voltant de 5000 s^{-1} i disminueix amb velocitats més elevades. L'adhesió plaquetària està controlada per dos mecanismes limitants (Turitto et al. 1975). A velocitats de cisalla baixes ($<300 \text{ s}^{-1}$) l'adhesió és dependent de la difusió, mentre que a velocitats elevades ($>1300 \text{ s}^{-1}$) és dependent de la convecció. A velocitats intermèdies hi contribueixen els dos processos.

El transport de plaquetes per part dels eritròcits depèn de l'hematòcrit i de la rigidesa i tamany dels eritròcits. La rigidesa dels eritròcits juntament amb la viscositat del plasma sanguini determinen la viscositat de la sang (van Breugel et al. 1992). Un augment en la viscositat del plasma resulta en un augment en l'adhesió plaquetària (Aarts et al. 1984). L'augmentada viscositat sanguínia que es troba en pacients com pacients amb diabetis mellitus podria explicar, en part, el major risc trombòtic que presenten aquests pacients.

D'altra banda, la presència d'estenosis, que imposen alteracions ràpides i remarcades del flux laminar, incrementa l'adhesió plaquetària (Badimon et al. 1989; Barstad et al. 1994). Els canvis en la velocitat i l'esforç de cisalla són extremadament ràpids en aquestes regions. A més, també es poden produir recirculacions i irregularitats en el flux en regions anteriors i posteriors de l'estenosi (Sakariassen et al. 1993). Aquests perfils complexes de velocitats i esforços de cisalla indueixen l'activació plaquetària (Holme et al. 1997; Nesbitt et al. 2009), així com la formació de MPs derivades de les plaquetes (Holme et al. 1997).

4.2. Morfologia de les plaquetes

L'estructura de les plaquetes s'adapta a les diferents funcions que realitzen, amb zones anatòmiques preferentment dedicades a cadascuna d'elles (Figura 10). Així, es distingeixen les diferents parts (de Gaetano G.M. 1984):

- a) El glicocàlix, format per glicoproteïnes (GP) que envolten la membrana plasmàtica. Aquestes proteïnes intervenen en el transport de molècules a la membrana, en

- l'antigenicitat, en la interacció intraplaquetària (agregació) o amb la superfície subendotelial (adhesió).
- Immediatament per sota de la membrana plasmàtica es troba el citoesquelet, que és el responsable del manteniment de la forma de la plaqueta. Està format per microtúbuls i filaments contràctils, un sistema de proteïnes molt organitzat i regulat.
 - El sistema canalicular obert connectat amb la superfície, que consisteix en una sèrie d'invaginacions tubulars a la membrana plasmàtica que penetren a l'interior de la plaqueta.
 - El sistema tubular dens, que és un complex de membranes originat a partir del reticle endoplasmàtic (RE) del megacariocit. Al sistema tubular dens s'acumulen elevades concentracions de calci quan la plaqueta està inactivada, i s'allibera al citoplasma en resposta a la inducció amb agonistes.
 - Els grànuls densos, grànuls α i lisosomes, morfològicament similars, es distingeixen entre ells pel seu contingut. Els grànuls densos contenen adenosina difosfat (ADP), adenosina trifosfat (ATP), serotonina i Ca^{2+} . Els grànuls α , molt més abundants que els densos, contenen nombroses proteïnes com PDGF, factor plaquetar 4, trombospondina, fibrinogen i tromboglobulina. Els lisosomes, que representen un petit percentatge del total dels grànuls de la plaqueta, contenen enzims com catepsines, hidrolases i proteases, que només s'alliberen en resposta a estímuls molt forts.
 - Mitochondries i partícules discretes de glucogen. L'energia requerida a les diferents activitats de la plaqueta procedeix tant de la fosforilació oxidativa mitocondrial com de la glucòlisi realitzada per enzims citoplasmàtics.

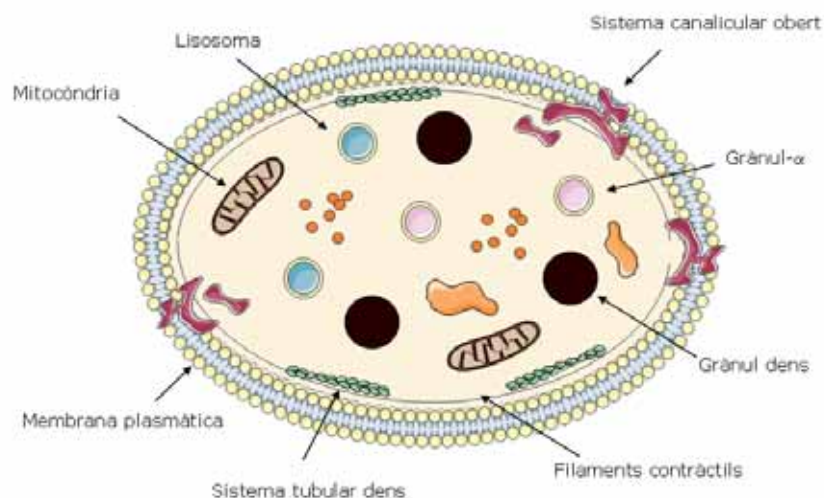


Figura 10. Esquema d'una secció sagital d'una plaqueta

4.2.1. Receptors plaquetars

Els receptors plaquetars transmembrana, altament regulats i especialitzats, s'uneixen a agonistes i a altres lligands adhesius. D'entre els diferents receptors d'adhesió destaquen les GP heterodimèriques de la família de les integrines. Les integrines s'uneixen a proteïnes plasmàtiques i de la matriu extracel·lular i determinen les interaccions cèl·lula-substrat i cèl·lula-cèl·lula. Les integrines no només intervenen en l'adhesió i l'agregació, sinó que permeten la senyalització intercel·lular bidireccional. Cada integrina consisteix en una cadena- α i una cadena- β unides de forma no covalent. A la taula 3 es presenten els diferents receptors plaquetars, amb els seus lligands i les diferents vies de senyalització en les diferents etapes de la formació del trombe. El receptor GPIb no és una integrina, tot i que es troba formant un complex amb GP IX i GP V, així com tampoc ho és la GPVI, el principal receptor del col·lagen.

Taula 3. Receptors, lligands i vies de senyalització de la formació del trombe

Etapa de resposta	Substrat, agonista, lligand	Receptor	Via de senyalització
Inici Adhesió	vWF Col·lagen Fibrinogen/fibrina Fibronectina Laminina	GPIb-IX-V $\alpha_2\beta_1$, GVI-FcR γ $\alpha_{IIb}\beta_3$ $\alpha_5\beta_1$ $\alpha_6\beta_1$	PI 3-K i altres (?) SYK/PLC γ SYK/pp125 ^{FAK} ? ?
Propagació Activació	α -trombina ADP TxA ₂ Epinefrina	PAR1, PAR4 GPIb-IX-V P2Y ₁ P2Y ₁₂ TP α_{2A}	G _q , G ₁₂ , G _i /Rho, PLC β ? G _q , (G ₁₂)/Rho, PLC β G ₁₂ /adenilil ciclase (?) G _q , G ₁₂ /Rho, PLC β G ₂ /adenilil ciclase (?)
Agregació	Fibrinogen, vWF, Fibronectina	$\alpha_{IIb}\beta_3$ (activada)	SHC
Estabilització	P-selectina Efrina B1 CD40 lligand GAS6	PSGL-1, GPIb-IX-V, i altres (?) EPH cinases (A4/B1) $\alpha_{IIb}\beta_3$ (activada) AXL	? LYN, FYN ? PI 3-K, PLC
Inhibició	PECAM-1 PGI ₂	PECAM-1 IP	SHP2 G _s /adenilil ciclase (?)
?, desconguit; AXL, receptor tirosin-cinasa; EPH, receptor de l'efrina; FYN, <i>shrinkage-activated tyrosine kinase</i> ; GAS6, <i>growth arrest-specific 6</i> ; LYN, <i>tyrosine kinase</i> ; PECAM-1, molècula d'adhesió cel·lular plaquetària-1; PI3-K, fosfatidilinositol 3-cinasa; PL, fosfolipasa; PSGL, lligand de P-selectina; SHC, <i>Src homology domain-containing transforming protein</i> ; SHP2, <i>small heterodimer protein</i> (Ruggeri 2002).			

S'han identificat també diversos receptors plaquetars que no són integrines. Les proteïnes amb dominis rics en leucina presenten una conformació en forma de ferradura- α/β , que proporcionen estabilitat estructural, com el complex GP Ib/IX/V (Du 2007), que juga un paper crític en l'adhesió plaquetària. Les tetraspanines constitueixen una superfamília de proteïnes de membrana que intervien activament en l'adhesió cel·lular (Kotha et al. 2008) i estan implicades en la senyalització de la GPIIb-IIIa (Longhurst et al. 1999) i en l'estabilització del trombe. La P-selectina, una proteïna transmembrana, s'emmagatzema als grànuls intracel·lulars i es troba a la membrana només quan la plaqueta està activada (McEver 2001). La P-selectina facilita i estabilitza les interaccions plaqueta-leucòcit.

4.3. Adhesió plaquetària

El primer pas en la cascada hemostàtica és la interacció de la plaqueta amb la matriu extracel·lular exposada, que conté un bon nombre de macromolècules adhesives com laminina, fibronectina, col·lagen i vWF. Els mecanismes d'adhesió plaquetària a les zones de lesió vascular estan mediat principalment per les condicions reològiques prevalents. La sang circula amb major velocitat per la zona central del vas que per la paret, generant així esforços de cisalla entre capes adjacents de fluid que esdevenen màxims a la paret. El coeficient de resistència, que oposa agregació i adhesió, augmenta amb l'esforç de cisalla i, en conseqüència, els seus efectes en la formació del trombe plaquetar són més rellevants en artèries que en venes. En condicions d'elevada velocitat de cisalla ($>650 \text{ s}^{-1}$) l'enllaç de la GPIb α al domini A1 del vWF unit al col·lagen és la principal interacció adhesiva capaç de produir l'adhesió inicial de les plaquetes a la superfície, però no pot mediar l'adhesió irreversible per si mateixa (Savage et al. 1996). Quan el vWF s'uneix al col·lagen, la transició a una adhesió més estable té lloc en qüestió de segons, indicant una activació que podria estar facilitada per la senyalització originada per estímuls mecànics dels enllaços vWF-GPIb α sotmesos a esforços de tensió (Mazzucato et al. 2002). En aquest punt del procés, el vWF plasmàtic s'uneix a la superfície de les plaquetes adherents i activades, en una interacció que implica la unió de la integrina $\alpha_{\text{IIb}}\beta_3$ amb la seqüència Arg-Gly-Asp en el domini C1 del vWF (Ruggeri et al. 1983; Goto et al. 1995). El vWF unit a la membrana plaquetària és el substrat al qual, en condicions d'elevada velocitat de cisalla, plaquetes circulants s'adhereixen a través de la GPIb α per mantenir el creixement del trombe en un procés que es repeteix en successives capes (Savage et al. 1998; Ruggeri et al. 1999).

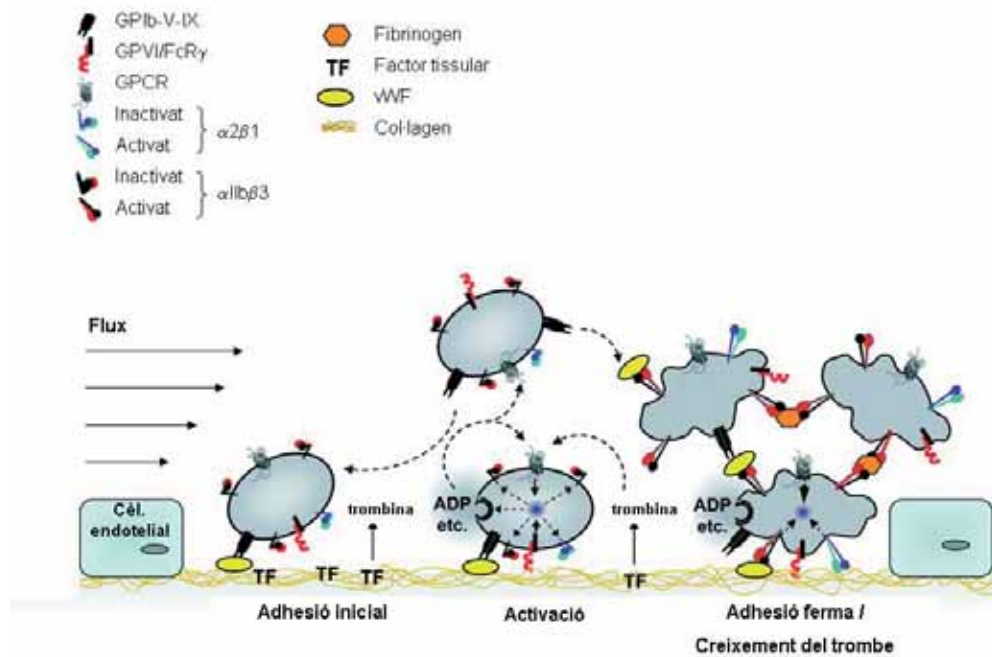


Figura 11. Mecanisme d'adhesió plaquetària. La interacció GPIb α -vWF regula l'adhesió inicial permetent la interacció de GPVI amb el col·lagen de la matriu extracel·lular, desencadenant un canvi de les integrines a un estat d'elevada afinitat i l'alliberament d'ADP i TXA₂. Paral·lelament, el TF desencadena localment la formació de trombina que també contribueix a l'activació plaquetària (Varga-Szabo et al. 2008).

L'enllaç GPIb α -vWF té una dissociació ràpida i, per tant, és insuficient per mediar l'adhesió estable, però en canvi manté les plaquetes en contacte directe amb la superfície amb una translocació contínua en la direcció del flux sanguini (Savage et al. 1998). Durant aquest *rolling* les plaquetes entren en contacte amb el col·lagen de la matriu extracel·lular mitjançant la GPVI. La GPVI s'uneix amb poca afinitat al col·lagen i tampoc és capaç de mediar adhesió per si mateixa, però desencadena la senyalització intracel·lular que provoca un canvi en les integrines a un estat d'alta afinitat i s'indueix la secreció de mediadors secundaris com l'ADP i el tromboxà A₂ (TXA₂) (Varga-Szabo et al. 2008). Aquests agonistes juntament amb la trombina produïda localment, contribueixen a l'activació cel·lular estimulants receptors que s'uneixen a proteïnes G, les quals indueixen diferents cascades de senyalització i actuen sinèrgicament per induir l'activació plaquetària total (Figura 11). L'adhesió ferma de les plaquetes a la matriu extracel·lular està finalment mediada per integrines d'elevada afinitat β 1 que s'uneixen al col·lagen (α 2 β 1), la fibronectina (α 5 β 1) i la laminina (α 6 β 1), així com per la integrina plaquetària majoritària α IIb β 3, que interacciona amb la fibronectina i el vWF unit al col·lagen.

La caracterització del mecanisme d'adhesió plaquetària és vàlida en models simplificats on s'estudia l'adhesió plaquetària sobre substrats purificats de col·lagen. No obstant, cal remarcar la contribució relativa d'aquest mecanisme en el procés d'adhesió i formació global del trombe sobre la placa ateroscleròtica, on hi participen altres mecanismes degut a la presència dels diferents components de la placa (Badimon et al. 1988; Merino et al. 1994) i a la generació de trombina, que dóna lloc a la formació de fibrina (Mailhac et al. 1994).

4.4. Activació plaquetària i activitat procoagulant

Els estímuls originats en les etapes inicials de l'adhesió plaquetària, així com els agonistes secretats o generats a les zones de dany vascular, actuen a través de cascades de senyalització sinèrgiques per augmentar les propietats adhesives i procoagulants de les plaquetes adherides o circulants en zones proximals a la lesió (Savage et al. 2001). L'activació comença amb la unió de lligands adhesius i agonistes a receptors de la membrana plaquetària i es propaga per reaccions de senyalització intracel·lular que impliquen enzims, substrats i cofactors disposats en interaccions específiques proteïna-proteïna i proteïna-lípid. L'activació plaquetària està estrictament regulada negativament per l'acció de substàncies inhibidores com la prostaciclina i el NO, que contribueixen a la limitació de la formació del trombe en els límits de la lesió de la paret vascular. Els principals inductors de l'activació plaquetària són el col·lagen i el vWF d'entre els substrats adhesius; la α -trombina generada a la superfície de plaquetes estimulades; l'ADP secretat per cèl·lules vasculares i plaquetes estimulades; l'epinefrina i el TXA₂.

La trombina activa les plaquetes mitjançant proteïnes G unides a receptors acoblats a receptors activats per proteasa (PARs) que transformen talls proteolítics extracel·lulars en senyalització intracel·lular (Coughlin 2000; Sambrano et al. 2001). Els PARs regulen la resposta derivada de proteïnes G_q donant lloc a l'activació de la fosfolipasa C_β i aquesta hidrolitza el fosfatidilinositol-4,5-difosfat associat a la membrana per produir missatgers secundaris com l'inositol-3-fosfat, que contribueix a la mobilització de calci, i el diacilglicerol, que activa la proteïna cinasa C. L'augment de calci intracel·lular regula molts processos que donen lloc a l'agregació plaquetària, incloent l'activació de la fosfolipasa A₂ (PLA₂) dependent de p38 MAPK ("mitogen activated protein kinase"), que hidrolitza els fosfolípids de membrana, produint àcid araquidònic (AA) i síntesi de TXA₂ (Figura 12).

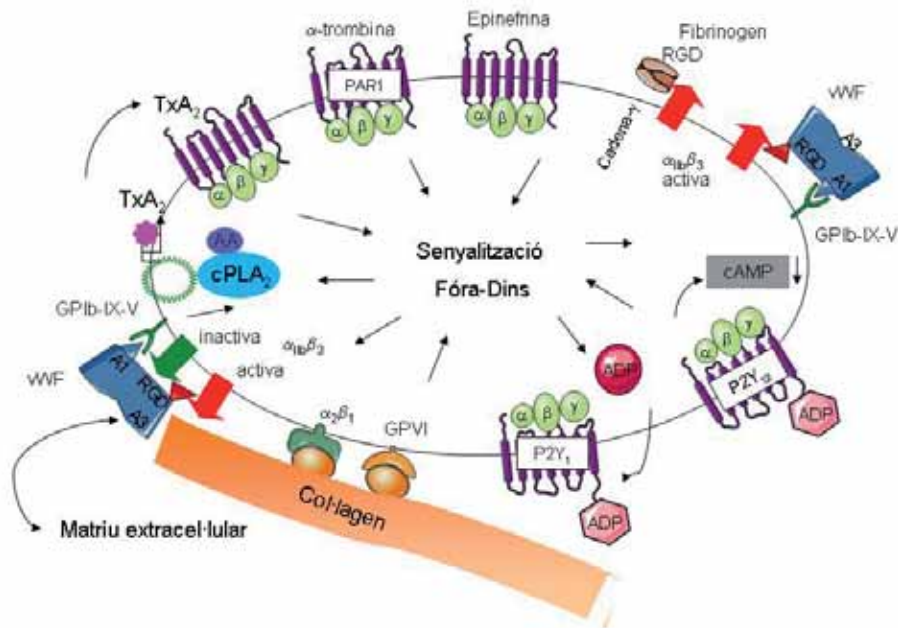


Figura 12. Mecanismes d'activació plaquetària. Senyalització dels receptors d'adhesió, especialment GPIIb/IIIa unit al col·lagen, i en menor grau $\alpha_2\beta_1$ unit a col·lagen i GPIIb/IIIa unida al domini A1 de vWF, que actuen sinèrgicament amb la senyalització d'agonistes solubles per induir l'activació plaquetària mitjançant una xarxa de mecanismes de senyalització. L'agregació plaquetària es produeix pel canvi conformacional de la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, que adquireix l'habilitat d'unir-se al fibrinogen (Ruggeri 2002). A1 i A3: dominis del vWF; RGD: seqüència específica de vWF situada al domini C1.

L'ADP és un agonista feble que, directament, només induïx canvi de forma i agregació reversible, mentre que la subsegüent secreció i agregació secundària són causades per la síntesi de TXA_2 induïda per l'ADP. No obstant, l'ADP és essencial en la funció plaquetària perquè després de secretar-se dels grànuls densos amplifica les respostes induïdes per altres agonistes. L'ADP interacciona amb dos receptors específics. La transducció del senyal implica per una banda un augment transitori de calci citoplasmàtic regulat pel receptor acoblat a proteïna G, $P2Y_1$, i per una altra, la inhibició de l'adenil ciclase mediada per un altre receptor acoblat a proteïna G, el $P2Y_{12}$. L'epinefrina i el TXA_2 també activen les plaquetes mitjançant receptors específics acoblats a proteïna G (Ruggeri 2002).

La típica manifestació fenotípica de l'activació plaquetària implica la polimerització de l'actina amb la reorganització del citoesquelet, la secreció del contingut dels grànuls i l'agregació dependent de la modulació de la unió del lligand soluble a la integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$. La secreció produeix l'alliberament del contingut dels grànuls al citoplasma (per exemple ions de calci) i a l'espai extracel·lular (per exemple vWF, factors de creixement i nucleòtids) i la

translocació de proteïnes de membrana a la superfície cel·lular (per exemple, P-selectina). Tots aquests processos realcen l'activació i agregació de les plaquetes. Una altra conseqüència important de l'activació plaquetària és l'exposició de fosfatidilserina a la superfície de la plaqueta, un fosfolípid aniònic, que proporciona punts d'acoblament per l'ensamblatge d'enzims i cofactors de la cascada de la coagulació en complexos funcionals. Així, l'activitat procoagulant de les plaquetes activades dóna lloc a la generació de trombina i facilita la deposició de fibrina, contribuint a l'estabilitat del trombe.

4.5. Canvi de forma de les plaquetes

Les plaquetes responen a nombrosos estímuls canviant de forma discoidal, quan es troben en repós, a estructures més rodones amb pseudopòdies (Mannucci et al. 1967; Born 1970; Hovig 1970). Les transicions morfològiques de les plaquetes associades al canvi de forma representen un índex sensible de l'activació plaquetària. Aquests canvis es consideren generalment, la primera resposta fisiològica mesurable en resposta a la inducció amb agonistes específics, i té lloc abans del procés d'agregació. El canvi de forma de les plaquetes té lloc en dues etapes. En primer lloc, la forma discoidal es contrau donant lloc a una forma arrodonida irregular. Aquesta transició requereix un augment dels nivells de calci intracel·lular i l'activació de la gelsolina per tallar l'actina. L'acció de la gelsolina al còrtex de la plaqueta desestabilitza l'estructura organitzada i rígida del citoesquelet plaquetar (Hartwig 1992). Seguidament, amb una major superfície de contacte, la plaqueta estén filopòdies.

L'ensamblatge de l'actina controla aquests canvis morfològics. Així, les proteïnes que modulen la dinàmica de l'actina tenen una funció important com a mediadores de la senyalització transmembrana durant el canvi de forma de les plaquetes. Aquestes proteïnes són la miosina, la gelsolina, VASP (*vasodilator-stimulator phosphoprotein*), la moesina, l'adducina i la cofilina. La fosforilació de la cadena lleugera de la miosina corelaciona amb l'inici del canvi de forma (Daniel et al. 1984; Nachmias et al. 1985), i concomitantment amb l'associació de la miosina al citoesquelet d'actina (Fox et al. 1982; Paul et al. 1999). La formació de filopòdies està principalment mediada per la gelsolina (Witke et al. 1995; Kiuru et al. 2000). En canvi, VASP es fosforila en resposta a vasodilatadors i inhibidors que augmenten els nivells de guanosin monofosfat cíclic (cGMP) i adenosin monofosfat cíclic (cAMP) i inhibeix el canvi de forma estabilitzant els filaments d'actina i evitant el desensamblatge per acció de la gelsolina (Harbeck et al. 2000).

4.5.1. Proteïnes Rho

Les proteïnes Rho juguen un important paper en l'organització del citoesquelet d'actina (Chardin et al. 1989). Un gran nombre d'estudis ha permès establir la implicació d'aquestes proteïnes en la regulació de la contractilitat, l'adhesió i la migració cel·lular, la transducció de senyal i el control del cicle cel·lular (Mackay et al. 1998). Les proteïnes Rho, o de la superfamília Ras, es coneixen també com proteïnes G de baix pes molecular i són capaces d'unir GTP (guanovina-5'-trifosfat).

La unió d'agonistes als receptors exposats a la superfície de les plaquetes activen les proteïnes Rho-GTPases, que indueixen canvis en la concentració de calci citoplasmàtic, en la reorganització del citoesquelet i en l'agregació i secreció de les plaquetes (Bodie et al. 2001). En termes generals, l'activitat de les proteïnes Rho es regula de forma cíclica mitjançant la unió a GTP, que condueix a l'activació i la hidròlisi, que torna la proteïna al seu estat inactiu. Aquest cicle es produeix gràcies a l'assistència de proteïnes auxiliars, que promouen l'intercanvi de nucleòtids units a proteïna (factors intercanviadors de nucleòtids, GEFs) o faciliten l'activitat GTPasa (proteïna acceleradora de l'activitat GTPasa, GAPs). Finalment, existeixen proteïnes que inhibeixen l'intercanvi de nucleòtids, units a la proteïna, establint la forma inactiva (inhibidor de dissociació de GTP, GDIs) (Geyer et al. 1997).

Les proteïnes Rho presenten dues formes: inactiva (citoplasmàtica) i activa (unida a membrana). En la seva forma activa, les proteïnes Rho activen la cinasa depenent de Rho, RhoK, la qual fosforila i inactiva la fosfatasa de la cadena lleugera de la miosina, que promou l'ensamblatge dels filaments de miosina i la contractilitat cel·lular. La seva unió a membrana depèn d'un residu isoprenoide (en uns casos geranilgeranil i en altres farnesil), que forma part de la seva estructura i serveix d'ancorament d'aquestes proteïnes a la membrana. Una altra regulació de les proteïnes Rho pot donar-se per unió a inhibidors com RhoGDI que les manté al citoplasma impedit la seva unió a membrana (Figura 13).

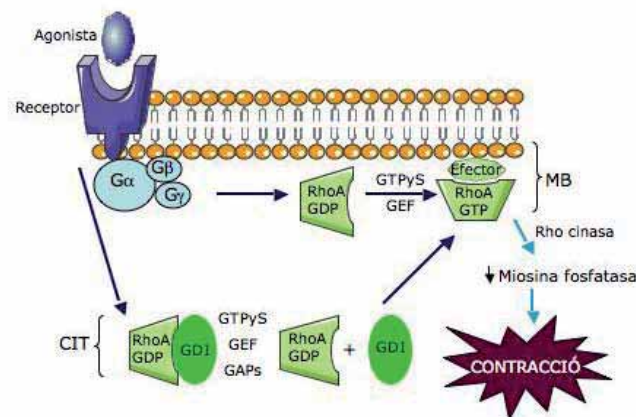


Figura 13. Esquema de la via d'actuació de RhoA

4.6. Agregació plaquetària

L'agregació és l'etapa d'amplificació que dona lloc a l'acumulació de plaquetes al trombe hemostàtic. Està regulada per substrats adhesius units a la membrana de plaquetes activades. La principal conseqüència de l'activació és un canvi conformacional del receptor $\alpha_{IIb}\beta_3$, també conegut com GPIIb-IIIa (Woodside et al. 2001), que implica un canvi en la seva funció d'unió a lligand. La $\alpha_{IIb}\beta_3$ activada contribueix a l'adhesió estable i regula la immobilització de proteïnes solubles adhesives com el vWF, el fibrinogen i la fibronectina a la superfície de plaquetes adherents; aquest és el substrat on es recluten més plaquetes. L'estabilitat dels agregats és tan important com el rati de creixement a l'hora de determinar si un trombe produirà l'oclusió del vas. Estudis recents han demostrat que CD40 lligand present a la membrana de plaquetes activades està implicat en l'estabilitat de l'agregat mitjançant la seva unió a $\alpha_{IIb}\beta_3$ (Andre et al. 2002).

D'altra banda, durant la formació del trombe també es produeix el reclutament d'altres cèl·lules sanguínies; freqüentment es troben eritròcits, neutròfils i de vegades monòcits, que arriben intactes a la zona de lesió, però responen a la presència dels components de secreció de la plaqueta, incrementant així la producció de substàncies protrombòtiques.

4.7. Coagulació i fibrinolisi

El procés de la coagulació reforça l'estabilitat de l'agregat plaquetar mitjançant la formació de fibres insolubles de fibrina. La fibrina es forma a partir del fibrinogen, que és soluble, per l'acció de la trombina, un enzim proteolític que normalment es troba en forma de protrombina. La protrombina s'activa a través de la cascada de la coagulació, que implica una sèrie de reaccions en cadena que integren zimògens i cofactors. A la cascada de la coagulació es distingeixen dues vies d'activació: la via intrínseca i la via extrínseca, les quals convergeixen en l'activació del Factor X.

La ruptura de la placa activa la coagulació a partir de l'exposició del TF a la superfície vascular desendotelitzada. El contingut en TF determina, en part, el grau de trombogenicitat de la placa ateroscleròtica (Toschi et al. 1997). El TF és una glicoproteïna de baix pes molecular, present a l'adventícia normal i a les plaques ateroscleròtiques (Grybauskas 2003), tot i que també es troba a la sang en forma encriptada i pot induir-se en cèl·lules endotelials i monòcits en resposta a diferents estímuls. També s'ha detectat presència de TF en MPs circulants derivades de cèl·lules endotelials i monòcits. D'altra banda, alguns grups han demostrat expressió de TF en plaquetes, tot i que existeix certa controvèrsia (Mackman 2006). El TF és capaç d'iniciar la via extrínseca de la coagulació al formar un complex d'alta afinitat amb els factors de coagulació VII/VIIa que així activen

els factors IX i X i, finalment, la generació de trombina, que transformarà fibrinogen en fibrina.

La funció de la fibrinolisi consisteix bàsicament en degradar les malles de fibrina i dissoldre el quall. És un sistema amb molts punts d'autoregulació on l'enzim que degrada la fibrina és la plasmina. El plasminogen és el precursor de la plasmina, que s'activa amb el t-PA o amb l'activador del plasminogen tipus urocinasa (uPA) quan ambdues molècules es troben a la superfície de la fibrina. La plasmina circulant és ràpidament inactivada per l' α_2 -antiplasmina. El sistema fibrinolític també es regula mitjançant inhibidors específics dels activadors del plasminogen, com pot ésser el PAI-1.

5. FACTORS DE RISC DE L'ATEROTROMBOSI

La recerca epidemiològica en els darrers trenta anys ha establert una sèrie de factors de risc, que són comuns en pacients que presenten malaltia ateroscleròtica. Entre els factors de risc de major importància destaquen el tabaquisme, el sedentarisme, la hipertensió, les dislipèmies, l'estrès i la diabetis. Factors no modificables com la predisposició genètica, l'edat i el sexe són també factors de risc per a la patologia cardiovascular. No obstant, recentment s'han descrit nous marcadors de risc cardiovascular com la lipoproteïna (a), la hiperhomocisteïnèmia, els processos infecciosos, la periodontitis, el fibrinogen, la microalbuminúria, les molècules d'adhesió solubles (sVCAM-1, sP-selectina), la fosfolipasa A2 associada a la lipoproteïna (LP-PLA-2) i la CRP (Manolio 2003).

El paper de la CRP com a marcador i modulador de la malaltia cardiovascular es descriu en un capítol independent més endavant.

La presència d'un o més factors de risc incrementa la incidència primària de la malaltia ateroscleròtica, promou la manifestació de la malaltia a una edat temprana i un cop la patologia ateroscleròtica és clínicament aparent contribueix a accelerar la seva progressió (Fuster et al. 1992a; Fuster et al. 1992b). Tanmateix, si s'eviten o es redueixen els factors de risc, tot i en presència de lesions ateroscleròtiques aparents, pot reduir-se el risc de ruptura de la placa i la presentació de complicacions clíniques (Burke et al. 1997; Sambola et al. 2003).

5.1. Tabaquisme

El consum de tabac és la causa evitable més important de morbiditat i mortalitat deguda a coronariopaties (Leone 2003). Dades clíniques i dades procedents d'autòpsies associen el fumar amb la progressió ràpida d'aquesta malaltia i mostren que el seu grau de severitat es relaciona directament amb el consum de tabac. El monòxid de carboni i la nicotina procedents del tabac produeixen disfunció endotelial, agregació plaquetària i vasoconstricció. El tabac augmenta l'alliberament de catecolamines, les quals augmenten els nivells de fibrinogen i potencien l'activació plaquetària. A més, el tabac indueix un increment agut de la pressió arterial, una reducció de la resistència vascular coronària i de l'alliberament d'oxigen, un increment de nivells d'homocisteïna i CRP i una reducció de lipoproteïnes d'elevada densitat (HDL), així com una major deposició de lípid extracel·lular a la placa, el que suposa una major vulnerabilitat (Leone 2003). El risc associat al tabac sembla ésser ràpidament reversible i directament relacionat amb una resposta causa-

efecte, el que suggereix que el tabac indueix principalment processos aguts a la paret vascular.

5.2. Sedentarisme

L'exercici regular pot retardar l'evolució de la placa i sembla proporcionar protecció sobre l'infart de miocardi i la mort sobtada per malaltia coronària. La pràctica regular d'exercici millora l'activitat endotelial produint un increment de la biodisponibilitat de NO (Walther et al. 2004). No obstant, l'exercici bruscat i l'activació neurohormonal simpàtica associada augmenten l'alliberament de catecolamines i poden desencadenar l'inici d'infart de miocardi a través de la ruptura brusca de la placa, l'activació plaquetària i la coagulació i/o vasoconstricció coronària.

5.3. Diabetis i obesitat

S'estima que un 10 % de les persones entre 30 i 89 anys pateix diabetis. Les complicacions clíniques de la diabetis suposen un risc elevat de patir episodis coronaris aguts trombòtics. Les plaquetes de malalts diabètics presenten hipereactivitat i hiperagregabilitat (Creager et al. 2003; Luscher et al. 2003). A més, els malalts diabètics pateixen hipertensió, retinopatia, malalties renals i neuropaties, que incrementen el risc cardiovascular. L'obesitat, per la seva banda, augmenta el risc de patir diabetis.

5.4. Hipertensió

La pressió sanguínia elevada és el factor més determinant en el desenvolupament de l'íctus. Un 35 % de la població pateix hipertensió i aquest percentatge augmenta fins a un 68 % en la població de major edat. Diversos estudis han demostrat que els inhibidors de l'enzim convertidor de l'angiotensina (ECA) i els antagonistes del receptor de l'angiotensina II (ARA) afavoreixen l'estabilització de la placa ateroscleròtica i la reducció d'events cardiovasculars (Mancini et al. 1996; Brosnan et al. 2002). L'angiotensina II provoca disfunció endotelial i indueix l'expressió de VCAM-1 i CRP, afavorint l'adhesió de monòcits a l'endoteli i mantenint un estímul inflamatori crònic, amb el que contribueix a la formació de lesions ateroscleròtiques (Kim et al. 2000). La inhibició dels efectes de l'angiotensina II sembla afectar no només la progressió de la lesió i la vulnerabilitat de la placa, sinó també els mecanismes desencadenants de l'inici de la malaltia (Hayek et al. 1999; Strawn et al. 2000).

5.5. Dislipèmies

Existeix una relació directa entre els nivells de colesterol total en sèrum i el risc de cardiopatia coronària. Concretament, el colesterol LDL és un dels principals factors desencadenants d'alteracions a l'endoteli vascular, així com del desenvolupament i progressió del procés aterogènic. Així, un perfil lipídic amb nivells elevats de colesterol LDL i triglicèrids i nivells baixos de colesterol HDL s'associa amb un risc elevat de patir malaltia cardiovascular. La seva disminució s'ha associat a una reducció del risc de cardiopatia coronària i a un retard en la progressió de l'aterosclerosi coronària (LaRosa 2003).

Les estratègies actuals dirigides a reduir els nivells de LDL circulants es basen en la modificació dels hàbits dietètics i en teràpies farmacològiques.

6. ESTATINES EN ATEROTROMBOSI

Múltiples estudis clínics i angiogràfics han demostrat que l'ús de fàrmacs hipolipemians (estatines, fibrats, àcid nicotínic) inhibeix la progressió de l'aterosclerosi, redueix l'infart de miocardi i els events coronaris (4S; WOSCOPS).

D'entre aquests fàrmacs, les estatines han demostrat ésser fàrmacs segurs, fàcils d'emprar i s'han convertit en els més receptats per reduir el colesterol plasmàtic i així afavorir l'estabilització i la regressió de la placa ateroscleròtica (estudis WOSCOPS i CARE). Els resultats clínics han demostrat que els beneficis terapèutics obtinguts amb l'ús d'estatines van més enllà dels esperats per la reducció dels nivells de colesterol plasmàtic, el que suggereix que part dels seus beneficis poden ésser independents del seu efecte hipolipemiant sistèmic (Vaughan et al. 1996; Maron et al. 2000). Els efectes independents de les estatines explicarien la temprana eficàcia clínica d'aquests fàrmacs tant en prevenció primària (estudis MIRACL, WOSCOPS, CARE) com en prevenció secundària (4S).

Les estatines inhibeixen de forma parcial, reversible i competitiva la síntesi intracel·lular de colesterol. En conseqüència, els dipòsits intracel·lulars hepàtics de colesterol disminueixen, produint la disminució dels nivells plasmàtics de colesterol LDL i de triglicèrids i augmentant els de colesterol HDL, millorant així el perfil lipídic global. Les estatines són inhibidors de la 3-hidroxi-3-metil-glutaril Coenzim A (HMG-CoA) reductasa, l'enzim responsable de catalitzar la formació de mevalonat, el que resulta en una reducció de la síntesi del colesterol (Figura 14).

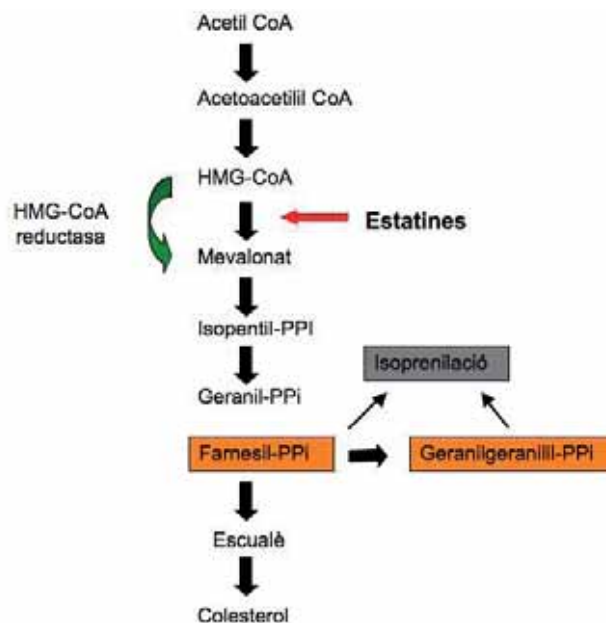


Figura 14. Via de la síntesi del colesterol

La inhibició de mevalonat també dóna lloc a una reducció dels nivells de derivats isoprenoides, els quals participen en la isoprenilació de petites GTPases de la família de Rho/Rac/Cdc42 (Brown et al. 2006). La isoprenilació facilita l'activació i translocació d'aquestes proteïnes des del citosol a la membrana plasmàtica, el que facilita la seva funcionalitat en senyalització intracel·lular. Així, les estatines inhibeixen la proliferació cel·lular i milloren la funció endotelial incrementant la biodisponibilitat de NO (Dupuis et al. 1999), disminuint l'estrès oxidatiu i l'endotelina-1. Les estatines també redueixen la inflamació perquè inhibeixen l'expressió de molècules d'adhesió, redueixen l'acumulació lipídica en CML (Llorente-Cortes et al. 1998), estableixen la placa ateroscleròtica i incrementen la fibrinolisi (Figura 15). Tot i que s'han trobat resultats contradictoris sobre l'efecte de diferents estatines en la funció plaquetària, hi ha evidències de les seves propietats antitrombòtiques. Estudis amb animals hiperlipèmics han demostrat que les estatines modulen la resposta plaquetària i redueixen el potencial trombòtic de la paret vascular (Alfon et al. 1999; Casani et al. 2005).

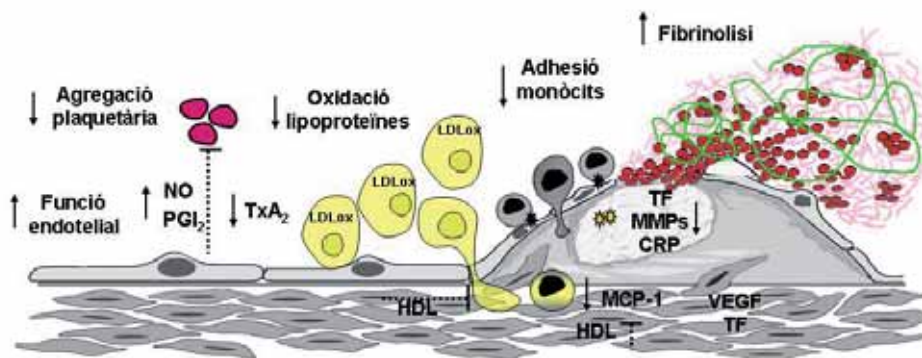


Figura 15. Principals efectes beneficiosos relacionats amb les estatines.

D'altra banda, recentment s'han demostrat nous efectes citoprotectors de les estatines mitjançant la inducció de la *glucose-regulated protein 78* (**GRP78**) en macròfags (Chen et al. 2008). La proteïna GRP78 és una proteïna majoritària del RE i juga un paper primordial en la homeòstasi del RE. A més de la seva funció com a chaperona, la GRP78 s'expressa a la superfície de diferents tipus cel·lulars (Misra et al. 2002; Misra et al. 2004; Davidson et al. 2005) i la seva desregulació està implicada en diverses malalties com el càncer (Arap et al. 2004), l'aterosclerosi, la trombosi (Bhattacharjee et al. 2005) i malalties autoimmunes (Corrigall et al. 2001).

Des de l'aparició dels primers inhibidors de la HMG-CoA reductasa, la recerca farmacològica ha evolucionat produint diferents compostos: mevastatina, lovastatina (producte natural), simvastatina (derivat semisintètic de la lovastatina), pravastatina (bioderivat de la mevastatina), fluvastatina, atorvastatina, cerivastatina i rosuvastatina

(totes d'origen sintètic). Totes aquestes estatines produeixen un efecte qualitativament similar sobre el perfil lipídic, entre un 32 % i un 55 % de reducció de colesterol LDL circulant a les dosis màximes recomanades. Estudis recents han demostrat millors resultats amb estatines en teràpies agressives que amb teràpies moderades en pacients amb malaltia coronària (Cannon et al. 2004; Nissen et al. 2005). El tractament agressiu produeix una major reducció dels nivells de LDL i CRP, suggerint la relació entre aquests dos marcadors i la progressió de la malaltia (Cannon et al. 2004; Nissen et al. 2005).

La rosuvastatina és un nou inhibidor de la HMG-CoA reductasa. És un hidroxiàcid enantiomèric simple que s'administra en forma de sal càlcica amb lipofilicitat relativament baixa (Figura 16). Estudis *in vitro* i *in vivo* han demostrat que la rosuvastatina inhibeix la HMG-CoA reductasa i la síntesi de colesterol en un grau significativament superior al d'altres estatines. De fet, l'estudi ASTEROID va demostrar que el tractament amb rosuvastatina produïa regressió de la placa ateroscleròtica (Nissen et al. 2006).

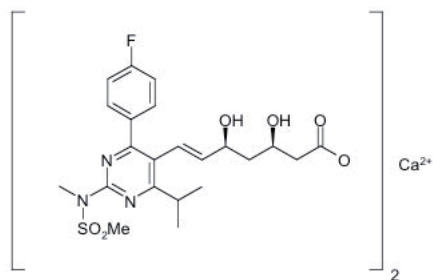


Figura 16. Estructura de la rosuvastatina

Tanmateix, l'estudi JUPITER (Ridker et al. 2008) ha demostrat recentment els efectes beneficiosos (disminució de morbiditat i mortalitat cardiovascular) associats al tractament amb rosuvastatina a través de la reducció dels nivells de CRP en pacients sense evidències de malaltia cardiovascular pre-existents i nivells de colesterol LDL normals, posant de manifest no només l'impacte de la inflamació sobre el risc cardiovascular, sinó també possibles noves indicacions terapèutiques associades a l'ús d'estatines en prevenció primària i secundària.

De totes maneres, es desconeix el paper directe de la rosuvastatina sobre les complicacions trombòtiques i si la rosuvastatina pot regular l'adhesió i activació plaquetària. És probable que la rosuvastatina produeixi un major grau de cardioprotecció que altres estatines mitjançant mecanismes independents de la reducció del colesterol.

7. PAPER DE LA CRP COM A MARCADOR I MODULADOR DE L'ATEROTROMBOSI

El reconeixement de la inflamació com a contribuent principal en la progressió de la malaltia aterotrombòtica ha provocat la focalització de nombrosos esforços en caracteritzar els mecanismes inflamatoris específics i en identificar marcadors no invasius que permetin detectar l'activació inflamatòria subjacent amb el propòsit de poder avaluar el risc cardiovascular. La **CRP**, un reactant de fase aguda, ha estat investigat en base a aquests dos objectius. Estudis epidemiològics han demostrat un augment del risc de patir events cardiovasculars en pacients amb nivells elevats de CRP (Liuzzo et al. 1994; Ridker et al. 1997; Danesh et al. 1998; Lindahl et al. 2000). Aquests fets, conjuntament amb evidències experimentals que revelen la presència de CRP en lesions ateroscleròtiques (Ross 1999; Libby 2002a; Hansson 2005) i dades clíniques que associen la disminució de nivells de CRP amb algunes teràpies preventives, han donat lloc a la hipòtesi de que la CRP sigui tant un marcador com un causant de la malaltia aterotrombòtica (Jialal et al. 2004; Verma et al. 2004).

7.1. CRP com a marcador de risc cardiovascular

Més de 30 estudis epidemiològics han demostrat una associació significativa entre nivells elevats de CRP en plasma i la prevalença de malaltia ateroscleròtica vascular, risc de recurrència d'events cardiovasculars en pacients amb malaltia ja establerta o incidència de primers events cardiovasculars en pacients amb risc. Concretament, almenys 24 estudis prospectius que mesuraven CRP ultrasensible (hsCRP) van demostrar una relació consistent i robusta entre els nivells de hsCRP i el risc de patir events cardiovasculars futurs (Ridker et al. 1997; Danesh et al. 1998; Ridker et al. 2002; Danesh et al. 2004). La CRP s'afegeix a factors de risc tradicionals per predir events coronaris, i existeixen almenys set estudis en els que la CRP es va incloure a les taules de Framingham (*Framingham Risk Score*) com a eina d'avaluació global de risc cardiovascular. Amb això, els pacients es poden categoritzar en base al seu risc i nivells de CRP com: baix (<1mg/L), intermig (2-3 mg/L) i alt (>3 mg/L) basats en el promig de dues mesures obtingudes amb una diferència d'un mínim de dues setmanes (Pearson et al. 2003). No obstant, nivells de CRP >10 mg/L no es poden utilitzar per avaluar risc cardiovascular, havent de descartar altres processos inflamatoris actius (infeccions, trauma, etc). Addicionalment, nivells elevats de CRP també s'han relacionat amb el nivell de necrosi miocàrdica en pacients amb infart de miocardi

amb elevació del segment ST (Cusack et al. 2002), indicant la capacitat del dany miocàrdic de disseminar la resposta inflamatòria local a òrgans distals.

D'altra banda, teràpies específiques que són efectives en prevenció primària i secundària han demostrat reduir els nivells de CRP i/o mitigar el risc associat amb nivells alts d'aquest marcador (Libby et al. 2002b). Aquestes observacions proporcionen evidències indirectes que han donat lloc a un creixent interès per la CRP com a contribuent directe de l'aterotrombosi.

L'aparició de la CRP com el marcador inflamatori més estudiat clínicament és en gran part degut a les seves propietats analítiques i preanalítiques. Les propietats biològiques de la CRP així com la seva cinètica –una vida mitja de 18 h, manca d'associació amb la ingesta i els cicles circadians- fan que sigui una proteïna sèrica relativament estable en comparació amb molts altres marcadors. D'altra banda, els assajos de la CRP són sensibles, reproduïbles, estandaritzats internacionalment, relativament poc cars i àmpliament disponibles (Ledue et al. 2003). A més, la disponibilitat de preparacions de CRP per calibratge d'aquests assajos també ha proporcionat una font molt convenient de CRP exògena per experiments amb animals i *in vitro*.

7.2. Conformacions de la CRP

La CRP és una proteïna plasmàtica que pertany a la família de les pentraxines. El seu nivell en plasma és de 0,8 mg/L (Shine et al. 1981) i augmenta fins a 1000 vegades en 24-72 h en resposta a moltes formes de dany tissular, infecció i inflamació (Pepys et al. 1983). La CRP es troba en, almenys, dues conformacions diferents amb propietats i activitats biològiques diferents; la forma nativa (natCRP) i la forma monomèrica (mCRP) (Figura 17).

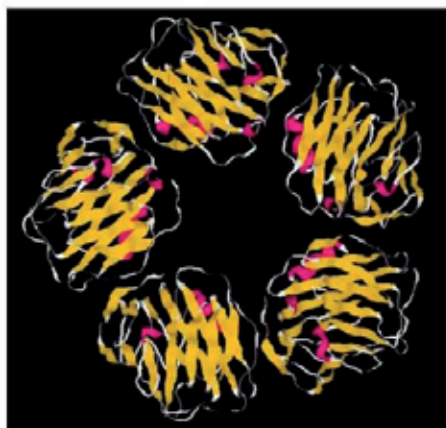


Figura 17. Estructura pentamèrica de CRP

7.3. CRP nativa

natCRP és un disc cíclic format per 5 subunitats globulars idèntiques no glicosilades de 23 kDa, unides de forma no-covalent. És una proteïna molt soluble en sèrum que presenta afinitat calci-dependent pels monoèsters de fosfat, en particular la fosfocolina. Té altres lligands intrínsecs com les lipoproteïnes plasmàtiques natives i modificades (Pepys et al. 1983), membranes cel·lulars danyades (Volanakis et al. 1979), cèl·lules apoptòtiques (Gershov et al. 2000) i fibronectina (Salonen et al. 1984). D'entre els lligands extrínsecs es troben components bacterials, fongs i paràsits. Quan s'uneix a aquests lligands, la CRP és reconeguda pel factor del complement C1q, produint així l'activació de la via clàssica del complement. En sèrum, els nivells de CRP augmenten ràpidament en resposta a estímuls inflamatoris. El gen que codifica per a les subunitats de CRP es troba al cromosoma 1 (Whitehead et al. 1983). La CRP es sintetitza principalment al fetge i la seva inducció en hepatocits està regulada principalment a nivell transcripcional per la citocina IL-6 i en menor grau per la IL-1 β i el TNF- α (Mackiewicz et al. 1991). natCRP és la conformació de CRP que es mesura en la pràctica clínica diària i representa el clàssic reactant de fase aguda.

7.3.1. Localització

En la majoria dels estudis publicats, les preparacions comercials de CRP i els anticossos anti-CRP s'han fet servir sense distingir entre les dues isoformes de la CRP. Tot i aquesta limitació, els efectes observats generalment s'han atribuït a la forma nativa (natCRP) i, per tant, es resumeixen en aquesta secció. Estudis immunohistoquímics van demostrar que la CRP es dipositava amb LDL oxidades o enzimàticament modificades i amb el complex del complement C5b-9 a la paret arterial (Torzewski et al. 2000). Alguns grups (Yasojima et al. 2001; Jabs et al. 2003) també han reportat col·localització de la CRP i components del complement amb CML i macròfags en teixits arterials normals i en placa.

Cal remarcar, però, que la majoria d'anticossos policlonals anti-CRP utilitzats per immunohistoquímica reconeixen antígens de natCRP i mCRP (Ying et al. 1989). A més, l'anticòs monoclonal anti-CRP clon 8, àmpliament utilitzat per la detecció de CRP en la paret vascular, ha demostrat detectar predominantment mCRP i no natCRP (Schwedler et al. 2003).

7.3.2. Estudis *in vitro*

Els efectes de CRP en monòcits/macròfags i en cèl·lules endotelials i musculars s'han interpretat principalment com a proinflamatoris i proaterotrombòtics (Jialal et al. 2004; Mazer et al. 2004). Els potencials efectes sobre diferents vies es presenten a la Figura 18. Un aspecte important del dany endotelial i del desenvolupament inicial de l'aterosclerosi que involucra la CRP pot estar relacionat amb l'elevada producció de radicals d'oxigen (Landmesser et al. 2001). De fet, l'expressió de CRP en artèries coronàries col·localitza freqüentment amb p22^{phox}, component essencial de la nicotinamida adenin dinucleòtid fosfat (NAD[P]H) oxidasa, font important d'espècies reactives d'oxigen a la vasculatura (Kobayashi et al. 2003). D'altra banda, la CRP regula a l'alça l'ARN missatger (ARNm) i l'expressió de proteïna del receptor de l'angiotensina I en CML (Wang et al. 2003), a través del qual la NADP(H) oxidasa podria estimular-se. Un estudi recent ha demostrat que la CRP inhibeix la dilatació mediada per NO dependent de l'endoteli a través de l'activació de p38 MAPK i NAD(P)H oxidasa (Qamirani et al. 2005).

No obstant, la CRP també produeix efectes que podrien interpretar-se com a vasculoprotectors. En aquest sentit, la CRP produeix vasorelaxació independent de l'endoteli (Sternik et al. 2002) i hiporeactivitat a fenilefrina produïda per un augment de NO en vasos humans *in vitro* i regulació a l'alça de proteïnes inhibidores del complement en cèl·lules endotelials (Li et al. 2004). Els efectes duals de la CRP en la resposta cel·lular i immune poden explicar-se, en part, per variables metodològiques. En primer lloc, molts grups no controlaven la presència de contaminants en les preparacions comercials de CRP, com LPS o azida sòdica. Diversos estudis han demostrat que els efectes proinflamatoris, proapoptòtics, antiproliferatius i antiangiogènics de preparacions comercials de CRP poden atribuir-se a la presència d'azida sòdica, LPS, o ambdós (Liu et al. 2005; Taylor et al. 2005). En segon lloc, l'emmagatzematge prolongat de CRP purificada en absència d'ions de calci o en presència d'agents quelants dona lloc a la conversió espontània de natCRP en mCRP (Zouki et al. 2001). Diversos estudis han demostrat que les diferents isoformes de la CRP presenten bioactivitats diferents *in vitro*. natCRP, lliure de contaminacions amb LPS, azida sòdica o mCRP, atenua eficaçment la resposta inflamatòria inhibint l'activació, l'adhesió i el tràfic de neutròfils (Zouki et al. 1997; Zouki et al. 2001). natCRP també inhibeix l'agregació de plaquetes humanes en resposta a diversos estímuls (Fiedel et al. 1982; Vigo 1985). En canvi, natCRP mínimament oxidada o agregada per temperatura indueix l'agregació plaquetària (Fiedel 1985; Miyazawa et al. 1988). D'altra banda, el cultiu de cèl·lules endotelials coronàries humanes amb natCRP durant períodes de temps curts no indueix la secreció de citocines ni l'expressió de molècules d'adhesió (Khreiss et al. 2004a; Khreiss et al. 2005). Tot i això, un estudi recent ha demostrat que natCRP regula a l'alça la

producció d'interleucina-8 (IL-8) i PAI-1 en cèl·lules endotelials d'aorta humana i redueix la secreció de prostaciclina i NO sintasa (Devaraj et al. 2006).



Figura 18. Efectes anti- i pro- inflamatoris de natCRP. La majoria dels resultats *in vitro* recolzen el paper proinflamatori de natCRP. No obstant, en molts casos, la presència de contaminants i de mCRP en les preparacions de CRP pot haver estat el causant dels efectes observats.

7.3.3. Models animals

L'estudi de natCRP en animals d'experimentació també ha donat lloc a resultats duals. Per exemple, ratolins que expressaven el gen de CRP humana (CRPtg) van resultar ésser resistent a endotoxèmia (Xia et al. 1997) i a infecció fatal amb *Streptococcus pneumoniae* (Szalai et al. 1995) o amb *Salmonella enterica* (Szalai et al. 2000). L'expressió del gen de la CRP humana també s'associa amb una reducció de bacterèmia comparat amb animals de soca salvatge infectats. En canvi, la injecció per via parenteral de CRP humana en rates va produir un augment del dany tissular en infart de miocardi dependent del complement (Griselli et al. 1999). L'expressió del gen de la CRP humana en ratolins ApoE^{-/-} va accelerar la progressió de l'aterosclerosi (Paul et al. 2004). Diversos estudis recents han estudiat l'impacte de la CRP sobre l'aterogènesi sobreexpressant CRP humana (Hirschfield et al. 2005; Kovacs et al. 2007) o de conill (Reifenberg et al. 2005) en

ratolins ApoE^{-/-}. Cap d'aquests estudis ha trobat evidències de que CRP fos aterogènica. En un altre estudi es va suggerir que CRP podria ésser protrombòtica perquè ratolins CRPtg van presentar una major resposta trombòtica després de sotmetre'ls a dany vascular (Danenberg et al. 2003). De totes maneres, els efectes de CRP observats en ratolins no són extrapolables a humans perquè CRPtg humana o de conill no activa el complement murí, un component crucial en la progressió de l'aterosclerosi.

7.4. CRP modificada

natCRP pot dissociar-se en les seves subunitats monomèriques individuals com, per exemple, quan s'associa a la membrana cel·lular (Ji et al. 2007). Aquesta reorganització conformacional modifica significativament l'estructura de CRP, així com la seva solubilitat i antigenicitat. Aquesta diferent conformació de CRP es coneix com CRP "monomèrica" o "modificada", mCRP. De la mateixa forma que natCRP, mCRP és una proteïna estable que es troba de forma natural, tot i que no és detectable en sèrum. mCRP es caracteritza per una reduïda solubilitat i una certa tendència a autoagregar-se, representant la forma unida a teixit de CRP. mCRP es pot obtenir *in vitro* per quelació amb urea, condicions àcides o calor (Potempa et al. 1983; Kresl et al. 1998). S'han identificat antígens que reaccionen de manera creuada amb anticossos anti-mCRP en monòcits/macròfags humans (Kolb-Bachofen et al. 1995), cèl·lules epitelials del tracte respiratori (Gould et al. 2001) i íntima arterial tant normal com inflamada (Diehl et al. 2000).

7.4.1. Localització

mCRP és un constituent natural de la íntima vascular (Diehl et al. 2000) i probablement té funcions regulatòries específiques en la homeòstasi vascular. Estudis recents han reportat expressió de mCRP en cèl·lules endotelials i en matriu extracel·lular en lesions ateroscлерòtiques de ratolins ApoE^{-/-} (Schwedler et al. 2005). La interacció entre la fibronectina de la matriu i CRP és dependent del pH (Suresh et al. 2004). En condicions fisiològiques, la unió de Ca²⁺ a CRP evita la interacció amb fibronectina de la matriu extracel·lular. No obstant, en zones de pH baix, com a la placa ateroscлерòtica o als tumors, la CRP unida a Ca²⁺ adquireix la capacitat d'interaccionar amb fibronectina. Es desconeix si aquesta diferent capacitat d'unió implica canvis conformacionals de CRP. En plaques de ratolins ApoE^{-/-} s'ha detectat col·localització de mCRP amb macròfags i Apo B, el que suggereix que mCRP podria participar en el desenvolupament de cèl·lules

escumoses. Això lliga amb el fet que la unió de CRP a LDL natives, oxidades o modificades enzimàticament té lloc principalment quan CRP ha sofert canvis conformacionals.

Un nombre creixent d'evidències confirma la síntesi extrahepàtica de CRP. S'ha detectat CRP (ARNm i proteïna) en limfòcits (Bray et al. 1988), cèl·lules mononucleades de sang perifèrica (Murphy et al. 1991), cèl·lules Kupffer de rata, macròfags (Kolb-Bachofen et al. 1995), illots pancreàtics, neurones (Yasojima et al. 2000), teixit adipós (Ouchi et al. 2003), cèl·lules endotelials, CML (Yasojima et al. 2001; Jabs et al. 2003), ronyó i cèl·lules epitelials del tracte respiratori (Gould et al. 2001). La majoria de la CRP sintetitzada extrahepàticament és poc soluble, la proteïna no és secretada, s'expressa intracel·lularment o unida a la membrana cel·lular i expressa antigenicitat de mCRP. Així doncs, fins que no es demostrï el contrari, no es pot assumir que la CRP sintetitzada extrahepàticament sigui la forma soluble pentamèrica de CRP. És possible que les subunitats de CRP sintetitzades extrahepàticament no es processin en forma de discs pentamèrics i que romanguin com a proteïnes poc solubles, autoagregades, que puguin depositar-se en zones localitzades al voltant de les cèl·lules que les hagin sintetitzat.

7.4.2. Estudis *in vitro*

In vitro, la pèrdua de la simetria pentamèrica s'ha associat predominantment amb un fenotip proinflamatori (Figura 19). Per exemple, mCRP inhibeix l'apoptosi espontània en neutròfils humans (Khreiss et al. 2002) i promou l'adhesió a cèl·lules endotelials de coronària humana per un mecanisme dependent de CD18 (Zouki et al. 2001). A més, mCRP indueix la secreció d'IL-8 en neutròfils mitjançant l'activació de NF- κ B (*nuclear factor κ B*) i AP1 (proteïna activadora-1) (Khreiss et al. 2005). En altres estudis s'ha observat una inhibició de la quimiotaxi dels neutròfils produïda per mCRP similar a la produïda per natCRP (Heuertz et al. 2005). D'altra banda, mCRP però no natCRP, activa ràpidament cèl·lules endotelials a través d'un mecanisme dependent de p38 MAPK (Khreiss et al. 2004a). En canvi, natCRP necessita temps d'incubació prolongats (>24 h) per activar cèl·lules endotelials. D'altra banda, Khreiss i els seus col·laboradors (Khreiss et al. 2004b) van reportar que mCRP accelerava la formació d'agregats neutròfil-plaqueta mitjançant una regulació oposada de natCRP i mCRP de P-selectina i CD11/CD18. Els efectes de natCRP en neutròfils, plaquetes i cèl·lules endotelials es reverteixen remarcablement, tot i que no completament, bloquejant el receptor Fc γ RII (CD32), mentre que els efectes de mCRP es reverteixen només bloquejant el receptor Fc γ RIII (CD16), suggerint la participació de receptors diferents per les diferents isoformes de CRP.

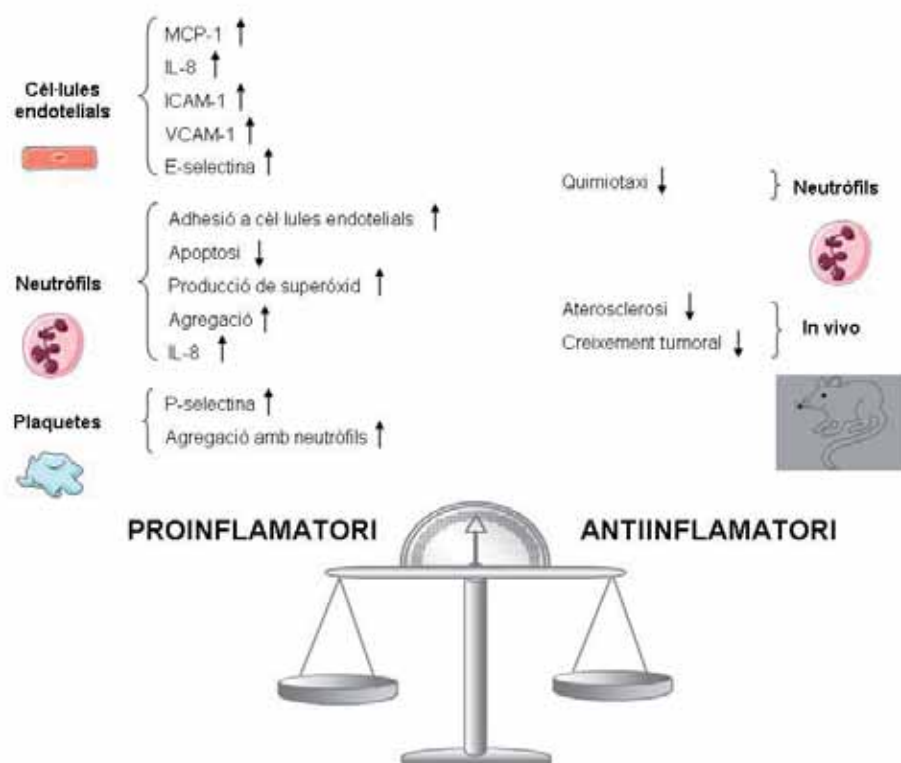


Figura 19. Efectes anti- i pro- inflamatoris de mCRP. La major part del les activitats *in vitro* són consistents amb un paper proinflamatori de mCRP.

7.4.3. Models animals

Els efectes *in vivo* de mCRP són encara força desconeguts. En ratolins portadors d'una línia cel·lular d'adenocarcinoma de mama, el tractament amb mCRP va frenar eficaçment la progressió i el creixement del tumor (Kresl et al. 1999). Aquestes observacions són consistents amb un paper de mCRP relacionat amb l'increment de la vigilància immunitària, amplificant mecanismes d'immunitat innata.

Un estudi recent va fer servir un model d'inici d'aterosclerosi en ratolins ApoE^{-/-} amb injecció subcutània de dosis baixes de CRP durant un període de temps llarg (Schwedler et al. 2005). En aquest model es va observar que natCRP humana accelerava la progressió de l'aterosclerosi i, en canvi, mCRP prevenia parcialment la formació de la placa. L'augment d'aterosclerosi induïda per natCRP es va associar amb una regulació a l'alça de ICAM-1 i VCAM-1. En canvi, la injecció de mCRP va resultar en una reducció de la progressió de l'aterosclerosi induint l'expressió d'interleucina-10 (IL-10). Cal remarcar però, que aquest model no reflexava els nivells sistèmics de CRP ni l'efecte directe de CRP circulant sobre la formació de la placa ateroscleròtica.

És important destacar que els estudis de CRP realitzats amb el model murí no són extrapolables a humans perquè la CRP no és un reactant de fase aguda en ratolins. El desenvolupament de ratolins transgènics que sobreexpressen CRP també presenta limitacions degut a que la CRP humana és una proteïna "estrangera" en el ratolí i ha donat lloc a resultats controvertits.

En resum, la CRP està demostrant ésser un potent marcador de risc cardiovascular. Els estudis experimentals que relacionen la CRP com un agent causal de la malaltia aterotrombòtica continuen emergent. De totes maneres calen més estudis adreçats a la bioactivitat diferencial de les isoformes de la CRP en la malaltia aterotrombòtica, així com la validació clínica del paper de la isoforma monomèrica de CRP.

OBJECTIUS

Les plaquetes juguen un paper fonamental en els processos trombòtics i en les seves manifestacions clíniques, així com en el desenvolupament de la malaltia aterotrombòtica. Els mecanismes d'adhesió plaquetària i formació de trombes arterials venen determinats en gran mesura per l'entorn biomecànic, concretament per la velocitat i l'esforç de cisalla local. Malgrat els avenços realitzats en els darrers anys en prevenció primària i secundària de les malalties cardiovasculars, en els propers anys la malaltia ateroscleròtica i les seves complicacions trombòtiques continuaran essent la principal causa de mortalitat. El present treball pretén aprofundir en el coneixement de diferents mecanismes relacionats amb els processos inflamatoris implicats en el desencadenament de la trombosi arterial, concretament en els processos d'adhesió i activació plaquetàries.

Degut a la creixent importància del paper de la CRP no només com a marcador sinó com a modulador de la malaltia cardiovascular ens vàrem plantejar la hipòtesi que la CRP podria afectar l'adhesió plaquetària. Tanmateix, degut a la controvèrsia que ha sorgit dels estudis amb CRP vàrem hipotetitzar que les diferents isoformes de la CRP podrien tenir diferents efectes sobre el creixement del trombe en condicions de flux arterial.

D'altra banda, es desconeix si la isquèmia *per se*, en absència de malaltia ateroscleròtica subjacent i altres factors de risc, pot produir una resposta inflamatòria aguda tant local com sistèmica que indueixi l'activació i l'adhesió de les plaquetes. Per aquest motiu vàrem plantejar estudiar l'efecte del temps d'oclusió sobre la resposta inflamatòria local i sistèmica desencadenada i la subsegüent adhesió i activació plaquetària.

Finalment, degut a que els efectes beneficiosos de les estatines en la prevenció de la malaltia aterotrombòtica van més enllà dels seus efectes hipolipemiants, ens vàrem proposar estudiar l'efecte del bloqueig de la HMG-CoA reductasa sobre la formació del trombe i identificar nous potencials mecanismes d'acció sobre les plaquetes.

D'aquesta manera, la **hipòtesi** general plantejada en aquest treball consisteix en que, la inflamació, ja sigui desencadenada per la proteïna C-reactiva o la isquèmia miocàrdica, o bé modulada pel bloqueig de la HMG-CoA reductasa està directament implicada en el desencadenament de processos d'adhesió i activació plaquetàries i, conseqüentment en el risc de trombosi arterial.

Per desenvolupar aquesta hipòtesi els **objectius** específics que es van plantejar van ésser els següents:

Objectiu I. Estudiar els efectes de les diferents isoformes de la CRP sobre el creixement del trombe.

1. Avaluar l'efecte de les isoformes nativa i modificada de CRP (natCRP i mCRP), tant en forma circulant com immobilitzades, sobre la deposició plaquetària, la mida dels agregats i l'alçada del trombe en condicions de flux arterial.
2. Estudiar la distribució de les diferents isoformes de CRP dins l'estructura dels trombes formats en condicions de flux arterial.
3. Analitzar l'efecte de les diferents isoformes de CRP sobre l'activació plaquetària.

Objectiu II. Estudiar si la isquèmia miocàrdica presenta propietats proinflamatòries i protrombòtiques a nivell local i sistèmic.

1. Avaluar la resposta inflamatòria local produïda per oclusió coronària en un model porcí d'infart de miocardi, mitjançant l'anàlisi dels nivells d'expressió cardíacs de mCRP, IL-6, TNF- α .
2. Analitzar la distribució de mCRP al teixit cardíac.
3. Avaluar l'efecte del temps d'oclusió coronari en l'activació i deposició de les plaquetes.

Objectiu III. Estudiar si el bloqueig de la HMG-CoA reductasa inhibeix la deposició plaquetària, així com els mecanismes implicats en el procés.

1. Avaluar l'efecte de la rosuvastatina sobre la deposició plaquetària en diferents condicions de flux.
2. Identificar proteïnes de les plaquetes modulades pel tractament amb rosuvastatina.
3. Analitzar i caracteritzar el paper de la GRP78 (glucose regulated protein 78) de la plaqueta en la formació del trombe.

METODOLOGIA

1. PREPARACIÓ I CARACTERITZACIÓ DE NATCRP I MCRP I DELS SEUS ANTICOSSOS

Com s'ha comentat anteriorment, la presència de contaminants (especialment *LPS* i azida sòdica) en preparacions de CRP ha donat lloc a resultats controvertits en estudis de CRP *in vitro*, fet que ha qüestionat la validesa de molts d'aquests estudis. Per aquest motiu, es va tenir especial cura en la preparació i caracterització de les diferents isoformes de CRP.

1.1. Obtenció de natCRP i mCRP

natCRP humana d'alta puresa (Calbiochem) es va emmagatzemar en tampó de 10 mM/L Tris, 140 mM NaCl i 2 mM CaCl₂ a pH 8,0 per evitar la formació espontània de mCRP a partir de la forma nativa del pentàmer. La forma monomèrica de CRP es va obtenir per quelació amb urea de la forma nativa, segons van descriure Potempa i els seus col·laboradors (Kresl et al. 1998). Breument, natCRP (1 mg/mL) es va quelar amb 10 mM/L d'àcid etilendiamino tetraacètic (EDTA) i es va incubar amb 8,0 M d'urea durant 6 h a 37 °C. La urea es va eliminar dialitzant contra un tampó TBS de reduïda força iònica (10 mM Tris-HCl i 0,05 M NaCl a pH 7,3). La concentració de mCRP es va determinar pel mètode de l'àcid bicinconínic (BCA). Es van seguir les indicacions establertes per la casa comercial i es va fer servir una recta patró d'albúmina de sèrum boví (BSA). Tant les mostres diluïdes com la recta patró es van incubar amb el reactiu durant 30 min a 37 °C i es va llegir l'absorbància a 562 nm. La solució filtrada es va emmagatzemar a 4 °C i es va utilitzar durant les següents 24 h.

1.2. Caracterització dels anticossos

Els anticossos dirigits específicament a la isoforma nativa (clon 1D6) i a la isoforma monomèrica (clon 8C10) van ésser gentilesa del Dr. Larry Potempa (Ying et al. 1989; Schwedler et al. 2003) i les seves especificitats es van demostrar mesurant les seves característiques d'afinitat d'unió.

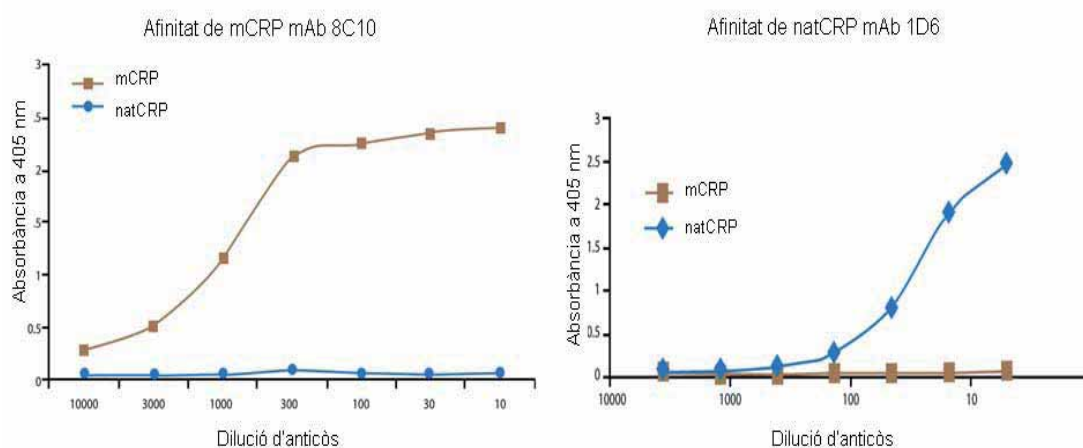


Figura 20. Afinitats d'unió a mCRP i natCRP dels anticossos anti-mCRP (clon 8C10) i anti nat-CRP (1D6).

1.3. Caracterització de mCRP i natCRP: Electroforesi i dot blot

Per validar la total modificació de les isoformes de CRP, es va realitzar una electroforesi per distingir les dues isoformes segons el mètode descrit per Taylor i col·laboradors (Taylor et al. 2007). Es van utilitzar gels d'acrilamida del 12 % i es va efectuar l'electroforesi a 30 mA amb gels de 0,75 mm en una unitat d'electroforesi de BioRad (BioRad Powe Pac 300). Per obtenir les proteïnes en condicions desnaturalitzants les mostres es van escalfar 10 min a 90 °C i es va afegir β -mercaptoetanol a l'1 %. També es van analitzar les proteïnes en condicions no desnaturalitzants. Les proteïnes es van visualitzar per tinció amb blau de comassie. La tinció amb blau de comassie es va fer en agitació suau amb una solució 1:1 de Comassie Brilliant Blue R (Merck) i 20 % d'àcid acètic durant 20 min. Un cop tenyits, els gels es van rentar amb una solució d'etanol, aigua i àcid acètic (3:6:1) per eliminar l'excés de colorant.

En condicions no desnaturalitzants, natCRP va córrer com una banda difusa amb un pes molecular aparent de 40-80 kDa. En canvi, mCRP apareixia com una sola banda ben definida amb un pes de 23 kDa (Figura 21A). Es va poder observar que natCRP no estava contaminada amb mCRP doncs no es va detectar la presència de cap banda a 23 kDa. També es va poder observar la completa transformació de CRP en la forma monomèrica amb urea perquè mCRP va migrar com una sola banda amb un pes de 23 kDa. A l'escalfar i reduir les mostres amb β -mercaptoetanol natCRP es desnaturalitzava i corria com una sola banda de forma similar a mCRP. Aquest mètode d'electroforesi va permetre comprovar qualitativament la correcta modificació de mCRP.

La puresa de les preparacions de les diferents isoformes de CRP també es va analitzar per dot blot. Tot i que el dot blot no és una tècnica quantitativa, és una eina molt útil per determinar la presència de natCRP en preparacions de mCRP i viceversa, ja que no es sotmeten les mostres a cap tipus de desnaturalització com en el cas de l'electroforesi i s'evita la transformació de CRP perquè la immobilització es fa sobre un substrat no carregat. Per fer el dot blot es van immobilitzar natCRP i mCRP en diferents dilucions directament sobre membranes de nitrocel·lulosa. Les membranes es van bloquejar amb proteïnes de la llet al 5 % (llet en pols descremada) en tampó TBS (*tris buffer saline*, 0,1 M NaCl, 10 mM Tris Base, pH 7,4) amb 0,05 % de Tween 20. A continuació es van incubar les membranes amb els corresponents anticossos específics de cada una de les isoformes de CRP (anti-mCRP clon 8C10 i anti-natCRP clon 1D6). Després de rentar les membranes amb TBS-Tween es va incubar amb anticòs secundari unit a peroxidasa de rave. El revelat de les membranes es va fer amb un substrat per a la peroxidasa (SuperSignal West Dura, Pierce) i es va captar el senyal per quimioluminiscència (Chemi-Doc, BioRad).

El dot blot va permetre comprovar la puresa de la preparació comercial de natCRP, així com la total transformació de mCRP amb el tractament amb urea (Figura 21B).

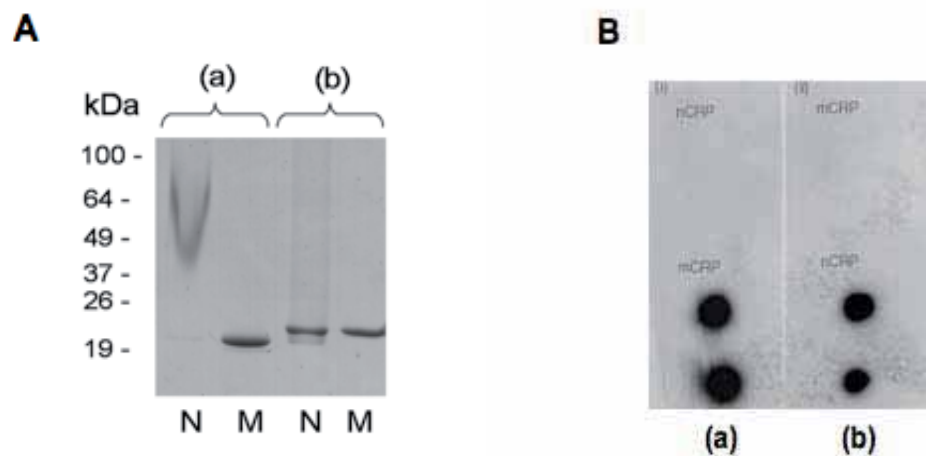


Figura 21 A. Electroforesi de natCRP (N) i mCRP (M) en condicions no desnaturalitzants (a) i en condicions desnaturalitzants (b). B. Dot blot de natCRP i mCRP amb anticòs anti-mCRP (a) i anti-natCRP (b).

L'azida sòdica es va eliminar de les preparacions de CRP dialitzant contra grans volums de tampó de TBS. Els nivells d'endotoxina en les preparacions de CRP es trobaven per sota del límit de detecció de l'assaig de *limulus* (<0,125 EU/mL).

2. OBTENCIÓ DE SANG I PLAQUETES

Pels estudis *in vitro* de CRP i rosuvastatina (Articles I i III) es va obtenir sang procedent de voluntaris sans, no fumadors, que no havien pres fàrmacs antiplaquetars en els darrers 15 dies. Els procediments van ésser aprovats pel Comitè de Recerca de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. La sang es va extreure per punció venosa i es va recollir en heparina sòdica (10 UI/mL) o citrat sòdic al 3,8 % en proporció 1:10 v/v, en funció de l'experiment.

D'altra banda, també es va obtenir sang porcina de femelles de raça Landrace Large White, d'uns 46 kg de pes. Els procediments van seguir les guies de l'*American Physiological Society* de recerca animal. La sang es va extreure per punció de la vena femoral.

Per l'estudi de l'efecte de l'oclusió coronària sobre la resposta inflamatòria i activació plaquetària (Article III) la sang porcina es va extreure per punció de la vena femoral en diferents temps: T0 (20 min després de l'administració del bolus d'heparina i just abans d'iniciar l'oclusió de l'artèria coronària); T30 (30 min després de l'inici de l'oclusió); T90 (90 min després de l'inici de l'oclusió).

La sang es va mantenir en agitació suau a 20 °C i es va fer servir durant les següents 2 h des de la seva extracció. El recompte plaquetar i leucocitari, així com l'hematòcrit estaven dins el rang de normalitat. Pels experiments de perfusió les plaquetes es van marcar amb mepacrine 10 µM. El mepacrine és un antibiòtic fluorescent que es concentra als grànuls densos de plaquetes i leucòcits i no té cap efecte en la funció plaquetària en aquesta concentració. Plaquetes i leucòcits es distingeixen clarament per epifluorescència i qualsevol fluorescència dels eritròcits és neutralitzada per l'hemoglobina (Savage et al. 1999).

3. EXPERIMENTS DE PERFUSIÓ IN VITRO AMB CAMBRA PLANA

3.1. Preparació de substrats trombogènics

Es va preparar una dissolució d'àcid acètic 0,5 M, pH 2,8 que contenia 10 µg/mL de col·lagen I i es va aplicar sobre porta-objectes de vidre prèviament rentats amb aigua i etanol al 70 %. Els porta-objectes es van incubar amb la solució de col·lagen en cambra humida durant 20 h a 4 °C o durant 1 h a temperatura ambient. A continuació es van rentar els porta-objectes amb tampó PBS (*phosphate buffer saline*) per eliminar el col·lagen no immobilitzat.

Taula 4. Tampó PBS

Reactiu	Concentració
NaCl	147 mM
KCl	2,7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM

En alguns casos els porta-objectes una vegada recoberts de col·lagen I es van incubar 3 h a 37 °C amb 5 µg/mL de natCRP o mCRP per immobilitzar les diferents isoformes de CRP amb les fibres de col·lagen.

3.2. Cambra de perfusió

El model de cambra plana de perfusió va ésser desenvolupat per Sakariassen i els seus col·laboradors (Baumgartner 1973; Turitto 1974; Sakariassen et al. 1989) i ha estat àmpliament utilitzat per estudiar mecanismes d'adhesió plaquetària i de formació de trombes en condicions de flux. La cambra plana de perfusió permet simular de manera simplificada condicions hemodinàmiques arterials d'elevada velocitat de cisalla. S'utilitza un porta-objectes de plàstic o vidre recobert de material vascular com fibres de col·lagen, matriu extracel·lular, cèl·lules endotelials o biomaterials per analitzar la potencial adhesió plaquetària i la formació de trombes en condicions de flux.

El sistema consisteix en un reservori de fluid, un circuit de tubs de silicona, una bomba peristàltica (Master Flex, Cole Parmer) i la cambra de perfusió, que permet exposar

diferents substrats al flux sanguini. La cambra està formada per una base de policarbonat amb tres sortides (entrada i sortida de flux i connexió a buit) i un porta-objectes (recobert de col·lagen I). La base i el porta-objectes estan separats per una làmina o *gasket* de silicona. El sistema es manté estanc mitjançant l'aplicació del buit. El flux a l'interior de la cambra és laminar amb valors de velocitat de cisalla coneguts d'entre 50 i 10500 s⁻¹, que venen donats per la geometria de la làmina de silicona i per la velocitat del flux sanguini, segons l'equació:

$$\gamma = 6 Q / a^2 b$$

on:

γ = velocitat de cisalla (s⁻¹)

a = alçada del canal de la cambra de perfusió (cm)

b = amplada del canal (cm)

Q = cabal volumètric (mL/s)

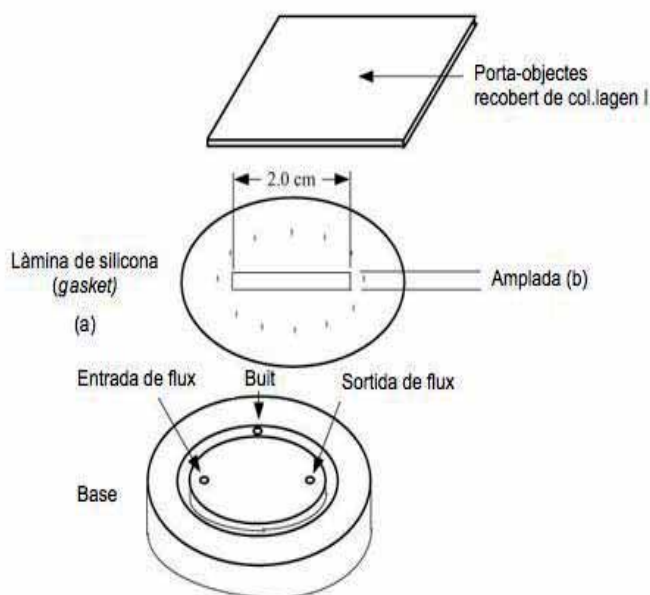


Figura 22. Esquema de la cambra plana de perfusió

Els paràmetres "a" i "b" venen definits per la geometria dels *gaskets* de silicona disponibles, que es presenten a la taula següent:

Taula 5. Dimensions dels gaskets disponibles

Gasket	A	B	C	D
Gruix, "a" (cm)	0,0127	0,0254	0,0254	0,0254
Amplada, "b" (cm)	0,25	0,25	0,50	1,0

Per a cada geometria de *gasket* es pot calcular la relació lineal entre el cabal volumètric proporcionat per la bomba peristàltica i la velocitat de cisalla.

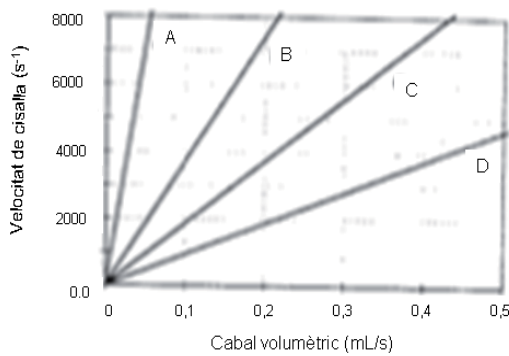


Figura 23. Relació de la velocitat de cisalla amb el cabal volumètric en funció de la geometria dels gaskets

Per optimitzar al màxim el volum de sang necessari pels experiments de perfusió es van utilitzar els *gaskets* de menor amplada (A i B). Per obtenir valors de velocitat de cisalla elevats (1500 s^{-1}) es va fer servir el *gasket* de menor gruix (A).

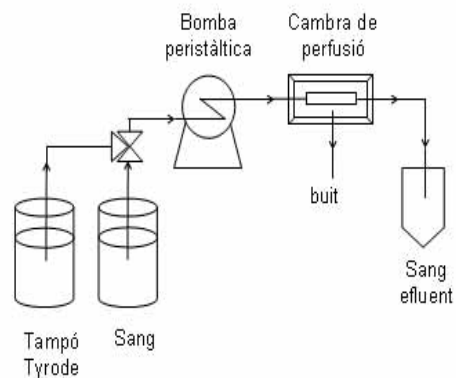
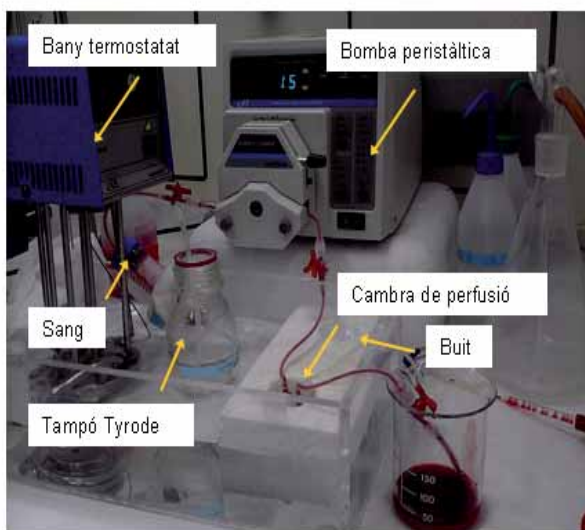


Figura 24. Representació del sistema de perfusió

El sistema es va muntar i es va omplir de tampó Hepes-Tyrode. Després d'1 min de preperfusió amb el tampó, es va perfundir sang per la cambra plana a velocitats de cisalla constants d'entre 100 s^{-1} i 3000 s^{-1} durant 5 min. Per simular condicions de flux venós amb velocitat de cisalla baixa es van fer les perfusions a 250 s^{-1} , i per simular condicions hemodinàmiques d'elevada velocitat de cisalla les perfusions es van fer a 1500 s^{-1} . Un cop transcorregut el temps de perfusió, el sistema es va reperfundir 1 min amb tampó Hepes-Tyrode mantenint les mateixes condicions de flux. Durant els experiments de perfusió el sistema es va mantenir a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ submergint el sistema (a excepció de la bomba peristàltica) en un bany termostatat.

Taula 6. Tampó Hepes-Tyrode

Reactiu	Concentració
NaCl	134 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$	0,34 mM
KCl	2,9 mM
NaHCO_3	12 mM
$\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	1 mM
Hepes	20 mM

Després de cada perfusió, els porta-objectes recoberts de col·lagen es van desmuntar del sistema amb molta cura, es van rentar amb PBS i es van fixar amb paraformaldehid al 3,8 % durant 15 min. Els porta-objectes un cop fixats es van tornar a rentar amb PBS i es van muntar amb Glycerol Mounting Medium (Dako Cytomation) pel posterior anàlisi per microscopia confocal.

4. VISUALITZACIÓ DE LA DEPOSICIÓ PLAQUETÀRIA I DE LA FORMACIÓ DEL TROMBE PER MICROSCOPIA LÀSER CONFOCAL

La microscopia confocal, a diferència de la microscopia òptica tradicional ofereix la possibilitat d'obtenir "seccions òptiques" de la mostra, permetent l'estudi tridimensional de la mostra. En les tècniques clàssiques de microscopia òptica, la llum interacciona amb la mostra a diverses profunditats i la imatge presenta àrees borroses degut a la llum procedent de zones fora del pla d'enfocament. El principi de la microscopia confocal, en canvi, es basa en eliminar la llum reflexada o fluorescent procedent dels plans fora d'enfocament, il·luminant una petita zona de la mostra i captant el feix de llum procedent del pla focal, i eliminant els feixos procedents dels plans inferiors i superiors.

La deposició plaquetària sobre les fibres de col·lagen es va visualitzar i analitzar per microscopia làser confocal (Leica TCS SP2). Es va utilitzar un làser d'Ar Kr de 488 nm com a font d'excitació i un objectiu HCX PL APO 20x / 0.7 IMM CORR. Es van captar sèries d'imatges de fluorescència en un format de 1024x1024 píxels i es van processar amb el software de Leica TCS-AOBS. Per determinar la deposició plaquetària mitja i la mida dels agregats plaquetars formats es van adquirir sistemàticament cinc camps de la superfície d'adhesió (750 μm x 750 μm), descartant les zones d'entrada i sortida del flux on el flux no és laminar. Es va aplicar un dintell de senyal per distingir les plaquetes del fons i es va aplicar sistemàticament sempre el mateix valor per analitzar les sèries d'imatges de cada experiment. La superfície ocupada per plaquetes (deposició plaquetària) i l'àrea individual dels agregats es van calcular amb el software NIH Image (programa de domini públic cedit pel Dr. Wayne Rasband, National Institute of Health, versió 1.62). El grau de deposició plaquetària es va expressar com l'àrea coberta per plaquetes per camp analitzat ($\mu\text{m}^2/\text{camp}$) i la mida dels agregats es va calcular mesurant l'àrea dels agregats plaquetars superiors a 100 μm^2 i es va expressar en μm^2 .

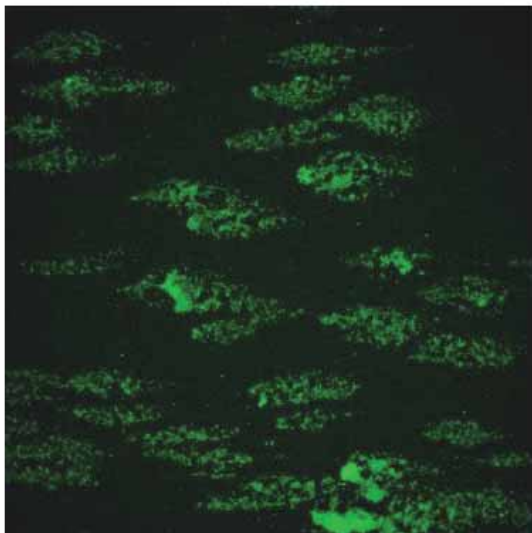


Figura 25. Imatge representativa de plaquetes marcades amb mepacrine adherides a col·lagen en experiments de perfusió.

L'alçada dels agregats plaquetars es va calcular a partir de la reconstrucció topogràfica de les sèries d'imatges captades transversalment ($0,5 \mu\text{m}$ de distància entre imatges de seccions adjacents). A partir de la reconstrucció topogràfica es va mesurar tant l'alçada màxima com l'alçada mitja dels agregats plaquetars. En casos concrets es van crear projeccions tridimensionals amb rotació d'agregats plaquetars seleccionats, construïdes a partir de sèries d'imatges captades transversalment, de $235 \mu\text{m} \times 235 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ ($1 \mu\text{m}$ de distància entre imatges de seccions adjacents). A partir de la reconstrucció tridimensional es va crear la projecció màxima i es va mostrar el valor de z (l'alçada) amb una escala de colors, i seguidament es va crear una rotació de 90° , creant una projecció cada 2° .

5. IMMUNOFLUORESCÈNCIA DE PLAQUETES

5.1. Plaquetes adherides

Es van fer experiments de perfusió amb plaquetes sense marcar amb mepacrine. Després de les perfusions es van desmuntar els porta-objectes de la cambra de perfusió, es van rentar amb PBS pH 7,4 i es van fixar 15 min amb paraformaldehid 3,8 %. Un cop fixades les mostres es van rentar amb PBS i es van bloquejar amb una solució de PBS amb BSA a l'1 %. Seguidament, es van incubar les mostres amb un potenciador de senyal (Signal Enhancer) durant 30 min. Després, es van rentar les mostres amb PBS i es van incubar amb l'anticòs primari durant 1 h a temperatura ambient. A continuació, es van rentar les mostres amb PBS per eliminar l'anticòs no unit i es van incubar les mostres 1 h

amb l'anticòs secundari conjugat amb un fluorocrom. Després de la segona incubació es van rentar les mostres amb PBS i es van muntar amb Prolong Gold antifade reagent. Es van captar imatges de fluorescència amb un microscopi làser confocal (Leica TCS SP2) i les plaquetes es van visualitzar amb un objectiu HCX PL APO 63x / 1.2 W CORR/0.17 CS. Com a font d'excitació es van fer servir els làsers de 488 nm i de 633 nm i, a més, es van captar imatges de transil·luminació en un fotomultiplicador separat. Per descartar falsos positius es van fer tincions de mostres sense anticòs primari. En els marcatges múltiples es van triar les longituds d'ona d'emissió i excitació amb especial cura per evitar solapament dels canals de captació de les diferents molècules analitzades. El grau de col·localització de diferents proteïnes es va mesurar amb el programa Metamorph.

5.2. Plaquetes en suspensió

Es va recollir sang effluent, procedent d'experiments de perfusió, i sang sense perfundir i es va fixar 20 min amb paraformaldehyd 3,8 %. A continuació, es va obtenir plasma ric en plaquetes (PRP) per centrifugació (17 min a 200 g). Les plaquetes es van aïllar centrifugant el PRP a 3100 rpm 15 min. Les plaquetes es van ressuspèndre en PBS i es van rentar dos cops. A continuació, les plaquetes es van deixar dipositar sobre plaques recobertes de poli-L-lisina durant un mínim de 3 h. Un cop dipositades les plaquetes, es va procedir amb el protocol d'immunofluorescència descrit anteriorment.

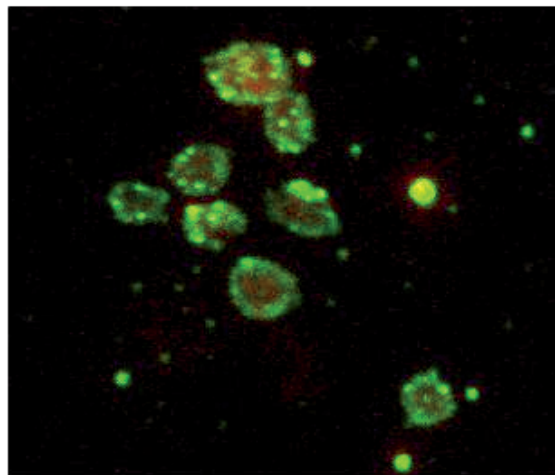


Figura 26. Imatge representativa d'immunofluorescència de plaquetes.

Taula 7. Anticossos utilitzats en immunofluorescència

Antigen	Referència	Espècie	Dilució
CRP	Clon C8, Sigma	Ratolí	1:100
mCRP	Clon 8C10 (no comercial)	Ratolí	1:100
natCRP	Clon 1D6 (no comercial)	Ratolí	1:20
P-selectina	Pharmingen	Ratolí	1:20
Glicoproteïna IV	Pharmingen	Ratolí	1:20
GRP78	C-20 Santa Cruz	Cabra	1:50
TF	American Diagnostica	Ratolí	1:50
GPIIIa	Pharmingen	Ratolí	1:20

6. CITOMETRIA DE FLUX

L'aplicació de la citometria de flux en l'estudi de les plaquetes presenta molts avantatges perquè les plaquetes poden ésser analitzades en el seu medi fisiològic incloent eritròcits i leucòcits. La manipulació mínima de les mostres evita interferències per l'activació *in vitro* i redueix les possibles pèrdues de subpoblacions de plaquetes. No obstant, aquest mètode només mesura la funció de plaquetes circulants, però si les plaquetes activades són eliminades ràpidament o estan adherides a les parets dels vasos sanguinis o a circuits extracorporis poden no existir evidències de l'activació plaquetària.

Per l'anàlisi dels marcadors d'activació plaquetària CD62P, CD63 i PAC-1 per citometria de flux, les mostres de sang prèviament tractades amb les diferents isoformes de CRP es van diluir 1:10 en Hepes-Tyrode. Es van preparar alíquotes de 25 µL i es van activar amb col·lagen (5 µg/mL, 5 min, 37 °C) i ADP (1 µM, 5 min, 37 °C). Per l'anàlisi de CD62P i CD63 es va utilitzar com a marcador de plaquetes independent d'activació un anticòs monoclonal contra CD41 (Pharmingen) conjugat amb isotiocianat de fluoresceïna (FITC). L'expressió de P-selectina i CD63 es va analitzar amb anticossos monoclonals de ratolí conjugats amb ficoeritrina (PE) anti-CD62P i anti-CD63, respectivament. El canvi conformacional de la GPIIb-IIIa es va mesurar amb PAC-1 conjugat amb FITC (Beckton Dickinson). PAC-1 és un anticòs monoclonal que reconeix un epítip de la GPIIb-IIIa quan es troba en la conformació d'elevada afinitat pel seu lligand, el fibrinogen. En alguns casos es va estudiar la resposta de CRP en presència de 2,5 µg/mL d'anticòs bloquejant de CD16 (clon 3G8, Pharmingen). Les mostres de sang amb els anticossos es van incubar a

temperatura ambient en absència de llum durant 20 min. Per determinar el grau d'unió inespecífica dels anticossos amb les plaquetes es van preparar mostres control amb immunoglobulines no immunes marcades amb FITC i PE. Es va utilitzar el citòmetre de flux de Coulter Epics XL (Beckman Coulter). La població de plaquetes es va identificar per la seva mida relativa (*Forward Scatter*, FS), complexitat interna (*Side Scatter*, SC) i per l'associació amb CD41. Es van mesurar un total de 10000 events i es va analitzar el percentatge de cèl·lules positives amb el programa Expo32 ADC XL 4 Color. Les fraccions de plaquetes positives fluorescents per a cada marcador es van obtenir després de restar la fluorescència inespecífica en els controls.

Taula 8. Anticossos utilitzats en citometria de flux

Antigen	Anticòs	Referència
P-selectina	CD62P-PE	Pharmingen
GPIIb	CD41-FITC	Pharmingen
GPIIIa	CD61-FITC	Pharmingen
GPIIb/IIIa d'elevada afinitat	PAC-1-FITC	Pharmingen
GP53	CD63-PE	Pharmingen

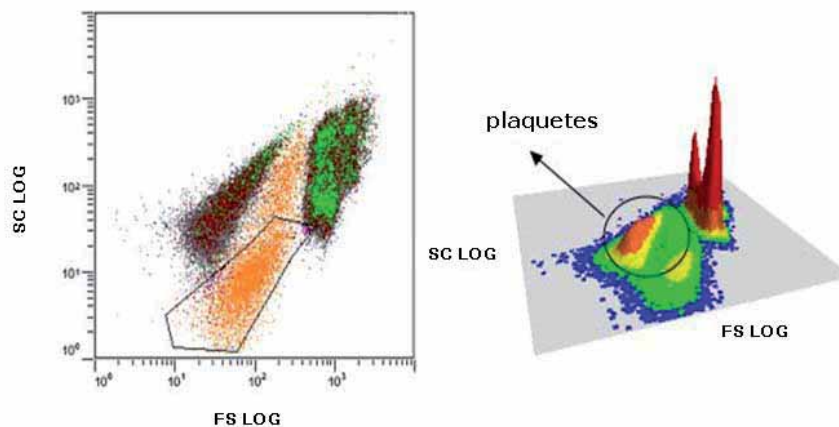


Figura 27. Histograma representatiu d'una mostra de sang on es distingeix la població de plaquetes per la seva mida relativa (FS) i la complexitat interna (SC)

7. PROTEÒMICA DE PLAQUETES

La proteòmica és l'estudi del conjunt de proteïnes (proteoma) que pot expressar un genoma. El proteoma de qualsevol cèl·lula, en un moment donat, representa només una fracció de totes les proteïnes possibles que pot expressar el genoma. Les proteïnes que s'expressen o es modifiquen varien en funció de les circumstàncies (patologies, fàrmacs, etc). L'estudi detallat de les proteïnes responsables pot establir les bases moleculars de diferents patologies i proporcionar nous marcadors diagnòstics i noves estratègies terapèutiques. En situacions patològiques cròniques l'expressió anormal de proteïnes es reflexa en concentracions alterades d'aquestes. No obstant, en condicions agudes, on la resposta ràpida no permet la síntesi de proteïnes, es reflexa en modificacions postraduccionals de proteïnes ja existents. Els canvis al perfil proteic es detecten comparant les proteïnes presents en una mostra control davant una mostra patològica, i identificant i quantificant les proteïnes diferencialment expresades. Les modificacions postraduccionals s'estudien individualment sobre cada proteïna per espectrometria de masses, que permet identificar i localitzar aquestes modificacions.

7.1. Extracció de proteïna

Es van aïllar plaquetes abans i després de circular a través de la cambra de perfusió per centrifugació (250 g, 10 min) a temperatura ambient per obtenir PRP. El nombre de plaquetes es va ajustar a 4×10^8 plaquetes/mL i es van centrifugar a 1400 g durant 15 min per obtenir *pellets* de plaquetes que es van congelar a -80 °C.

Les proteïnes plaquetàries es van extreure en funció de la seva solubilitat diferencial i es va obtenir un subproteoma soluble en tampó Tris-HCl (fracció citosòlica) i un subproteoma soluble en urea (fracció de membrana i citoesquelet). Breument, les mostres es van homogeneïtzar en tampó de Tris-HCl 40 mM, es van incubar 15 min a temperatura ambient i es van centrifugar a 16000 g (20 min, 4 °C). Els *pellets* de proteïna es van rentar un cop amb el tampó Tris-HCl i seguidament es van extreure amb un tampó d'urea/tiourea-chaps (Taula 9) durant 15 min a temperatura ambient i es va procedir com en el pas anterior. Abans de separar les proteïnes per electroforesi bidimensional es van eliminar sals i altres contaminants amb un kit comercial (2D-CleanUp Kit, Amersham). La concentració de proteïna es va determinar amb 2D-Quant Kit (GE-Healthcare).

Taula 9. Tampó urea/tiourea

Reactiu	Concentració
Urea	7 M
Tiourea	2 M
CHAPS	4 %
Tris-HCl	40 mM

7.2. Electroforesi bidimensional (2-DE)

L'electroforesi bidimensional es basa en la combinació de les tècniques d'isoelectroenfoc (IEF), que separa les proteïnes segons el seu punt isoelèctric, i electroforesi en gels de poliacrilamida (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE), que separa les proteïnes en funció del seu pes molecular. El resultat final no és un gel amb bandes sinó amb punts o *spots*, on cadascun dels quals correspon a una proteïna de diferent pes molecular i punt isoelèctric.

Per a la primera dimensió, l'IEF, es va utilitzar la cel·la Protean-IEF (BioRad) i es va emprar el mètode descrit per Molloy i col·laboradors (Molloy et al. 1998) amb algunes modificacions. Breument, es van resuspendre 150 µg de proteïna en 350 µL de tampó de rehidratació (Taula 10) i es va carregar la mostra en tires IPG (*Immobilized pH Gradient*) de 17 cm (rang lineal de punt isoelèctric 3-10, Biorad) durant 16 h amb rehidratació activa a 50 V. Després d'aquest temps les proteïnes es van enfocar mitjançant un augment progressiu del voltatge fins a 10000 V en 5 h amb un pas final a 10000 V fins a 70000 V/h.

Taula 10. Tampó de rehidratació

Reactiu	Concentració
Urea	7 M
Tiourea	2 M
CHAPS	2 %
DTT	100 mM
Amfolits	0,2 %

Després de l'IEF les tires es van equilibrar primer amb una solució reductora amb pH 8,8 (Taula 11) i després amb una solució alquilant (Taula 12) durant 15 min. Les tires

IPG un cop equilibrades es van transferir per a la segona dimensió (SDS-PAGE) en gels de poliacrilamida del 10 %. L'electroforesi es va dur a terme en un sistema Protean (Ettan Dalt, Amersham) a 17 W/gel. Després de l'electroforesi els gels es van fixar amb una solució de 30 % etanol i 10 % àcid acètic durant un mínim de 2 h. A continuació les proteïnes dels gels es van marcar fluorescentment amb flamingo (BioRad) durant 3 h i finalment es van rentar 3 cops amb H₂O.

Taula 11. Solució reductora

Reactiu	Concentració
Tris-HCl	50 mM
Urea	6 M
SDS	2 %
Glicerol	30 %
DTT	2 %

Taula 12. Solució alquilant

Reactiu	Concentració
Tris-HCl	50 mM
Urea	6 M
SDS	2 %
Glicerol	30 %
Iodoacetamida	2,5 %

7.3. Anàlisi diferencial d'imatge

Els gels marcats amb fluorescència es van escanejar (Typhoon 9400) i es va analitzar l'expressió diferencial de proteïnes entre els diferents tractaments amb el programa 7.3 PD-Quest (BioRad), fent servir un únic patró que inclogués tots els gels de cada experiment independent. Es va assignar a cada *spot* un valor relatiu que corresponia al volum individual del *spot* comparat amb el volum de tots els *spots* del gel, després d'haver normalitzat els gels entre si i d'extreure el fons.

7.4. Identificació de proteïnes per espectrometria de masses (MALDI-TOF)

Els *spots* de proteïna seleccionats es van analitzar per espectrometria de masses amb un espectròmetre tipus MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight*) (Molloy et al. 1998).

7.4.1. Preparació de les mostres

Els punts o taques de proteïnes d'interès es van extreure dels gels de 2-DE amb un equip Ettan Spotpicker (Amersham), es van rentar amb bicarbonat d'amoni 50 mM i metanol al 50 % (2 cops 20 min), es van deshidratar amb acetonitril 100 % (2 cops 20 min) i seguidament es van assecar al buit. Un cop assecades les proteïnes dins els trossets de gel, aquestes es van digerir enzimàticament amb 20 ng/ μ L de tripsina porcina (Promega) durant 4 h a 37 °C o 16 h a 4 °C. Els pèptids procedents de la digestió enzimàtica in-gel (1 μ L) (Vondriska et al. 2001) es van barrejar en proporció 1:1 amb 5 mg/mL de matriu (àcid α -ciano-4-hidroxicinàmic) i es van deixar assecar sobre una placa d'acer inoxidable que posteriorment es va introduir a l'espectròmetre de masses. De la mostra restant, després de la digestió amb tripsina, es van extreure els pèptids amb una solució de bicarbonat d'amoni 50 mM i àcid trifluoroacètic al 0,5 % (2 cicles de 20 min) i es van mantenir els extractes secs a 4 °C.

7.4.2. Espectrometria de masses

Dins el MALDI-TOF els pèptids procedents de la digestió amb tripsina, barrejats amb la matriu, es van ionitzar amb un pols de làser. Els pèptids ionitzats, es vaporitzen i són accelerats per un camp elèctric, passant per un tub de buit d'una longitud determinada. Com que els pèptids ionitzats tenen tots la mateixa càrrega, el temps de vol (*time of flight*) per recórrer la longitud del tub és proporcional a la seva massa (m/z). El conjunt de les masses dels pèptids procedents d'una mateixa proteïna es coneix com "empremta peptídica" (PMF, *Peptide Mass Fingerprint*) i s'obté un espectre de masses on es representa la relació m/z en funció de la freqüència (intensitat) amb que aquest ió és detectat. La massa de cada pèptid es relaciona algorítmicament amb la seva seqüència d'aminoàcids. L'empremta peptídica obtinguda es compara amb les masses teòriques dels pèptids que es produïrien al digerir les proteïnes de la base de dades, i amb aquesta comparació s'identifica la proteïna analitzada (Shevchenko et al. 1996; Jonsson 2001).

Els espectres generats pel MALDI es van calibrar internament amb els pics corresponents als productes d'autodigestió de la tripsina, amb Angiotensina III ($m/z=897.531$) i amb ACTH (hormona adrenocorticotròpica, $m/z=2465.199$). Les masses dels pèptids dels espectres obtinguts es van comparar contra la base de dades del *National Center for Biotechnology Information* amb el programa ProFound™ i es van confirmar amb una cerca amb Mascot (Matrixscience) seleccionant la base de dades SwissProt. Degut al fet que la base de dades per proteïnes humanes és molt més extensa que la de proteïnes de porc, les seqüències de les proteïnes humanes identificades es van comparar amb les de les corresponents proteïnes porcines i es van validar si assolien una identitat superior al 80 %. La identificació de les proteïnes es va basar en la mesura de com a mínim 10 pèptids amb un mínim del 50 % de pèptids coincidents i una cobertura superior al 20 %. L'expectativa mínima per a una identificació vàlida es va considerar 0,01 i $P < 0,05$.

8. OBTENCIÓ DE PROTEÏNA. SUBFRACCIONAMENT DE PLAQUETES

Es van aïllar plaquetes (abans i després de circular a través de la cambra de perfusió) per centrifugació (250 g, 10 min) a temperatura ambient per obtenir PRP. El nombre de plaquetes es va ajustar a 4×10^8 plaquetes/mL i es van centrifugar a 1400 g durant 15 min per obtenir *pellets* de plaquetes que es van congelar a -80 °C.

8.1. Lisat total

Per obtenir el lisat total de proteïnes plaquetàries es van resuspendre els *pellets* de plaquetes a 4 °C afegint 750 µL de tampó de lisi (Taula 13) amb 1 % de Tritó per cada 12×10^8 plaquetes i es van incubar 30 min. Per obtenir la màxima dissociació dels components cel·lulars, es van sonicar les mostres 3 cops durant 10 s i l'homogeneïtzat es va congelar a -80 °C durant un mínim d'1 h. Després de descongelar, les mostres es van centrifugar a màxima velocitat durant 20 min a 4 °C. El sobrenedant obtingut es va recollir i guardar a -80 °C fins la seva utilització.

Taula 13. Tampó de lisi

Reactiu	Concentració
Tris-HCl pH 7,5	0,01 M
KCl	0,15 M
PMSF	2,9 mM
Leupeptina	1 µg/mL
Aprotinina	3 µg/mL

8.2. Subfraccionament de plaquetes

Per obtenir les subfraccions de proteïnes solubles (citosol) i insolubles (membrana i citoesquelet) es van resuspendre els *pellets* de plaquetes a 4 °C afegint 750 µL de tampó de lisi sense Tritó per cada 12×10^8 plaquetes. Per dissociar bé els components cel·lulars, es van vortejar les mostres durant 10 min a 4 °C i l'homogeneïtzat es va congelar a -80 °C durant un mínim de 20 min. Després de descongelar les mostres es van centrifugar 5 min

a 4000 rpm a 4 °C. Els sobrenedants d'aquesta primera centrifugació es van ultracentrifugar (Beckman) a 30000 rpm durant 1 h a 4 °C. Els sobrenedants obtinguts amb la ultracentrifugació corresponien a la fracció citosòlica i es van emmagatzemar a -80 °C. Els *pellets* obtinguts es van dissoldre en tampó de lisi amb un 1 % de Tritó (150 µL de tampó per cada 12×10^8 de plaquetes inicials). Les mostres es van deixar un mínim de 45 min en gel amb agitació i homogeneïtzació intermitent. Després es van centrifugar les mostres 15 min a 3500 rpm a 4 °C. El sobrenedant de la centrifugació corresponia a la fracció de membrana i es va emmagatzemar a -80 °C fins el seu anàlisi.

9. WESTERN BLOT

La proteïna obtinguda es va quantificar pel mètode del BCA. L'anàlisi de proteïnes es va realitzar per electroforesi en gels de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE). Es va carregar la quantitat de proteïna recomanada per la casa comercial de cada anticòs i es va barrejar amb el tampó de Laemli (Taula 14), en condicions reductores (amb un 1 % de β -mercaptoetanol, i escalfant les mostres 5 min a 95 °C). El sistema d'electroforesi emprat va ésser el Mini Protean-II (BioRad). La transferència de les proteïnes a membranes de nitrocel·lulosa es va fer amb el sistema Trans-Blot apparatus (BioRad).

Taula 14. Tampó de Laemli

Reactiu	Concentració
Tris-HCl	125 mM
SDS	2 %
Glicerol	5 %
Blau de bromofenol	0,003 %

Un cop finalitzada la transferència, les membranes es van incubar 2 min amb vermell de Ponceau (Fluka) al 0,2 % en 1 % d'àcid acètic per comprovar que la quantitat de proteïna era la mateixa en totes les mostres. Posteriorment, després de rentar les membranes amb H₂O es van bloquejar i hibridar les membranes amb els anticossos específics (Taula 15) com s'ha descrit anteriorment en el procediment del dot blot. De la mateixa manera que en el dot blot, el revelat de les membranes es va fer amb un substrat

per a la peroxidasa i es va captar el senyal per quimioluminiscència. La densitat òptica de les bandes es va quantificar amb el programa Quantity One (BioRad).

Taula 15. Anticossos utilitzats en western blot

Anticòs	Referència	Espècie	Dilució
Rho A	Santa Cruz	Ratolí	1:500
GRP78	C-20 Santa Cruz	Cabra	1:1000
TF	American Diagnostica 4509	Ratolí	1:1000
GPVI	Abcam 63925	Conill	1:500
CD36	Abcam 17044	Ratolí	1:200
GPIb	sc7070 Santa Cruz	Cabra	1:500
GPIIIa	Dako Cytomation	Ratolí	1:500

10. IMMUNOPRECIPITACIÓ

Es va obtenir PRP per centrifugació (250 g, 10 min). Per obtenir plaquetes rentades, el PRP es va centrifugar a 1200 g en presència de 0,1 µg/mL de prostaglandina E₁ (PGE₁) durant 10 min a temperatura ambient. Les plaquetes (3x10⁸ plaquetes/ mL) es van rentar amb tampó Hapes-Tyrode amb PGE₁ (0,1 µg/mL) i es van centrifugar a 1200 g durant 10 min a 4 °C.

El *pellet* de plaquetes es va lisar en fred amb 1 mL de tampó de lisi amb Tritó 1 % i seguidament es va centrifugar a 10000 g durant 10 min a 4 °C. Alternativament, es va procedir amb el subfraccionament de plaquetes tal i com s'ha descrit a l'apartat 8.2. El sobrenedant del lisat de plaquetes es va incubar 30 min a 4 °C amb 50 µL d'una suspensió de boletes d'agarosa unides a proteïna A i G (Protein A/G PLUS-Agarose beads, Santa Cruz Biotechnology) per evitar unions inespecífiques. A continuació es va centrifugar la suspensió a 14000 rpm (10 min, 4 °C) i el sobrenedant es va incubar amb l'anticòs d'interès (1 µg d'anticòs per 100 µg de proteïna) durant 6 h a 4 °C. El complex anticòs-antigen es va precipitar amb boletes d'agarosa unides a proteïna A i G (200 µL/mL) durant 20 h a 4 °C i es va rentar tres cops amb tampó de lisi centrifugant a màxima velocitat durant 20 s. Les proteïnes es van eluir de la resina escalfant a 95 °C durant 5 min en tampó de Laemli i es van centrifugar a velocitat màxima 2 min. El sobrenedant resultant corresponent a l'immunoprecipitat es va recollir.

11. TÈCNIQUES ADDICIONALS QUE ES DESCRIUEN AMB DETALL ALS ARTICLES

- Inducció d'infart agut de miocardi en el model porcí
- Avaluació histopatològica del teixit miocàrdic infartat
- Determinació dels nivells de citocines inflamatòries circulants (CRP, IL-6, TNF- α) i de troponina-1
- Obtenció de cèl·lules sanguínies mononuclears perifèriques
- Anàlisi de nivells d'expressió d'ARNm per reacció en cadena de polimerasa (PCR) a temps real
- Tromboelastografia

RESULTATS

ARTICLE I:

"C-Reactive Protein Isoforms Differ in their Effects on Thrombus Growth"

Blanca Molins¹⁻³, Esther Peña^{1,2}, Gemma Vilahur^{1,2}, Carlos Mendieta³, Mark Slevin⁴, Lina Badimon^{1,2}

¹Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

²Ciber Patofisiología de la Obesidad y Nutrición, Instituto Carlos III

³Departament d'Odontostomatologia, Facultat d'Odontologia, Universitat de Barcelona

⁴School of Biology, Chemistry, and Health Science, Manchester Metropolitan University, Manchester

Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology. 2008;28;2239-2246

Factor d'impacte: 6,86

Les Isoformes de la Proteïna C-Reactiva difereixen en els seus efectes sobre el creixement del trombe

En aquest treball es va estudiar l'impacte de les isoformes nativa (natCRP) i modificada (mCRP) de la CRP sobre l'adhesió plaquetària i el creixement del trombe en condicions de flux arterial.

Es va perfundir sang humana sobre substrats de col·lagen I a una velocitat de cisalla de 1500 s^{-1} , i es va avaluar la superfície recoberta per plaquetes, l'àrea dels agregats i l'alçada del trombe per microscopia confocal. Les isoformes de CRP es van incubar amb la sang abans dels experiments de perfusió o bé es van immobilitzar en superfícies de col·lagen i posteriorment es van exposar a la sang circulant. mCRP va produir un augment significatiu de l'adhesió plaquetària i del creixement del trombe tant quan es trobava en forma circulant com en forma immobilitzada al col·lagen ($P < 0,05$). En canvi, natCRP no va produir cap efecte. L'anàlisi d'immunofluorescència per microscopia confocal va demostrar la presència de CRP a la superfície de plaquetes adherides a col·lagen i dins l'estructura tridimensional del trombe, així com un augment d'expressió de P-selectina i CD36 a la superfície de plaquetes efluentes preincubades amb mCRP ($P < 0,05$). Per citometria de flux es va demostrar que mCRP produïa un augment de l'activació plaquetària a través de l'augment de P-selectina, sense afectar l'expressió de CD63 i PAC-1.

Els resultats d'aquest treball indiquen que mCRP presenta un fenotip protrombòtic induint el creixement del trombe en condicions de flux arterial, mentre que natCRP no produeix cap efecte.

Cell Biology/Signaling

C-Reactive Protein Isoforms Differ in Their Effects on Thrombus Growth

Blanca Molins, Esther Peña, Gemma Vilahur, Carlos Mendieta, Mark Slevin, Lina Badimon

Objective—We studied the impact of native (natCRP) and modified CRP (mCRP) isoforms on platelet adhesion and thrombus growth under arterial flow.

Methods and Results—Blood was perfused over type I collagen at a wall shear rate of 1500 s^{-1} , and platelet deposition and thrombus growth were evaluated by confocal microscopy. natCRP and mCRP were either incubated with blood before perfusion experiments or immobilized in the collagen surface and exposed to flowing blood. mCRP significantly increased platelet adhesion and thrombus growth when directly incubated with blood and when immobilized on a collagen surface ($P < 0.05$). In contrast, natCRP did not exert any effect. Confocal immunohistochemistry revealed the presence of CRP on the surface of adhered platelets and within the thrombus and showed an upregulation of P-selectin and CD36 in effluent platelets preincubated with mCRP ($P < 0.05$). Flow cytometry analysis of agonist-induced platelet activation demonstrated that mCRP, but not natCRP, significantly increased platelet surface P-selectin ($P < 0.05$) without modifying CD63 and PAC-1.

Conclusions—Our data indicate that whereas serum natCRP may not affect thrombus growth, mCRP displays a prothrombotic phenotype enhancing not only platelet deposition, but also thrombus growth under arterial flow conditions. (*Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:2239-2246.)

Key Words: C-reactive protein ■ isoforms ■ thrombosis ■ platelets

In recent years, C-reactive protein (CRP), long associated with inflammation, has emerged as a clinical marker of future cardiovascular events among apparently healthy subjects and of worse prognosis in acute coronary patients.¹⁻³

Thrombus formation on rupture of an atherosclerotic plaque is believed to be the responsible event for most of the coronary syndromes, in a process mainly mediated by platelet adhesion, activation, and aggregation. The first response to vascular injury consists of platelet adhesion to the damaged vessel wall or to exposed tissue components, and is mediated by flow-regulated interactions that have a key influence on subsequent thrombus growth, often culminating in life-threatening complications.^{4,5}

Long considered merely a bystander in vascular disease, new evidence indicates that CRP may be not only a marker, but also an active player in the development of cardiovascular pathology.⁶ The role of CRP as a modulator of inflammation and thrombosis is controversial, because both proinflammatory and antiinflammatory properties have been ascribed to the molecule.⁷⁻⁹ For instance, CRP inhibits neutrophil activation and adhesion,⁹ and blocks platelet aggregation in vitro,^{10,11} whereas arterial injury in CRP-transgenic mice is associated with increased thrombosis.¹² Overexpression of

the human CRP gene in atherosclerosis-prone mice has also shown contradictory effects on the development of atherosclerosis.^{13,14} To explain these apparently contradictory actions, it was proposed that distinct isoforms of CRP were formed during inflammation. The classically studied serum CRP is a pentamer composed of five noncovalently bound globular subunits arranged as a cyclic annular disk, the so-called native CRP (natCRP). natCRP can undergo subunit dissociation into individual monomeric units, as when associating with a cell-membrane.¹⁵ These subunits undergo a conformational change that significantly modifies CRP structure, solubility, and antigenicity. This form of CRP, called modified or monomeric CRP (mCRP), is found in fibrous tissues of normal and inflamed human blood vessel intima.¹⁶ Although the expression of CRP mRNA in both normal and plaque arterial tissues has been reported,¹⁷ it remains to be proven whether extrahepatic cells possess the machinery necessary to fold 5 subunits into the native pentamer. In vitro, mCRP can be produced from natCRP by exposing natCRP to heat, urea, or acidic conditions, in the absence of calcium ions.¹⁸ mCRP can also spontaneously form from natCRP during storage. Studies directly addressing the distinct isoforms of CRP have reported that mCRP displays proinflam-

Original received March 12, 2008; final version accepted August 30, 2008.

From the Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (U.A.B.); CIBEROBN (06/03), Instituto Salud Carlos III (B.M., E.P., G.V., M.S., L.B.); Department of Periodontics, Faculty of Odontology, University of Barcelona, Barcelona, Spain (B.M., C.M.); and School of Biology, Chemistry, and Health Science, Manchester Metropolitan University, Manchester, United Kingdom (M.S.).

Correspondence to Prof Lina Badimon, Cardiovascular Research Center, C/Sant Antoni M^o Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. E-mail lbadimon@csic-iccc.org

© 2008 American Heart Association, Inc.

Arterioscler Thromb Vasc Biol is available at <http://atvb.ahajournals.org>

DOI: 10.1161/ATVBAHA.108.174359

Downloaded from atvb.ahajournals.org by on November 20, 2008

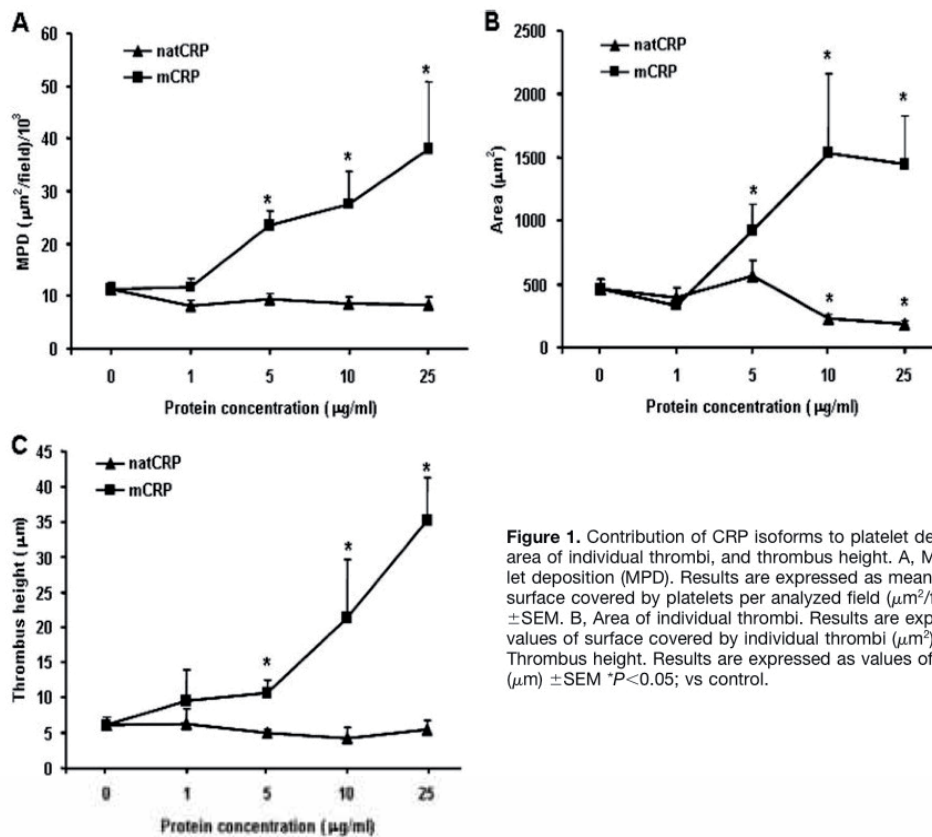


Figure 1. Contribution of CRP isoforms to platelet deposition, area of individual thrombi, and thrombus height. A, Mean platelet deposition (MPD). Results are expressed as mean values of surface covered by platelets per analyzed field ($\mu\text{m}^2/\text{field}$)/ $10^3 \pm \text{SEM}$. B, Area of individual thrombi. Results are expressed as values of surface covered by individual thrombi (μm^2) $\pm \text{SEM}$. C, Thrombus height. Results are expressed as values of height (μm) $\pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$; vs control.

matory effects on neutrophils, endothelial cells, and platelets, whereas natCRP displays antiinflammatory activities.^{19–21}

In the present study, we investigated the relative impact of natCRP and mCRP on the dynamics of platelet adhesion and thrombus growth under defined flow conditions. Our results indicate that mCRP, but not natCRP, enhances platelet adhesion and thrombus growth.

Materials and Methods

See supplemental file (available online at <http://atvb.ahajournals.org>) for expanded Methods section.

CRP Isoforms Obtention

High purity human natCRP (Calbiochem) was stored in 10 mmol/L Tris, 140 mmol/L NaCl buffer (pH 8.0) containing 2 mmol/L CaCl₂ to prevent spontaneous formation of mCRP from the native pentamer. mCRP was obtained by urea chelation from purified human CRP as described by Potempa et al.¹⁸

Experimental Design

Venous blood from medication-free volunteers was withdrawn in 10 U/mL sodium heparin. Procedures were approved by the Clinical Research Committee of our Institution.

Blood was then incubated with natCRP, mCRP, or control buffer (37°C, 10 minutes). Platelets were rendered fluorescent by the addition of mepacrine 10 µmol/L (Sigma), unless otherwise specified.

Perfusion Experiments in Flat Chamber

Glass slides were coated with type I collagen (4°C, overnight). When indicated, collagen-coated slides were incubated with 5 µg/mL of

natCRP, mCRP, or blocking buffer (1% bovine serum albumin) for 3 hours at 37°C. Coated slides were placed in a parallel plate chamber.²² A peristaltic pump was used to perfuse blood through the chamber at a constant shear rate of 1500 s⁻¹ for 5 minutes.

Imaging of Platelet Thrombi

Platelet deposition was scanned with a Leica TCS SP2 confocal laser scanning microscope. Platelets were viewed with an APO 20X objective. Surface covered by platelets and area of individual thrombi were calculated using NIH Image software (by Dr Wayne Rasband, National Institutes of Health). Average height of platelet thrombi was calculated creating a topographical image from the spatial data set acquired and three-dimensional rotation projections were created from stack series of selected thrombi.

CRP Immunolocalization

For detection of CRP, a further set of perfusion experiments with unlabeled platelets was performed. Immunodetection of CRP on fixed slides was performed with a monoclonal anti-human CRP antibody (Sigma, clone 8) and with a monoclonal antibody (mAb) which specifically recognizes mCRP isoform (clone 8C10 kindly provided by Dr Potempa). Coverslides were incubated with Alexa Fluor 488 donkey antimouse IgG (H+L).

P-Selectin and CD36 Immunostaining

Effluent blood from perfusion experiments with blood unlabeled with mepacrine was collected and fixed with 3.8% paraformaldehyde for 30 minutes, and platelet-rich plasma was obtained by centrifugation at 200g for 17 minutes. Platelets were then isolated by centrifugation, immobilized on poly-L-lysine-coated coverslides, and incubated either with a

phycoerythrin (PE) conjugated anti-CD62P mAb (Pharmingen) or a fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-CD36 mAb (Pharmingen). Platelets were viewed with an APO 63X objective.

Flow Cytometry

CRP-treated samples were diluted 1:10 in modified Tyrode Buffer and activated with collagen (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) or ADP (1 $\mu\text{mol}/\text{L}$). A CD41a – FITC mAb (Pharmingen) was used as an activation-independent marker of platelets for CD62P and CD63 analysis. P-selectin and CD63 were assessed with a PE-conjugated anti-CD62P mAb (Pharmingen) and a PE-conjugated anti-CD63 mAb (Pharmingen), respectively. GPIIb-IIIa conformational change was assessed with a FITC-conjugated PAC-1 mAb (Beckton Dickinson). In additional experiments, the responses to CRP were studied in the presence of 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of function-blocking anti-CD16 mAb 3G8 (Pharmingen).

Statistical Analysis

Different conditions were performed at least twice in each subject and 5 subjects of each treatment were assessed. After testing for normal distribution and equality of variances with Levene *F* test, Student *t* test or ANOVA as appropriate was used to determine statistical significance between treatments. A value of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Contribution of CRP Isoforms to Thrombus Formation

Preincubation of blood with mCRP increased platelet deposition in a concentration-dependent manner. Statistically significant increase was detected with concentrations higher than 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mCRP. In the presence of 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mCRP, platelet deposition was more than 3-fold higher than in untreated blood ($P < 0.05$). On the contrary, incubation with natCRP did not produce any effect on platelet deposition at any tested concentration (Figure 1A).

To elucidate the effect of CRP on aggregate size, the area of individual thrombi formed on the collagen surface was evaluated. For this purpose we quantified the area of aggregates larger than 100 μm^2 . Thrombus area significantly increased in samples treated with mCRP in a dose-dependent manner, with a statistically significant increase detected at concentrations higher than 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mCRP ($P < 0.05$). By contrast, blood incubation with natCRP (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) produced inhibition on aggregate size ($P < 0.05$) as shown in Figure 1B.

Three-dimensional topographical imaging of platelet thrombi were obtained from the spatial data set acquired by confocal microscopy. natCRP treatment did not yield any effect on thrombus height. On the contrary, 3D topographical imaging revealed that mCRP increased thrombus height in a concentration-dependent manner, with a statistically significant increase detected at concentrations higher than 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mCRP ($P < 0.05$) as shown in Figure 1C.

CRP Distribution

CRP immunodetection on the platelet surface with the antibody that recognizes both CRP isoforms was more intense in perfusions run with mCRP-treated blood than those run when incubating blood with natCRP, as shown in Figure 2. ($P < 0.05$). Additionally, mCRP immunodetection with anti-mCRP antibody showed lack of mCRP on the surface of control and natCRP-treated platelets, whereas mCRP was

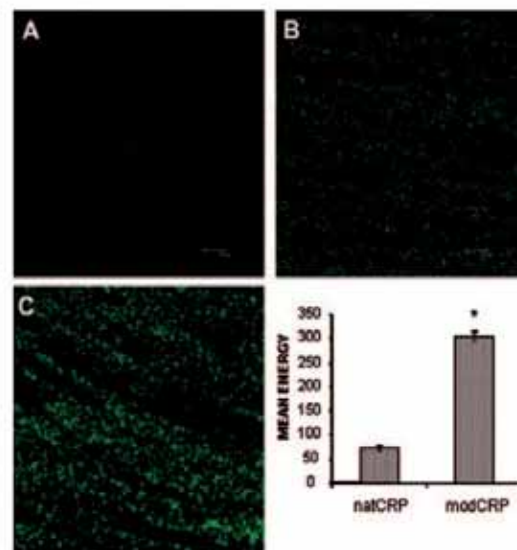


Figure 2. Representative confocal images of CRP immunostaining with anti-CRP antibody on adhered platelets. A, control; B, natCRP (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), C, mCRP (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). The bars graphic shows CRP expression on adhered platelets preincubated with natCRP and mCRP. Scale bar is 20 μm . Results are expressed as values of mean energy of the fluorescence intensity \pm SEM normalized by mean energy of untreated samples. * $P < 0.05$ vs natCRP.

strongly immunodetected on the surface of platelets treated with mCRP (see supplemental Figure II).

Because mCRP, but not natCRP, enhanced thrombus growth, CRP distribution within the thrombus volume was evaluated by 3D projections of selected thrombi (Figure 3). CRP labeling in thrombi formed when incubating blood with natCRP appeared to be distributed as diffuse spots with a higher presence on the collagen surface (blue) than in the top edge (red) (Figure 3.I: 1A through 1F). By contrast, CRP immunostaining in mCRP thrombi was found to be distributed as aggregated patches within the entire volume of the thrombus (Figure 3.I: 2A through 2F). Immunodetection of mCRP revealed that mCRP was mainly localized on the thrombus growing edge (Figure 3.II). See supplemental movie-file with 90° rotating animation.

P-Selectin and CD36 Immunodetection

mCRP pretreatment, but not natCRP, enhanced the expression of both P-selectin and CD36 of effluent platelets. The percentage of CD62P expression increased from $36.7 \pm 4.3\%$ in control samples, to $67.1 \pm 5.0\%$ in mCRP-treated blood ($P < 0.05$). Immunodetection of CD36 significantly increased up to 70% in effluent platelets incubated with mCRP compared to control and natCRP-treated platelets ($P < 0.05$; Figure 4).

Flow Cytometry Studies

Blood incubation solely with CRP isoforms did not induce any significant effect in the expression of the platelet activation markers P-selectin, CD63, and PAC-1. Conversely, in collagen-stimulated platelets, preincubation with mCRP sig-

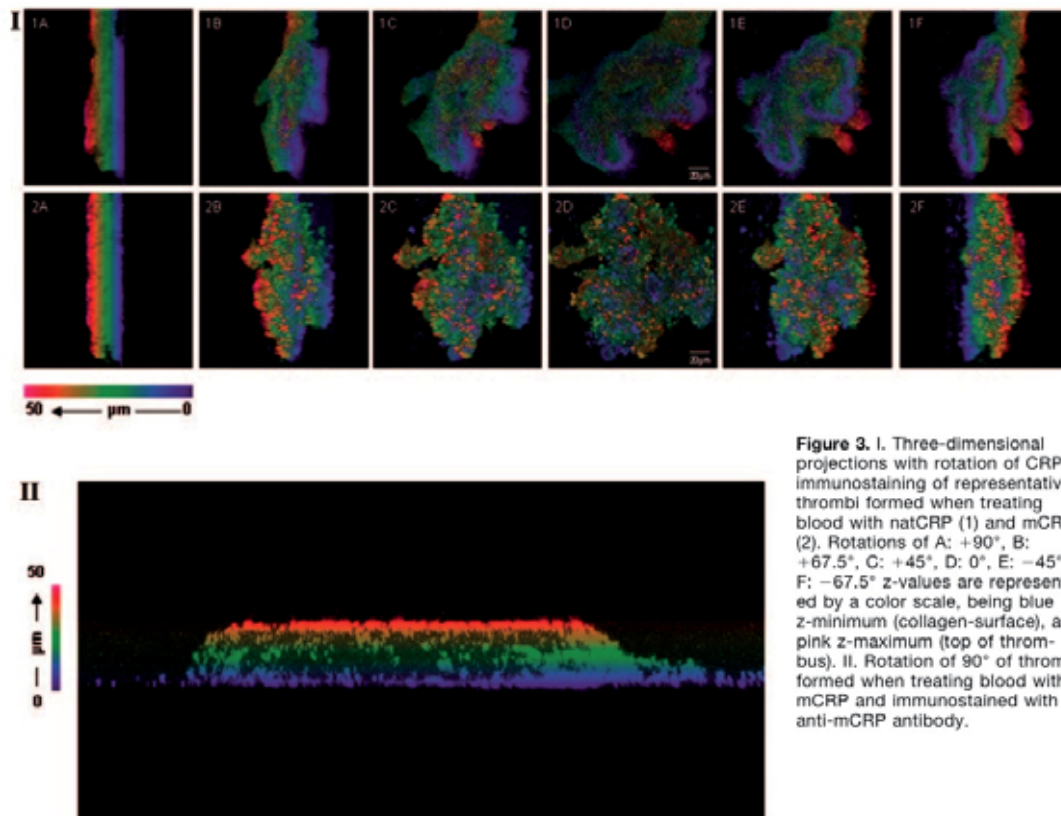


Figure 3. I. Three-dimensional projections with rotation of CRP immunostaining of representative thrombi formed when treating blood with natCRP (1) and mCRP (2). Rotations of A: +90°, B: +67.5°, C: +45°, D: 0°, E: -45°, F: -67.5° z-values are represented by a color scale, being blue z-minimum (collagen-surface), and pink z-maximum (top of thrombus). II. Rotation of 90° of thrombi formed when treating blood with mCRP and immunostained with anti-mCRP antibody.

nificantly enhanced platelet P-selectin expression ($P < 0.05$), and it did not exert any effect in the expression of neither CD63 nor PAC-1. Preincubation with natCRP did not produce any significant effect on the expression of CD63 and PAC-1 in either resting or collagen-stimulated platelets (Figure 5A). However, although not statistically significant, natCRP increased P-selectin expression on collagen-induced activated platelets because of the partial dissociation of natCRP into its subunits. mCRP was formed from natCRP because of the acidity of the collagen solution needed to induce platelet activation. Indeed, dot blotting of natCRP subjected to the same conditions of the flow cytometry studies confirmed the partial dissociation of natCRP into mCRP, as shown in Figure 5B. In fact, P-selectin expression on ADP-induced platelet activation was not upregulated by natCRP preincubation. On the contrary, mCRP significantly increased P-selectin expression on ADP-induced activated platelets (Figure 5C). Blockade of the FcγRIII receptor (CD16) before blood incubation with mCRP did not suppress P-selectin expression on agonist activated platelets.

Effect of Surface-Immobilized CRP Isoforms on Thrombus Formation

The effect of CRP isoforms on thrombus growth was also evaluated in perfusion experiments on surfaces coated with

immobilized collagen and either natCRP or mCRP. Similarly to what we observed when CRP was directly added to blood, immobilized mCRP in the collagen surface significantly enhanced platelet deposition. Mean platelet deposition on collagen/mCRP-coated surface was 2-fold higher than in control collagen-coated surfaces ($P < 0.05$; Figure 6A).

Immobilized mCRP also significantly increased aggregate size. Indeed, the area of individual thrombi deposited on collagen ($463 \pm 76 \mu\text{m}^2$) was significantly lower than that on the collagen/mCRP surface ($1097 \pm 278 \mu\text{m}^2$; $P < 0.05$; Figure 6B). Platelet deposition and aggregate size on collagen/natCRP-coated surface did not differ significantly from platelet deposition on collagen alone. In fact, increasing concentrations of immobilized natCRP in the collagen surface did not increase platelet deposition nor aggregate size (Figure 6A and 6B).

To investigate whether the presence of circulating natCRP would affect the platelet response to immobilized mCRP we added natCRP ($5 \mu\text{g/mL}$) to the blood and measured its effects on platelet deposition and aggregate size on collagen/mCRP-coated surfaces. natCRP did not affect platelet deposition on mCRP/collagen surface, measured as mean platelet deposition and aggregate size (Figure 6A and 6B).

Three-dimensional topographical imaging of platelet thrombi revealed that immobilized mCRP significantly en-

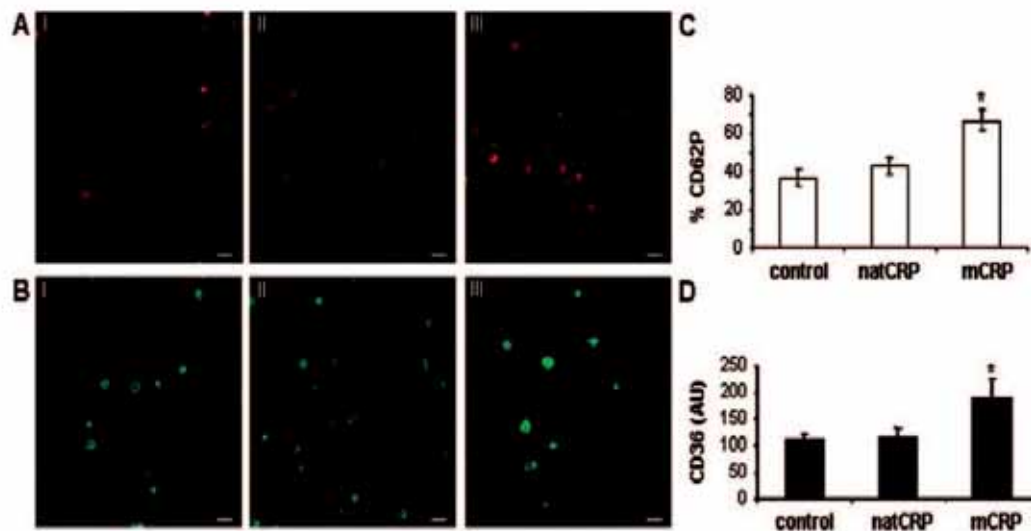


Figure 4. Effect of natCRP and mCRP on CD62P and CD36 expression of effluent platelets. Photomicrographs show representative confocal images of CD62P (A) and CD36 (B) immunostained platelets; I: control; II: natCRP (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$); III: mCRP (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Scale bar is 5 μm . Expression calculated from the area of CD62P (C) or CD36 (D) positive staining normalized with the area occupied by platelets. Results are expressed as values of average $\% \pm \text{SEM}$ and Arbitrary Units. * $P < 0.05$ vs control and natCRP.

hanced thrombus growth. Platelet aggregates formed on collagen/mCRP were more than 2-fold higher than those formed on collagen alone ($6.17 \pm 1.07 \mu\text{m}$ on collagen versus $14.31 \pm 2.34 \mu\text{m}$ on collagen/mCRP, $P < 0.05$; Figure 6C). Immobilized natCRP on collagen affected neither aggregate size nor height of the thrombi.

Discussion

Numerous epidemiological studies have shown that plasma CRP level is a powerful predictor of future cardiovascular events in seemingly healthy subjects and of worse prognosis in acute coronary patients. However, the pathophysiological importance of CRP is far from being fully understood. Data regarding the exact mechanisms of CRP effects are limited and controversial. In this study we show contrasting effects of CRP on the dynamics of thrombus formation under arterial flow conditions based on its different conformation. Whereas mCRP significantly enhanced platelet activation, adhesion, and thrombus growth, natCRP had no effect.

Clinically, the threshold of CRP plasma concentration associated to cardiovascular risk is more than 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, whereas levels higher than 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ are usually attributed to other causes as acute infection or inflammation.²³ We therefore used in our experiments physiological and pathophysiological concentrations of CRP, spanning from 1 to 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Interestingly, mCRP was able to enhance thrombus growth at concentrations higher than 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, which coincides with concentrations predicting cardiovascular risk.

The postperfusion confocal analysis allowed us to study 3-dimensionally thrombus formation, measuring platelet deposition, aggregate size, and thrombus height on a protein-coated surface. Several reported effects of CRP have been shown to be calcium dependent,²⁴ thus we used sodium

heparin as anticoagulant instead of calcium chelators. Recent reports have questioned the validity of CRP in vitro studies. Commercial CRP preparations can be contaminated with sodium azide or lipopolysaccharide (LPS) and when dialysed, free of these factors, several of the effects of CRP are lost.^{25,26} To eliminate these confounding factors we used two different purified commercial preparations and, additionally, perfusion experiments performed with control buffer had no effect on platelet adhesion and thrombus formation.

mCRP, unlike natCRP, was able to induce thrombosis by promoting platelet deposition and thrombus growth on the collagen surface. mCRP not only significantly increased platelet adhesion, but also aggregate size and thrombus height. These observations support a role for mCRP in platelet adhesion, and also on platelet to platelet interaction, which is the responsible event for thrombus growth and further vessel occlusion. Accordingly, P-selectin, which has been shown to stabilize platelet-platelet and platelet-leukocyte aggregates,^{27,28} was also upregulated by mCRP, as seen in effluent platelets. This increase in P-selectin might explain, partly, the mCRP enhancement of thrombus growth. Indeed, platelet surface P-selectin followed a similar pattern after collagen and ADP stimulation in flow cytometry analysis. However, mCRP was unable to induce GPIIb/IIIa activation and surface CD63 expression. These observations suggest that mCRP enhances platelet recruitment and subsequent thrombus formation by exocytosis of α -granules and platelet agonists release. In contrast to previous data,¹⁹ mCRP effects were not mediated through the Fc γ RIII receptor. mCRP also seemed to modulate platelet CD36 expression, which is reported to act as a receptor of misfolded proteins,²⁹ suggesting a potential role of CD36 in mediation of mCRP activity. Further studies seem warranted to better elucidate the role of

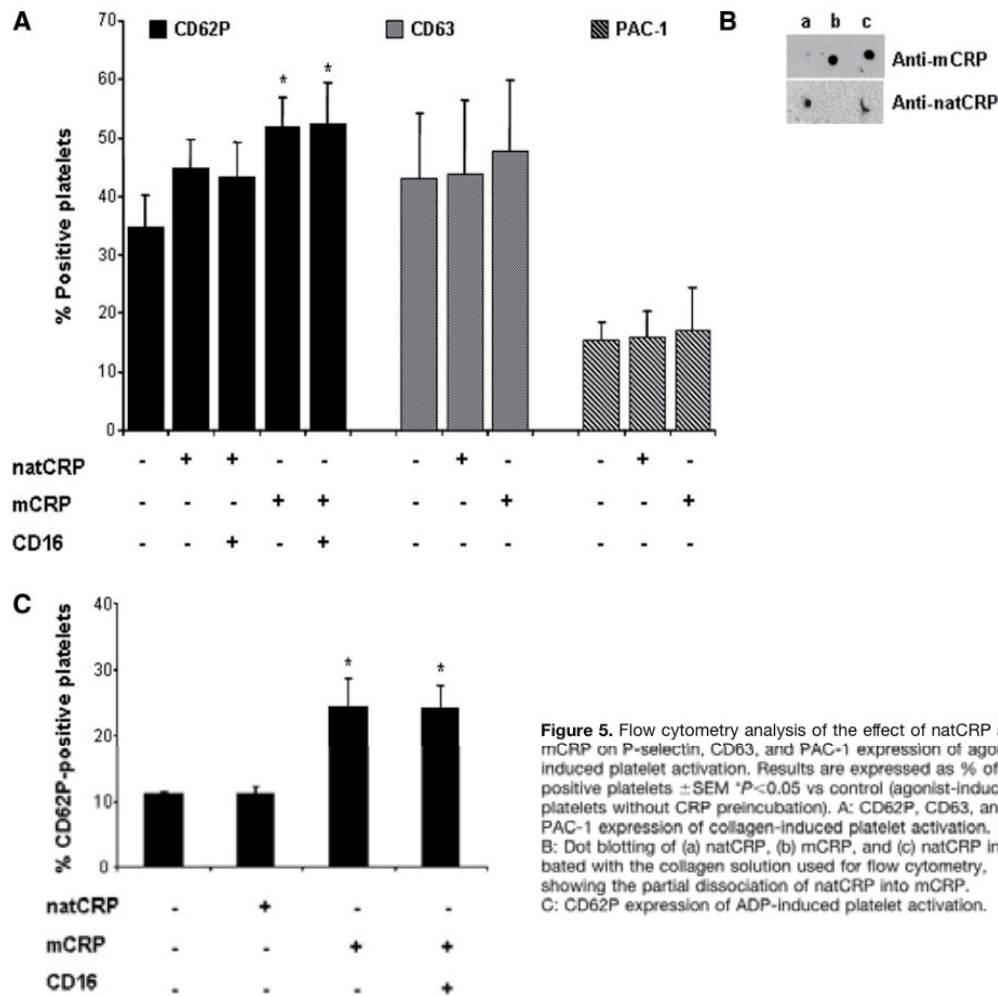


Figure 5. Flow cytometry analysis of the effect of natCRP and mCRP on P-selectin, CD63, and PAC-1 expression of agonist-induced platelet activation. Results are expressed as % of positive platelets \pm SEM * P <0.05 vs control (agonist-induced platelets without CRP preincubation). A: CD62P, CD63, and PAC-1 expression of collagen-induced platelet activation. B: Dot blotting of (a) natCRP, (b) mCRP, and (c) natCRP incubated with the collagen solution used for flow cytometry, showing the partial dissociation of natCRP into mCRP. C: CD62P expression of ADP-induced platelet activation.

mCRP on platelet activation-related signaling pathways. In contrast, natCRP did not enhance platelet adhesion and thrombus height. Interestingly, high concentrations of natCRP reduced thrombus area, consistently with its inhibitory action on platelet aggregation.^{10,11}

These findings raise the possibility that the increased thrombus formation after arterial injury and monocyte-platelet aggregation in human CRP-transgenic mice,^{12,24} could be attributed to distinct isoforms of CRP rather than natCRP itself. Moreover, the different effects of CRP isoforms found in the present study are in accordance with the opposing effects of CRP isoforms previously reported by Khreiss et al on shear-induced neutrophil-platelet aggregation.¹⁹ In agreement with our findings, mCRP has been shown to exert greater proinflammatory effects in endothelial cells and neutrophils.^{20,30} Paradoxically, Schwedler et al reported that natCRP promoted but mCRP reduced atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice.³¹ These results are not necessarily contradic-

tory with our findings because Schwedler et al studied the effect of CRP isoforms in early atherosclerosis, and designed a model of low dosing of mCRP over a long period of time, which could have heightened immune surveillance, slowing the process of atherosclerotic plaque formation. Conversely, we focused our efforts on studying the direct effect of native and modified CRP on the thrombotic complications, such as those happening on plaque rupture. Our study is, to the best of our knowledge, the first to show a causal and dual role of CRP isoforms on thrombus formation under arterial flow conditions.

How CRP mediates platelet activity still remains unclear. The presence of CRP observed on the platelet surface and within the thrombus structure after blood perfusion suggests a stable and direct interaction between platelets and CRP. When natCRP dissociates into free subunits, it yields monomeric mCRP with a loss of predominantly β -sheet secondary structure and an increase in α -helix,³⁰ forming insoluble

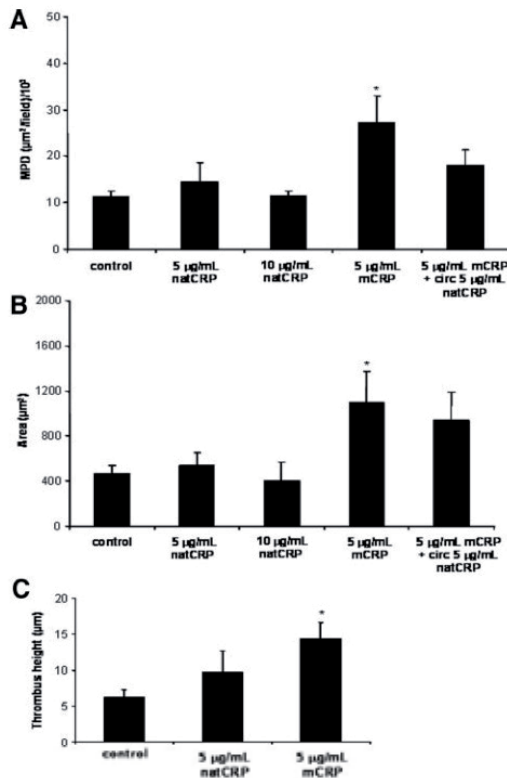


Figure 6. Contribution of immobilized CRP isoforms to platelet deposition, area of individual thrombi, and thrombus height. A, Mean platelet deposition (MPD). Results are expressed as mean values of surface covered by platelets per analyzed field ($\mu\text{m}^2/\text{field})/10^3 \pm \text{SEM}$. B, Area of individual thrombi. Results are expressed as values of surface covered by individual thrombi (μm^2) $\pm \text{SEM}$. C, Thrombus height. Results are expressed as values of height (μm) $\pm \text{SEM}$. * $P < 0.05$; vs control and natCRP.

aggregates, which could explain the different distribution of natCRP and mCRP within the thrombus. The observed difference in intrathrombus distribution might be attributed to a stronger interaction of mCRP with the platelet surface compared to natCRP. It is important to point out that it is not clear whether monoclonal anti-CRP-clone 8 from Sigma detects both native and modified CRP. According to the manufacturer it recognizes both isoforms. However, Schwedler et al showed that anti-CRP-clone 8 predominantly recognized mCRP rather than natCRP.³² On the other hand, native CRP may likely bind to phosphatidylcholine abundantly expressed on the surface of activated platelets, and it has been shown that cell membranes dissociate natCRP to a structural intermediate (mCRP(m)), which can further detach from the membrane to form mCRP.¹⁵ Whether the staining with the anti-CRP-clone 8 antibody on the surface of adhered platelets preincubated with natCRP shows the presence of mCRP, natCRP, or the intermediate mCRP(m) is not clear. However, adhered platelets preincubated with natCRP stained positive for CRP with the anti-CRP-clone 8 and negative for

mCRP with the anti-mCRP antibody (clone 8C10), suggesting the lack of presence of mCRP.

In this work we have observed that mCRP not only was able to enhance thrombosis when directly added to blood, but also when immobilized with collagen, a key component of atherosclerotic lesions. Although the presence of CRP mRNA in atherosclerotic tissue has been established,^{17,33} it is unclear whether the expressed CRP is the pentameric isoform or the monomeric isoform. It remains unknown whether CRP locally produced in the vessel wall³⁴ is, indeed, mCRP that is naturally expressed in the intima.¹⁶ It is likely that collagen exposure after mechanical or spontaneous plaque rupture may also result in exposure of mCRP to blood components, leading to platelet aggregation and thrombus formation. Alternatively, inflammation may lead to formation of mCRP from natCRP within the blood stream, thus linking thrombosis and inflammation, key events in acute coronary syndromes. Interestingly, this concept supports the fact that the mere presence of CRP in plasma is not associated to platelet aggregation, but it is conceivable that mCRP, as in vascular tissue, might be one of the thrombogenic triggering factors.

In summary, our data indicate that whereas natCRP may not affect thrombus growth, mCRP displays a prothrombotic phenotype enhancing not only platelet deposition, but also thrombus growth under arterial flow conditions. Further research seems warranted to elucidate more detailed mechanisms by which CRP isoforms regulate thrombus formation, and to clarify the role of CRP in cardiovascular disease.

Acknowledgments

We thank Dr J. Crespo and M. Pescador for their technical help. We also thank Dr L. Potempa for kindly providing the antibodies against mCRP and natCRP.

Sources of Funding

This work has been possible thanks to funds provided by Ministry of Science and Education of Spain (PNS 2006/10091), Ministry of Health- Instituto Salud Carlos III (CIBEROBN- CB06/03), and Fundaci3n Jes3s Serra. B.M. is granted with a fellowship from the Catalan Government (FI2005 DUIE). G.V. is recipient of a grant from the Science and Education Spanish Ministry (JdC).

Disclosures

None.

References

- Ridker PM, Hennekens CH, Buring JE, Rifai N. C-reactive protein and other markers of inflammation in the prediction of cardiovascular disease in women. *N Engl J Med.* 2000;342:836-843.
- Ridker PM, Rifai N, Rose L, Buring JE, Cook NR. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2002;347:1557-1565.
- Blake GJ, Ridker PM. C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41:375-425.
- Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi. *Circulation.* 1992;86:III74-85.
- Badimon L, Fuster V, Corti R, Badimon JJ. *Coronary Thrombosis: Local and Systemic Factors.* New York: McGraw Hill; 2004.
- Venugopal SK, Devaraj S, Jialal I. Effect of C-reactive protein on vascular cells: evidence for a proinflammatory, proatherogenic role. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2005;14:33-37.

7. Pasceri V, Willerson JT, Yeh ET. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells. *Circulation*. 2000;102:2165–2168.
8. Xia D, Samols D. Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94:2575–2580.
9. Zouki C, Beauchamp M, Baron C, Filep JG. Prevention of In vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein. *J Clin Invest*. 1997;100:522–529.
10. Fiedel BA, Gewurz H. Effects of C-reactive protein on platelet function. II. Inhibition by CRP of platelet reactivities stimulated by poly-L-lysine, ADP, epinephrine, and collagen. *J Immunol*. 1976;117:1073–1078.
11. Vigo C. Effect of C-reactive protein on platelet-activating factor-induced platelet aggregation and membrane stabilization. *J Biol Chem*. 1985;260:3418–3422.
12. Danenberg HD, Szalai AJ, Swaminathan RV, Peng L, Chen Z, Seifert P, Fay WP, Simon DI, Edelman ER. Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice. *Circulation*. 2003;108:512–515.
13. Kovacs A, Tornvall P, Nilsson R, Tegner J, Hamsten A, Björkegren J. Human C-reactive protein slows atherosclerosis development in a mouse model with human-like hypercholesterolemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104:13768–13773.
14. Paul A, Ko KW, Li L, Yecheor V, McCrory MA, Szalai AJ, Chan L. C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation*. 2004;109:647–655.
15. Ji SR, Wu Y, Zhu L, Potempa LA, Sheng FL, Lu W, Zhao J. Cell membranes and liposomes dissociate C-reactive protein (CRP) to form a new, biologically active structural intermediate: mCRP (m). *Faseb J*. 2007;21:284–294.
16. Diehl EE, Haines GK, III, Radosevich JA, Potempa LA. Immunohistochemical localization of modified C-reactive protein antigen in normal vascular tissue. *Am J Med Sci*. 2000;319:79–83.
17. 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;37:1200–1204.
18. Kresl JJ, Potempa LA, Anderson BE. Conversion of native oligomeric to a modified monomeric form of human C-reactive protein. *Int J Biochem Cell Biol*. 1998;30:1415–1426.
19. 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;110:2713–2720.
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;109:2016–2022.
21. 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.
22. Goto S, Tamura N, Ishida H. Ability of anti-glycoprotein IIb/IIIa agents to dissolve platelet thrombi formed on a collagen surface under blood flow conditions. *J Am Coll Cardiol*. 2004;44:316–323.
23. Pearson TA, Mensah GA, Alexander RW, Anderson JL, Cannon RO, III, Criqui M, Fadl YY, Fortmann SP, Hong Y, Myers GL, Rifai N, Smith SC Jr, Taubert K, Tracy RP, Vinicor F. Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the Am Heart Association. *Circulation*. 2003;107:499–511.
24. Danenberg HD, Kantak N, Grad E, Swaminathan RV, Lotan C, Edelman ER. C-reactive protein promotes monocyte-platelet aggregation: an additional link to the inflammatory-thrombotic intricacy. *Eur J Haematol*. 2007;78:246–252.
25. Taylor KE, Giddings JC, van den Berg CW. C-reactive protein-induced in vitro endothelial cell activation is an artefact caused by azide and lipopolysaccharide. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2005;25:1225–1230.
26. van den Berg CW, Taylor KE, Lang D. C-reactive protein-induced in vitro vasorelaxation is an artefact caused by the presence of sodium azide in commercial preparations. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2004;24:e168–e171.
27. Merten M, Thiagarajan P. P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates. *Circulation*. 2000;102:1931–1936.
28. Yokoyama S, Ikeda H, Haramaki N, Yasukawa H, Murohara T, Imaizumi T. Platelet P-selectin plays an important role in arterial thrombogenesis by forming large stable platelet-leukocyte aggregates. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45:1280–1286.
29. Herczenik E, Bouma B, Korporaal SJ, Strangi R, Zeng Q, Gros P, Van Eck M, Van Berkel TJ, Gebbink MF, Akkerman JW. Activation of human platelets by misfolded proteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1657–1665.
30. Khreiss T, Jozsef L, Hossain S, Chan JS, Potempa LA, Filep JG. Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with delayed apoptosis of human neutrophils. *J Biol Chem*. 2002;277:40775–40781.
31. Schwedler SB, Amann K, Wernicke K, Krebs A, Nauck M, Wanner C, Potempa LA, Galle J. Native C-reactive protein increases whereas modified C-reactive protein reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice. *Circulation*. 2005;112:1016–1023.
32. Schwedler SB, Guderian F, Dammrich J, Potempa LA, Wanner C. Tubular staining of modified C-reactive protein in diabetic chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18:2300–2307.
33. Jabs WJ, Theissing E, Nitschke M, Bechtel JF, Duchrow M, Mohamed S, Jahrbeck B, Sievers HH, Steinhoff J, Bartels C. Local generation of C-reactive protein in diseased coronary artery venous bypass grafts and normal vascular tissue. *Circulation*. 2003;108:1428–1431.
34. Calabro P, Willerson JT, Yeh ET. Inflammatory cytokines stimulated C-reactive protein production by human coronary artery smooth muscle cells. *Circulation*. 2003;108:1930–1932.

SUPPLEMENTAL DATA AND FIGURES**Expanded methods****Preparation, testing and storage of CRP isoforms and antibodies**

Antibodies directed to natCRP (clone 1D6) and mCRP (clone 8C10) were kindly provided by our collaborator Dr Potempa. (Ying *et al*, 1989; Schwedler *et al*, 2003); and their specificity demonstrated by measurement of binding characteristics (Figure I A). High purity human natCRP (Calbiochem) was stored in 10 mmol/L Tris, 140 mmol/L NaCl buffer (pH 8.0) containing 2 mmol/L CaCl₂ to prevent spontaneous formation of mCRP from the native pentamer. mCRP was obtained by urea chelation from purified human CRP as described by Potempa *et al*. Briefly, natCRP at 1 mg/mL was chelated with 10 mmol/L ethylene diaminetetraacetic (EDTA) and incubated in 8.0 mol/L urea for 6 h at 37 °C. Urea was removed via dialysis against low ionic strength TBS (0.01 mol/L Tris-HCl and 0.05 mol/L NaCl, pH 7.3). mCRP concentration was determined by the BCA protein assay. The filtered solution was stored at 4 °C and used within 24 h. In order to validate CRP modification, electrophoresis was performed to distinguish mCRP from natCRP, according to the method recently described by Taylor KE. Briefly, 12 % polyacrilamide SDS-containing gels were used. Samples were heated (10 min at 90 °C) for denaturing conditions. Electrophoresis was carried out at 30 mA/ 0.75 mm gel in a BioRad Power Pac 300 electrophoresis unit. Proteins were visualized using Comassie brilliant blue staining. When sample heating was omitted, natCRP ran as a broad smear with an apparent molecular weight of 40-80 kDa, while mCRP ran at a relative molecular mass of 23 kDa (Figure I B). Subjecting samples to reducing conditions and heating to 90 °C resulted in denaturation of natCRP and a relative molecular mass similar to that of mCRP was observed. natCRP was not contaminated with mCRP as no band was observed at 23 kDa. Modification of CRP by urea-chelation yielded a complete transformation of the pentameric to the monomeric CRP isoform, demonstrated by the presence of mCRP migrating as a single band of 23 kDa.

Purity of natCRP and mCRP was also shown by dot blotting where doubling dilutions of CRP preparations were bound to nitrocellulose strips and exposed to anti-nat and mCRP antibodies (1:100). Following washing and appropriate secondary antibody incubation (anti-mouse HRP conjugated; 1:100), blots were developed by ECL.

Controls where primary antibodies were omitted and where CRP was replaced with BSA on the nitrocellulose membrane showed no staining (data not included). Endotoxin levels in CRP preparations were below the detection limit of the limulus assay (<0.125 EU/ml). Sodium azide was dialysed out in CRP preparations in a large volume of Tris-HCL buffer.

Dot blotting of natCRP and mCRP onto nitrocellulose (which avoids CRP transformation following mobilization onto the charged surface) followed by exposure to antibodies demonstrated the purity of the commercially obtained natCRP and complete conversion of natCRP to mCRP following urea-chelation (Figure I C).

Experimental Design

Blood from non-smoking healthy donors, who denied taking any antiplatelet medication for 15 days prior to blood extraction, was used for the perfusion experiments.

Procedures were approved by the Clinical Research Committee of our Institution.

Blood was withdrawn in 10 UI/mL sodium heparin by cubital venipuncture, kept at 20 °C, and used within 2 hours of collection. Platelet count, leukocyte count, and hematocrit were all within normal ranges. Blood was then incubated at 37 °C for 10 min either with natCRP, mCRP or control buffer (which consisted on a solution of 10mM EDTA, 8M urea subjected to dialysis in a large volume of Tris-HCl, mimicking urea-chelation of natCRP). Platelets were rendered fluorescent by the addition of mepacrine 10 µmol/L (Sigma), unless otherwise specified.

Perfusion experiments in flat chamber

Glass slides were coated with 10 µg/ml of type I collagen (4°C, overnight). Additionally, when indicated, collagen-coated slides were incubated with 5 µg/ml of either natCRP, mCRP or blocking buffer (bovine serum albumin 1 %) for 3h at 37 °C. Immobilized CRP coating was validated by immunohistochemistry of the coated slides.

Coated slides placed in a parallel plate chamber. The flow chamber was assembled and filled with Tyrode's buffer (134 mmol/L NaCl, 0.34 mmol/l Na₂HPO₄×12H₂O, 2.9 mmol/L KCl, 12 mmol/L NaHCO₃, 1mmol/L MgCl₂×6H₂O, 20mmol/L Hepes). A peristaltic pump was used to perfuse the buffer through the chamber. After 1 min 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, slides were carefully removed from the system, rinsed with PBS pH 7.4 and fixed with 3.8 % paraformaldehyde for 15 min. The fixed slides were then washed with PBS and mounted on glass slides with Glycerol Mounting Medium (Dako Cytomation).

Imaging of platelet thrombi

Platelet deposition on the surface of collagen was scanned with a Leica TCS SP2 confocal laser scanning microscope. A 488 nm Ar Kr-laser was used as light source. Platelets were viewed with a HCX PL APO 20X / 0,7 IMM CORR objective. Five fields along the adhesion surface were systematically acquired for total platelet deposition and individual thrombus size analysis, discarding the entrance and exit of the flow path (field: 750 µm x 750 µm). A threshold was applied to distinguish platelets from the background, and the same value was then used for analyzing all the stacks of confocal images collected for a given experiment. Digital color images were converted into black-and-white images. The surface covered by platelets and the area of individual thrombi were calculated using NIH Image software (public domain software by Dr

Wayne Rasband, National Institutes of Health, version 1.62). The surface covered by platelets was expressed as the area covered by platelets per field analyzed ($\mu\text{m}^2/\text{field}$), and the individual thrombi size was calculated by measuring the area of platelet aggregates bigger than $100 \mu\text{m}^2$ and expressed in μm^2 .

Average height of platelet thrombi were calculated creating a topographic image from the spatial data set acquired ($0.5 \mu\text{m}$ distance between adjacent cross-sectional images). Once the topographic image was obtained average height was calculated.

Three-dimensional rotation projections were created from stack series of images of $235 \mu\text{m} \times 235 \mu\text{m} \times 50 \mu\text{m}$ ($1 \mu\text{m}$ distance) of selected thrombi. The maximum projection showing the z-value by color was created, and thereafter a 90° rotation animation was performed creating a projection every 2° . Observers for mean platelet deposition and thrombus height were blinded to treatment group.

CRP immunolocalization

For detection of CRP, a further set of perfusion experiments with unlabeled platelets was performed. After perfusions, collagen-coated slides were rinsed with PBS pH 7.4 and fixed with 3.8 % paraformaldehyde at room temperature and incubated in blocking buffer. Immunodetection of CRP was performed with a monoclonal anti-human CRP antibody (Sigma) which, according to the manufacturer, recognizes both native and denaturated CRP isoforms, and with a monoclonal antibody which specifically recognizes mCRP isoform. Coverslides were washed and incubated with Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L). Immunostained coverslides were washed and covered with Prolong Gold antifade reagent. Images were recorded by fluorescence confocal microscopy (HCX PL APO 63x/1.2 W Corr/0.17 CS). Controls without primary antibody showed no fluorescent labelling.

P-selectin and CD36 immunostaining

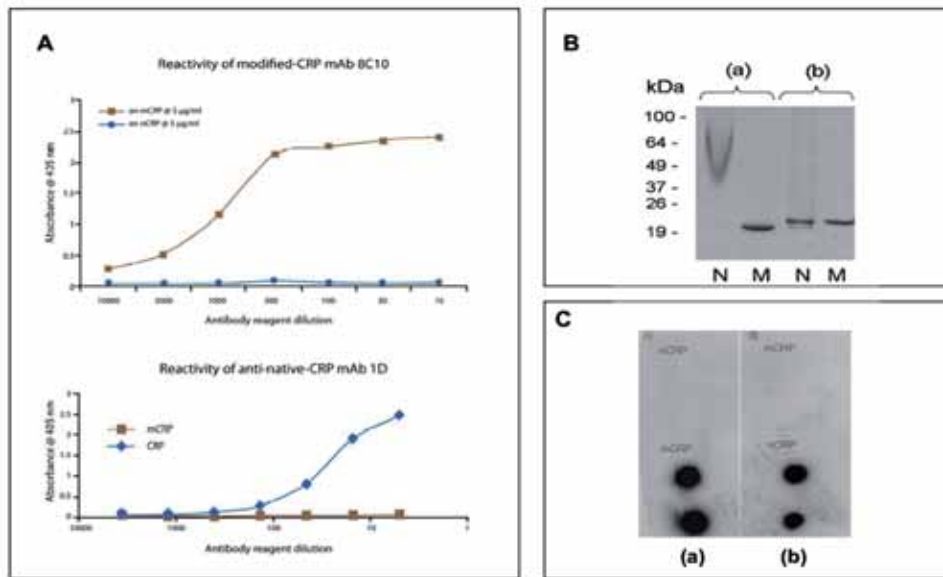
P-selectin and CD36 expression was analyzed performing perfusion experiments with human blood not labelled with mepacrine. Effluent blood was collected and fixed with 3.8 % paraformaldehyde for 30 min at room temperature. Platelet-rich plasma was obtained by centrifugation at 200 g for 17 min. Platelets were then isolated by centrifugation. Platelets were immobilized on poly-L-lysine-coated coverslides overnight, incubated with blocking buffer and afterwards incubated either with a phycoerythrin (PE) conjugated anti-CD62P monoclonal antibody (mAb) (Pharmingen) or a fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated anti-CD36 mAb (Pharmingen). Coverslides were washed and mounted onto slides using Prolong Gold antifade reagent. Images were recorded on a fluorescence confocal microscope (HCX PL APO 63x/1.2 W Corr/0.17 CS). Excitation was produced via the 488 laser line, and emission was measured along with interference contrast images on a separate photomultiplier for overlay.

Flow cytometry

For flow cytometry studies of P-selectin, CD63, and conformational change of GPIIb-IIIa, CRP-treated samples were diluted 1:10 in modified Tyrode Buffer. 25 μ l aliquots were activated with collagen (5 μ g/ml, 5 min, 37 °C) or ADP (1 μ mol/L, 5 min, 37 °C). A FITC conjugated mAb to CD41a (Pharmingen) was used as an activation-independent marker of platelets for CD62P and CD63 analysis. P-selectin and CD63 surface expression were assessed with a PE conjugated anti-CD62P mAb (Pharmingen) and a PE conjugated anti-CD63 mAb (Pharmingen), respectively. GPIIb-IIIa conformational change was assessed with a FITC conjugated PAC-1 mAb (Beckton Dickinson). In additional experiments, the responses to CRP were studied in the presence of 2.5 μ g/ml of function-blocking anti-CD16 mAb 3G8 (Pharmingen) The reaction mixture was

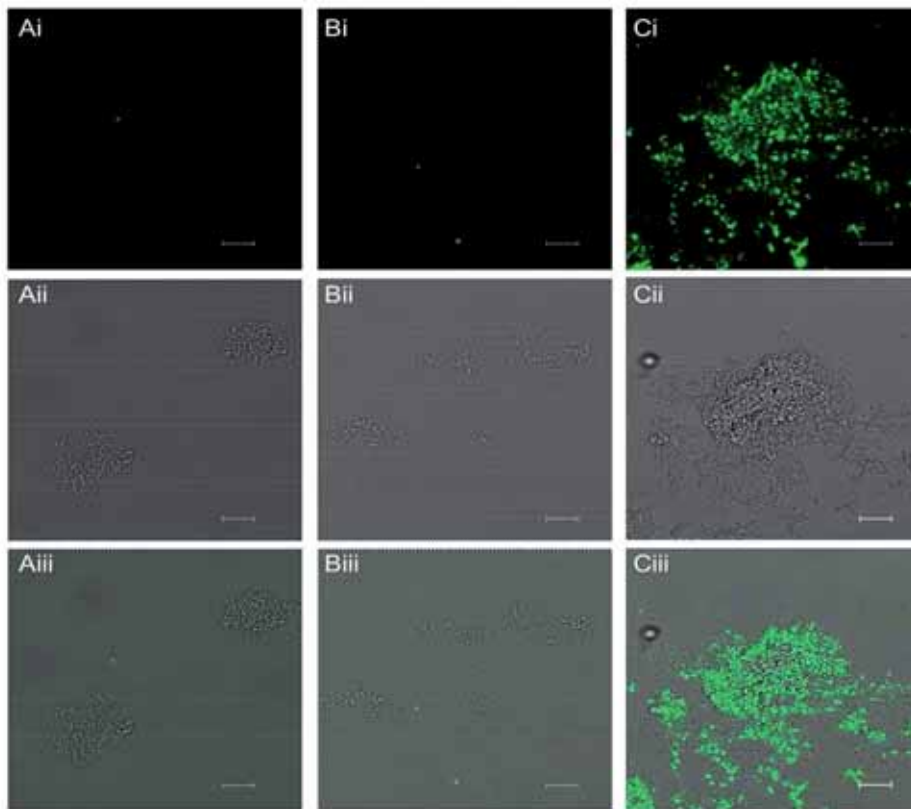
incubated in the dark at room temperature for 20 minutes. To assess the extent of non-specific association of proteins with platelets, blood was added to control tubes with FITC-labeled and PE-labeled non-immune immunoglobulins. The platelet population was identified based on its forward and side scatter and the association with CD41a antibody. A total of 10000 events were analyzed for percentage of positive platelets using Expo32 ADC XL 4 Color software. Fluorescence was measured with a Beckman Coulter Epics XL instrument. The fractions of the specific fluorescence-positive platelets were obtained after subtraction of non-specific fluorescence in the samples labelled with non-immune immunoglobulins. All measurements were fluorescence-compensated on a daily basis for each set of measured samples using calibration beads.

SUPPLEMENTAL FIGURE I



A: Binding affinity assays of anti-mCRP antibody (clone 8C10) and anti-natCRP antibody (clone 1D6). **B:** Analysis of natCRP (**N**) and urea-chelated mCRP (**M**) by electrophoresis. natCRP and mCRP, mixed with sample buffer were subjected to standard SDS PAGE conditions. Gels were stained with Coomassie brilliant blue. **(a)** Sample non-denatured; **(b)** denatured sample (heated and reduced). **C:** Dot blotting on nitrocellulose of natCRP and mCRP with **(a)** anti-mCRP and in **(b)** anti-nCRP antibodies.

SUPPLEMENTAL FIGURE II



Representative confocal images of CRP immunostaining (green) on adhered platelets with anti-mCRP antibody. **A**: control, **B**: natCRP (5 μ g/ml), **C**: mCRP (5 μ g/ml). The bars graphic shows CRP expression on adhered platelets preincubated with natCRP and mCRP. Scale bar is 20 μ m.

ARTICLE II:

"Short-term myocardial ischemia induces cardiac modified C-reactive protein expression and proinflammatory gene (COX-2, MCP-1, and TF) upregulation in peripheral blood mononuclear cells"

Gemma Vilahur^{1,2}, Rodrigo Hernández-Vera^{1,2}, **Blanca Molins^{1,2}**, Laura Casaní^{1,2}, Xavier Duran¹, Teresa Padró¹, Lina Badimon¹

¹Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

²Ciber Patofisiología de la Obesidad y Nutrición, Instituto Carlos III

Journal of Thrombosis and Haemostasis. 2009;3;485-493

Factor d'impacte: 6,29

Temps curts d'isquèmia miocàrdica indueixen l'expressió de proteïna C-reactiva modificada cardíaca i incrementen l'expressió de gens proinflamatoris (COX-2, MCP-1 i TF) en cèl·lules mononuclears perifèriques.

En aquest treball es va avaluar l'efecte de la isquèmia miocàrdica en un model porcí sobre la resposta inflamatòria local i sistèmica. A un grup d'animals se'ls hi va provocar oclusió amb baló de l'artèria coronària esquerra descendent anterior (25±1 % del ventricle esquerre d'àrea infartada; 29 % deteriorament de funció cardíaca) i es va mantenir un grup control. Es van obtenir mostres de teixit cardíac infartat i no infartat per anàlisi histopatològic i molecular. Es va extreure sang dels animals a diferents temps des de l'inici de l'infart per (i) analitzar nivells circulants de marcadors inflamatoris; (ii) analitzar expressió gènica i proteica de cèl·lules mononuclears perifèriques; (iii) avaluar el grau de reactivitat plaquetària. El procés isquèmic va induir l'expressió cardíaca de TNF- α i IL-6, el reclutament de cèl·lules inflamatòries i expressió de mCRP en macròfags infiltrats (P<0,05), així com un augment dels nivells circulants de TNF- α i IL-6. L'expressió gènica i proteica de MCP-1, COX-2 i TF en cèl·lules mononuclears perifèriques va augmentar significativament amb el temps d'isquèmia. A més, la isquèmia també va produir un augment de l'adhesió plaquetària sobre col·lagen en condicions de flux arterial i una major activació de RhoA. En resum, el procés d'isquèmia miocàrdica, inclús sense aterosclerosi subjacent, va provocar una resposta inflamatòria induint el reclutament de macròfags i l'activació sistèmica de cèl·lules mononuclears perifèriques i tornant les plaquetes més susceptibles a l'activació.

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

© 2008 International Society on Thrombosis and Haemostasis

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°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 metabolism 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

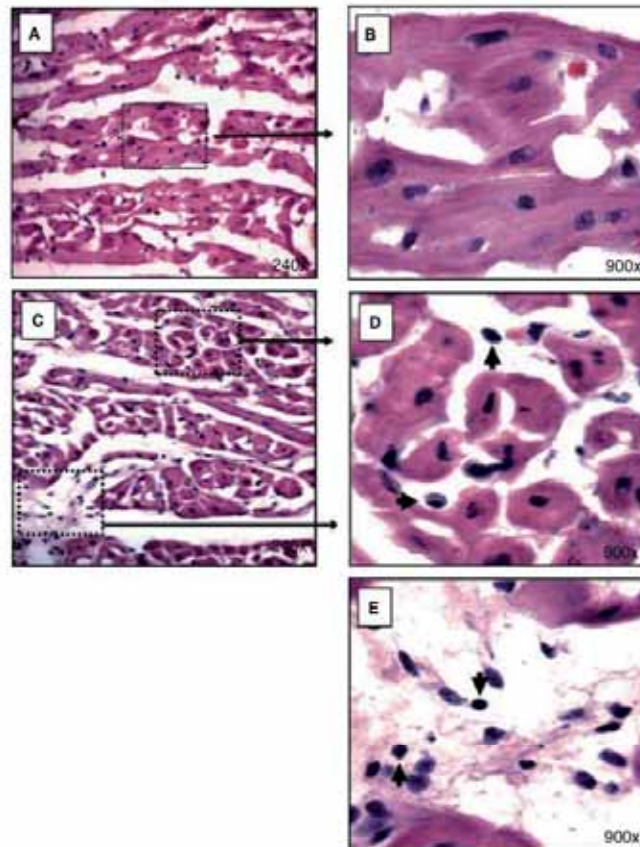


Fig. 1. Histopathologic analysis of the peri-infarcted myocardial zone. Ninety minutes of ischemia was associated with inflammatory infiltrate in the peri-infarcted myocardium (C–E), as assessed by hematoxylin–eosin staining, when compared to non-infarcted myocardium (A, B) from sham-operated animals.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

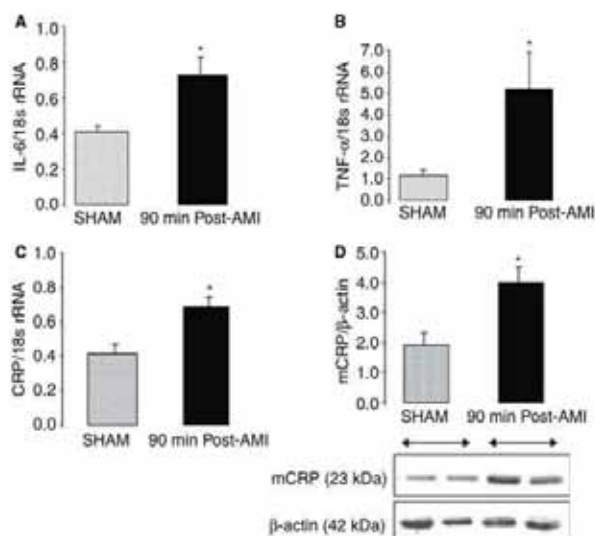


Fig. 2. Interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and C-reactive protein (CRP) mRNA analysis in the peri-infarcted myocardium. Coronary occlusion for 90 min was associated with clear upregulation of IL-6, TNF- α and CRP gene expression levels in the peri-infarcted myocardial zone when compared 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.

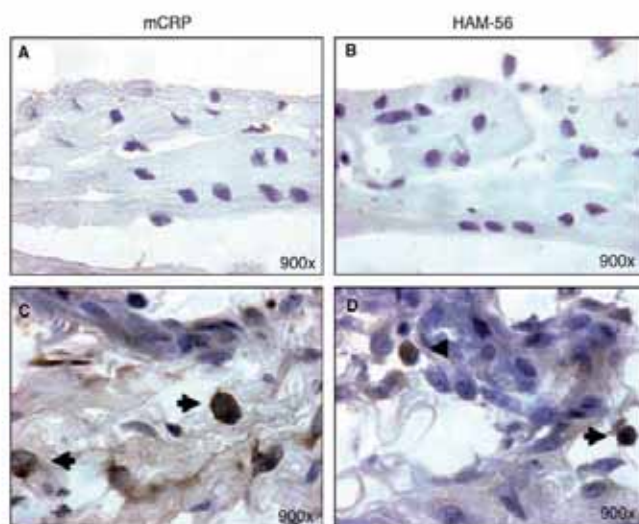


Fig. 3. C-reactive protein (CRP) immunohistochemical localization in the peri-infarcted myocardium. Modified CRP (mCRP; A, C) and macrophage [human alveolar macrophage-56 (HAM-56); B, D] content was assessed by immunohistochemical analysis in both sham-operated animals (A, B) and ischemic animals (C, 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

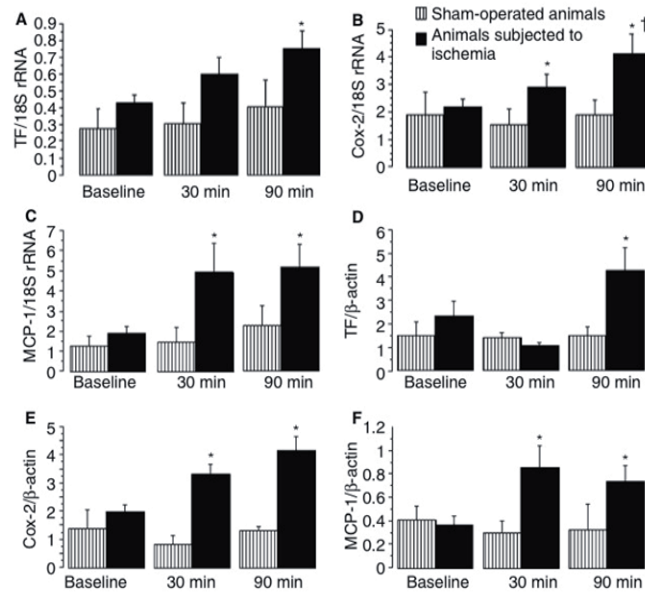


Fig. 4. Effects of time of ischemia on circulating mononuclear cells. (A–C) Effect of time of ischemia (30 and 90 min) on tissue factor (TF) (A), cyclo-oxygenase-2 (Cox-2) (B) and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1/CCL2) (C) mRNA expression in peripheral mononuclear cells. (D–F) Effect of time 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 pro-inflammatory 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

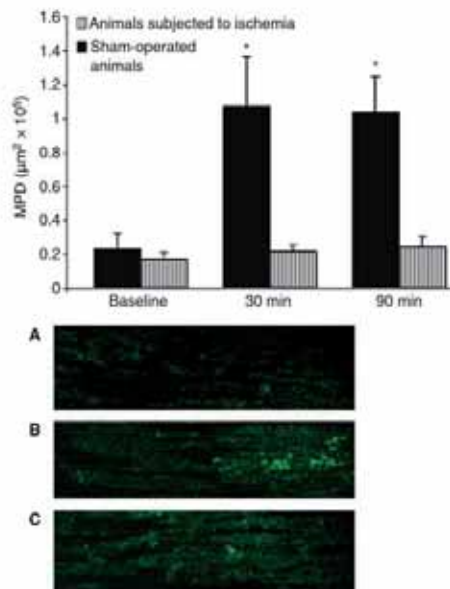


Fig. 5. Effect of ischemia on mean platelet deposition (MPD). (A) T0 or baseline, (B) T30, (C) T90. Results are expressed as mean values of surface covered by platelets per analyzed field ($\mu\text{m}^2/\text{field}$) \pm standard error of the mean. * $P < 0.005$ vs. $t = 0$ and sham-operated animals.

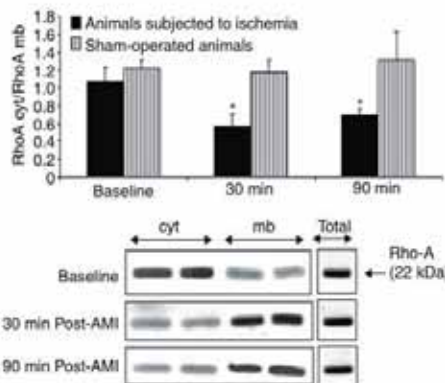


Fig. 6. Evaluation of RhoA activation in platelets. The total amount of RhoA was unchanged throughout the tested periods, whereas 30 min of ischemia markedly increased RhoA translocation, measured as cytosol (cyt)/membrane (mb) ratio. AMI, acute myocardial infarction. * $P < 0.05$ vs. $t = 0$ and sham-operated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

ARTICLE III:

"Rosuvastatin inhibits platelet adhesion and increases platelet surface GRP78; role of platelet surface GRP78"

Blanca Molins¹⁻³, Esther Peña^{1,2}, Teresa Padró¹, Laura Casaní^{1,2}, Carlos Mendieta³, Lina Badimon^{1,2}

¹Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau

²Ciber Patofisiología de la Obesidad y Nutrición, Instituto Carlos III

³Departament d'Odontostomatologia, Facultat d'Odontologia, Universitat de Barcelona

La rosuvastatina inhibeix l'adhesió plaquetària i incrementa GRP78 a la superfície de la plaqueta; paper de GRP78 a la membrana plaquetària

En aquest estudi es va avaluar l'efecte del tractament *in vitro* amb rosuvastatina sobre la interacció plaqueta-col·lagen en condicions de flux, seguit d'un estudi proteòmic amb la finalitat d'identificar noves proteïnes implicades en els mecanismes inhibidors de la rosuvastatina en l'activació plaquetària.

Es van realitzar experiments de perfusió sobre col·lagen I a 250 s⁻¹ i 1500 s⁻¹ i es van mesurar l'adhesió plaquetària i el creixement del trombe per microscopia confocal. Es va recollir la sang efluent dels experiments de perfusió i es va fer l'extracció seqüencial de les proteïnes de les plaquetes en base a la seva solubilitat diferencial i es van separar les proteïnes per electroforesi bidimensional. Les proteïnes es van identificar per espectrometria de masses (MALDI-TOF), western blot, immunofluorescència i immunoprecipitació.

El tractament amb rosuvastatina va produir una reducció immediata de l'adhesió plaquetària. A 250 s⁻¹, la rosuvastatina (2µM, 4µM y 8µM) va produir una reducció de l'adhesió plaquetària del 50 %, 47 % i 60 %, respectivament (P<0,01). A 1500 s⁻¹, el tractament amb rosuvastatina (8µM) va reduir l'adhesió un 56 % (P<0,05). L'estudi proteòmic de plaquetes efluentes va demostrar que el tractament amb rosuvastatina (8 µM) va modificar l'expressió del perfil proteic de 10 proteïnes de la fracció citosòlica i 8 de la fracció enriquida en proteïnes de membrana i citoesquelet. D'entre aquestes modificacions, la rosuvastatina va produir en la fracció de membrana un augment d'expressió de GRP78, una proteïna que apavaiga l'activitat procoagulant del TF. De fet, es va demostrar per immunoprecipitació de plaquetes, que GRP78 interaccionava activament amb el TF. El

bloqueig de GRP78 de superfície en experiments de perfusió va resultar en un augment remarcant d'adhesió plaquetària i una disminució del temps de formació del quall.

La rosuvastatina va reduir la interacció plaqueta-col·lagen i va produir un augment de GRP78 a la superfície de la plaqueta, produint un efecte inhibidor de l'activació plaquetària, independentment dels seus efectes hipolipemians.

Protective role of GRP78 on platelets: effect of rosuvastatin on platelet deposition

MOLINS et al. ROSUVASTATIN AND GRP78 IN PLATELETS

Blanca Molins¹⁻³, Esther Peña^{1,2}, Teresa Padro¹, Laura Casani^{1,2}, Carlos Mendieta³,
Lina Badimon^{1,2}

¹Cardiovascular Research Center, CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau (UAB), Barcelona, Spain; ²Ciber Patofisiologia de la Obesidad y Nutricion, Institute Carlos III; and, ³Periodontics Department, Faculty of Odontology, University of Barcelona, Barcelona, Spain;

Address for Correspondence: Prof. 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

Type of submission: Original article

Section: Thrombosis and Hemostasis

Total Word Count: 4260

Abstract Word Count: 202

Total Figures Plus Tables: 7 figures and 1 table

Reference count: 36

ABSTRACT

We aimed to evaluate the direct effect of rosuvastatin on thrombosis by investigating platelet-collagen interactions under arterial flow conditions followed by a proteomic analysis to identify potential proteins involved in the effects of rosuvastatin on platelet function. Blood was perfused over type I collagen at different wall shear rates and platelet deposition was measured by confocal microscopy. Perfused effluent blood was collected, platelets were sequentially extracted based on differential protein solubility, and two dimensional gel electrophoresis was performed. Proteins were identified by mass spectrometry, western blot, immunofluorescence, and immunoprecipitation. We found that rosuvastatin yielded an immediate reduction on platelet deposition. Proteomic analysis revealed that rosuvastatin modulated the expression pattern of 10 proteins in the cytosolic fraction and 8 proteins in the membrane-enriched fraction. Among them, rosuvastatin increased platelet surface 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78). Immunoprecipitation of platelet GRP78 revealed its interaction with tissue factor. Moreover, surface GRP78 blockade prior flow experiments resulted in a substantial increase in platelet deposition and in a decrease in clotting time. Together, these findings demonstrate that rosuvastatin reduces platelet deposition and increases platelet surface GRP78, showing an inhibitory effect on platelet activation and indicate a role for surface GRP78 beyond its role as a molecular chaperone.

INTRODUCTION

HMG-CoA reductase inhibitors (statins) are drugs widely and successfully employed as therapeutic agents in the treatment of cardiovascular diseases associated with hypercholesterolemia^{1,2}. Moreover, rosuvastatin has recently shown beneficial effects in normocholesterolemic patients³. The first response to vascular injury consists of platelet adhesion to the damaged vessel wall or to exposed tissue components, and is mediated by flow-regulated interactions that have a key influence on subsequent thrombus growth, often culminating in life-threatening complications⁴. Clinical results strongly suggest that the beneficial effects of statins may be also related to factors beyond lowering systemic lipid levels^{5,6}. The effects of statins are mediated via blockade of mevalonate formation, which results in reduction of cholesterol synthesis. Inhibition of mevalonate formation also results in reduced levels of isoprenoid derivatives, which play important roles in the isoprenylation of small GTPases of the Rho/Rac/Cdc42 family⁷⁻⁹. Isoprenylation facilitates activation and translocation of these proteins from the cytosol to the plasma membrane and thereby supports the function of these intracellular signaling pathways, which are necessary for many cellular processes in the cardiovascular system^{7,10,11}. Indeed, statins inhibit cell proliferation, improve endothelial function, reduce inflammation, stabilize the atherosclerotic plaque, and enhance fibrinolysis^{6,12}. Although contradictory findings on the effect of different statins on platelet inhibition have been reported, there is evidence for their antithrombotic properties^{13,14}. Rosuvastatin is a new available HMG-CoA reductase inhibitor that seems to have higher lipid-lowering efficacy than any other currently available statins. Indeed, rosuvastatin treatment has shown to induce a significant regression of atherosclerosis¹⁵. However, it is unknown whether and how rosuvastatin may regulate platelet adhesion.

Therefore, our purpose in the present study was to evaluate the acute effect of rosuvastatin on platelet-collagen interactions under flow conditions followed by a

proteomic analysis in order to identify new potential proteins involved in the effects and mechanisms of action of rosuvastatin on platelet function. Our results indicate that rosuvastatin induces inhibition of flow-dependent platelet deposition and translocation of 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78) to the platelet surface. Surface GRP78 may play a role in atherothrombosis, beyond its function as an endoplasmic reticulum (ER) chaperone.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

Blood was obtained from non-smoking healthy donors, who denied taking any antiplatelet medication for 15 days prior to blood extraction. Procedures were approved by the Clinical Research Committee of our Institution. Blood was withdrawn in 10 UI/ml sodium heparin by cubital venipuncture. Alternatively, when indicated, blood was withdrawn into 1:10 (vol/vol) 90 mM trisodium citrate.

In some experiments, white commercial fixed-breed pigs (weight \approx 46 kg) were used in the study and all procedures were in accordance with NIH guidelines and followed the American Physiological Society Guidelines for animal research. Porcine blood was withdrawn into 1:10 (vol/vol) 90 mM trisodium citrate by femoral venipuncture, kept at 20 °C, and used within 2 hours of collection.

Platelet count, leukocyte count, and hematocrit were all within normal ranges.

Platelets were rendered fluorescent by the addition of mepacrine 10 μ M (Sigma), unless otherwise specified. Blood was then incubated at 37 °C for 15 min with 0 μ M, 2 μ M, 4 μ M or 8 μ M rosuvastatin, kindly supplied by Astra Zeneca. These rosuvastatin concentrations would correspond to doses of 10 mg/day, 20 mg/day and 40 mg/day, respectively in a 70 kg adult. When indicated blood was incubated in the presence of 10 μ g/ml of anti-GRP78 (Santa Cruz Biotechnology) for 20 min at 37 °C prior incubation with rosuvastatin.

Additionally, platelets from normocholesterolemic animals, which had been given rosuvastatin (2.5 mg/kg day) during 7 days, were obtained and used for western blot analysis.

Flow experiments in flat chamber

Type I collagen-coated slides were prepared and placed in a parallel plate chamber described in detail elsewhere^{16,17}. The flow chamber was assembled and filled with

Tyrode's buffer (134 mM NaCl, 0.34 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 2.9 mM KCl, 12 mM NaHCO₃, 1 mM MgCl₂·6H₂O, 20 mM Hepes). A peristaltic pump was used to perfuse the buffer through the chamber. After 1 min buffer preperfusion, blood was introduced into the chamber at constant shear rates of 250 s⁻¹ and 1500 s⁻¹ for 5 min, unless otherwise indicated. 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 pH 7.4 and fixed with 3.8 % paraformaldehyde for 15 min. The fixed slides were then washed with PBS and mounted on glass slides with Glycerol Mounting Medium (Dako Cytomation).

Measurement of platelet deposition

Platelet deposition on the surface of collagen was scanned with a Leica TCS SP2 confocal laser scanning microscope. A 488 nm Ar Kr-laser was used as light source. Platelets were viewed with a HCX PL APO 20X / 0,7 IMM CORR objective. Five fields along the adhesion surface were systematically acquired for total platelet deposition analysis, discarding entrance and exit of the flow path (field: 750 μm x 750 μm). A threshold was applied to distinguish platelets from the background, and the same value was then used for analyzing all the stacks of confocal images collected for a given experiment. Digital color images were converted into black-and-white images. The surface covered by platelets was calculated using NIH Image software (public domain software by Dr Wayne Rasband, National Institutes of Health, version 1.62). Mean platelet deposition was expressed as the area covered by platelets per analyzed field (μm²/field). To measure the thrombus height an image stack was recorded from the xz-sections in the y-direction. The projection axis was the orthogonal axis (y-axis for vertical xz-sections). Thrombus height was measured from the maximum projection of the stack.

Proteomic Analysis

Protein Extraction: Static and sheared porcine platelets were immediately isolated by low speed centrifugation (250 g, 10 min), at room temperature. Platelet number was adjusted to 4×10^8 platelets/ml and centrifuged at 1400 g for 15 min to obtain platelet pellets which were stored deep-frozen (-80 °C).

Platelets were sequentially extracted based on differential protein solubility. A tris-soluble (cytosolic) fraction and a urea-detergent soluble (cytoskeleton/membrane) fraction were obtained. Briefly, samples were homogenized in 40 mM Tris base buffer, incubated for 15 min, and centrifuged at 16000 g (20 min, 4°C). Protein pellets were washed once with Tris-buffer and further extracted with a urea/thiourea-chaps buffer (7 M Urea; 2 M Thiourea; 4 % CHAPS; 40 mM Tris-Base) for 15 min, as described above. Prior protein separation by 2-DE, sample contaminants were removed with a commercial kit (2D-CleanUp Kit, Amersham). Protein concentration in the extracts was measured with 2D-Quant Kit (GE-HealthCare) as indicated by the manufacturer.

Two-Dimensional Gel Electrophoresis (2-DE): Isoelectric focusing (IEF) was performed using the Protean-IEF cell (BioRad). The method used was that according to Molloy et al¹⁸ with modifications. In brief, 150 µg of protein were resuspended in 350 µl of rehydration buffer (7 M urea; 2 M thiourea, 2 % CHAPS, 100 mM DTT, 0.2 % carrier ampholytes) and loaded onto 17 cm dry IPG strips (pI 3-10 linear range, BioRad) during 16 h by active rehydration at 50 V. Proteins were then focused by progressive voltage increase up to 10000 V within 5 hours, with a final step at 10000 V until 70000 Volts Hour. After IEF, the strips were equilibrated with a reducing solution (50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.8, containing 6 M urea, 2 % SDS, 30 % glycerol, and 2 % DTT) and an alkylating solution (50 mM Tris-HCl buffer pH 8.8, 6 M urea, 2 % SDS, 30 % glycerol, and 2.5 % iodoacetamide), for 15 min. Equilibrated

IPG strips were transferred for the second dimension (SDS-PAGE) onto 10% polyacrilamide gels. Electrophoresis was performed using a Protean system (Ettan Dalt, Amersham) at 17 W/gel. Gels were stained with pink flamingo for compatibility with the subsequent analysis of proteins by mass spectrometry.

Differential Image Analysis: Fluorescently stained gels were scanned (Typhoon), and analyzed for differences in protein patterns between groups with the 7.3 PD-Quest software (BioRad), using a single master that included all gels of each independent experiment. Each spot was assigned a relative value that corresponded to the single spot volume compared to the volume of all spots in the gel, following background extraction and normalization between gels.

Protein Identification by MALDI-TOF-MS Analysis: Protein spots of interest were excised from 2-DE gels, washed with 50 mM ammonium bicarbonate, 50 % methanol, dehydrated with 100 % acetonitrile, and dried under vacuum before enzymatic digestion with sequence-grade modified porcine trypsin (Promega). Peptides from in-gel-trypsin digestion (1 μ l) were mixed 1:1 with 5 mg/ml α -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid and spotted on a stainless steel mass spectrometry slide. Protein identification was performed by peptide-mass fingerprint using a Ettan MALDI-TOF Pro matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometer (GE-Healthcare) operated in delayed extraction/reflector mode. MALDI-generated mass spectra were internally calibrated using trypsin autolysis products, Ang III (angiotensin III), and ACTH (adrenocorticotrophic hormone) peaks. Peptide masses were searched against the National Center for Biotechnology Information nonredundant mammalian database using ProFound™ and confirmed using a Mascot search from Matrixscience selecting the SwissProt database. Because human protein database is widely more extensive than pig database, identified human proteins were blasted against pig proteins and validated if they reached an

identity higher than 80%. Protein identification was based on the measurement of at least 10 peptides with a minimum of 50 % matched peptides and coverage higher than 20 %. Minimal expectation for valid identification was 0.01 and $P < 0.05$.

Western Blot Analysis

Sample extracts (25 μ g protein) were resolved by 10 % SDS-PAGE and electrotransferred to nitrocellulose membranes, as described previously¹⁹. Detection was performed with a goat polyclonal antibody against GRP78 (Santa Cruz Biotechnology) and a mouse monoclonal antibody against tissue factor (TF) (American Diagnostica). Band densities were determined with the ChemiDoc™ XRS system (Bio-Rad) in chemiluminescence detection modus and Quantity-One software (Bio-Rad). Normalization was performed against actin.

Immunofluorescence

GRP78 expression was analyzed by performing perfusion experiments at a wall shear rate of 1500 s^{-1} with porcine blood not labelled with mepacrine. Unsheared and effluent blood was collected and fixed with 3.8 % paraformaldehyde for 30 min at room temperature. Platelet-rich plasma was obtained by centrifugation at 200 g for 17 min. Platelets were then isolated by centrifugation,²⁰ immobilized on poly-L-lysine-coated coverslips overnight, incubated with blocking buffer (1 % bovine serum albumin in PBS) and afterwards incubated with a goat polyclonal GRP78 (c-20) antibody (Santa Cruz Biotechnology) and with a mouse monoclonal CD61-FITC antibody (Pharmingen). Coverslips were washed and incubated with Alexa Fluor 633 rabbit anti-goat IgG (H+L). Immunostained coverslips were washed and covered with Prolong Gold antifade reagent. Images were recorded by fluorescence

confocal microscopy (Leica TCS SP2) with a HCX PL APO 63x/1.2 W Corr/0.17 CS objective. Controls with no primary antibody showed no fluorescence labelling. For colocalization analysis of GRP78 and TF on adhered platelets and sheared effluent platelets a further set of flow experiments with unlabeled platelets was performed. After perfusions, collagen-coated slides were rinsed with PBS pH 7.4 and fixed with 3.8 % paraformaldehyde at room temperature and incubated in blocking buffer. Effluent sheared platelets were collected and GRP78 was immunostained as described above. TF was detected with a mouse monoclonal TF antibody (American Diagnostica) as primary antibody and an Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) as secondary antibody. Images were recorded by fluorescence confocal microscopy (HCX PL APO 63x/1.2 W Corr/0.17 CS). GRP78 and TF colocalization was analyzed with Metamorph software (Universal Imaging Corp, West Chester, PA).

GRP78 immunoprecipitation

Platelet-rich plasma (PRP) was prepared by centrifugation at 250 g for 10 min. To obtain washed platelets, PRP was centrifuged at 1200 g in the presence of PGE₁ (0.1 µg/mL) for 10 min at room temperature. Platelets (3x10⁸ platelets per milliliter) were washed with Tyrode-Hepes, treated with PGE₁ (0.1 µg/mL) and centrifuged at 1200 g for 10 min at 4 °C.

The pellet was lysed with 1 mL of cold lysis buffer (1 % Triton X-100, 10 mM Tris, pH 7.5, 150 mM KCl, and protease inhibitors), and then centrifuged at 10 000 g for 10 min at 4°C. Alternatively, platelet subfractionation was performed as described²¹. The supernatant of the platelet lysate was precleared by incubating for 30 min at 4°C in lysis buffer containing Protein A/G PLUS-Agarose beads (Santa Cruz Biotechnology). The sample was incubated with GRP78 antibody overnight at 4°C. The antibody–antigen complex was precipitated with protein A/G PLUS-Agarose and then washed twice with lysis buffer. The proteins were eluted from the resin by heating at 95°C for 5 min in electrophoresis sample buffer.

Thrombelastographic coagulation analysis

Dynamic whole blood clot formation was performed with the ROTEM coagulation analyzer (Pentapharm, Munich, Germany), which is based on the thrombelastograph system using the extrinsically activated Ex-TEM assay (containing 20 μ l CaCl₂ 0.2 M, 20 μ l TF, 300 μ l citrated blood). Clotting time (CT) was determined. The ROTEM device was checked for proper functioning according to the manufacturer's recommendation using a control serum (ROTROL). Tests were performed using ROTEM cups and pins. All reagents were purchased from Pentapharm GmbH (Munich, Germany).

Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm SEM. After testing for normal distribution and equality of variances with Levene's *F* test, Student's *t*-test or ANOVA as appropriate was used to determine statistical significance between treatments. A value of *P*<0.05 was considered significant.

RESULTS

Flow experiments in parallel-plate flow chamber

In vitro rosuvastatin treatment significantly reduced platelet deposition triggered by collagen at both low and high wall shear rates. At 250 s^{-1} , platelet deposition was significantly reduced by rosuvastatin ($P<0.0001$) (Figure 1A). The mean surface covered by platelets was reduced from $5134\pm350\ \mu\text{m}^2/\text{field}$ (non-treated blood) to $2557\pm225\ \mu\text{m}^2/\text{field}$ (rosuvastatin $2\ \mu\text{M}$), $2702\pm260\ \mu\text{m}^2/\text{field}$ (rosuvastatin $4\ \mu\text{M}$), and $2062\pm206\ \mu\text{m}^2/\text{field}$ (rosuvastatin $8\ \mu\text{M}$). Platelet deposition decreased 50%, 47%, and 60% respectively.

Rosuvastatin also reduced significantly thrombus growth by reducing thrombus height (Figure 1B) at low shear rate. The highest thrombi observed in the proximal zone of the flow path coated with collagen decreased from $21.02\pm0.77\ \mu\text{m}$ (non-treated blood) to $14.35\pm0.9\ \mu\text{m}$ (rosuvastatin $2\ \mu\text{M}$), $16.46\pm1.0\ \mu\text{m}$ (rosuvastatin $4\ \mu\text{M}$), and $16.13\pm1.0\ \mu\text{m}$ (rosuvastatin $8\ \mu\text{M}$). Thrombus height was significantly reduced by 30 % ($P<0.01$), without differences among different rosuvastatin concentrations.

At 1500 s^{-1} , the mean surface covered by platelets significantly decreased from $8561\pm1283\ \mu\text{m}^2/\text{field}$ in non-treated blood to $3763\pm880\ \mu\text{m}^2/\text{field}$ in blood treated with rosuvastatin ($8\ \mu\text{M}$), as shown in Figure 1C, which means a 56% reduction on platelet deposition ($P<0.005$).

Proteome changes in rosuvastatin-treated platelets

Differential proteomic analysis was used to identify changes induced by rosuvastatin in effluent sheared porcine platelets from flow experiments run at a wall shear rate of 1500 s^{-1} . Average gels were obtained from pooling at least 3 independent experiments. After a first screening using a broad pH range (pH 3 to 10), the majority of potential changes induced by rosuvastatin were localized in a pH ranging from 5 to

8, what lead us to study the proteome in a pH ranging from 5 to 8. Proteomic analysis revealed that rosuvastatin (8 μ M) modulated the expression pattern of 10 spots in the cytosolic fraction and 8 spots in the membrane-enriched fraction, as shown in Table 1 and in Figure 2.

Identification of GRP78 and changes induced by rosuvastatin

GRP78 was identified as a series of 3 spots with relative molecular mass of approximately 72 kDa, clustered around pH 4.8 and 5.2, and identified by MALDI-TOF analysis as 78 kDa glucose-regulated protein or BiP protein (accession number AAF13605). Rosuvastatin treatment apparently induced an increase of the expression in the urea-soluble fraction (~30 %) and a reduction of the expression in the tris-soluble fraction (~25 %) in all the 3 spots identified as GRP78 (Figure 3A-C). In order to confirm the changes observed in 2-DE analysis, western blot analysis from 1-DE gels of protein extracts was performed on platelets with the different treatments.

Western blot analysis of protein extracts from control and rosuvastatin treated platelets demonstrated an increase in the expression of GRP78 in the urea-detergent soluble fraction ($P < 0.05$) of sheared platelets (Figure 3D).

To further elucidate the effect of rosuvastatin on GRP78 both resting and post-chamber sheared platelets were analyzed by confocal microscopy with antibodies against GPIIIa and GRP78. In resting platelets, significant amounts of GRP78 were detected on the platelet surface. In sheared platelets (effluent post-chamber platelets), GRP78 immunodetection in the platelet membrane was weaker than in resting platelets. In sheared platelets that had been preincubated with rosuvastatin, levels of surface GRP78 were similar to those in resting platelets (Figure 4).

In vivo rosuvastatin treatment for 7 days significantly increased platelet GRP78 content, as shown by western blot analysis ($P < 0.05$) (Figure 5A). Platelet GRP78

increased both in the membrane-enriched fraction and in the cytoplasmic fraction in the group of animals that received rosuvastatin.

Effect of GRP78 blockade on platelet deposition and coagulation

To investigate the role of GRP78 in platelet adhesion and thrombus growth, a further set of perfusion experiments with human heparinized blood was performed in the presence of 10 µg/ml of anti-GRP78 or non-immune goat IgG as control. Blockade of GRP78 resulted in a substantial increase in platelet deposition ($P < 0.0001$) compared to control samples, as shown in Figure 6A. Blockade of GRP78 in rosuvastatin-treated platelets also resulted in a significant increase in platelet deposition. Interestingly, GRP78 blockade also resulted in shortened clotting time (CT) as measured by thromboelastometry (90.6 ± 6.5 s control vs. 80.8 ± 6 s blockade of GRP78, $P < 0.05$, Student's paired t-test).

GRP78 and TF interaction

TF was found to interact with GRP78 as observed by GRP78 immunoprecipitation. Both total platelet lysate and platelet membrane fraction showed interaction with TF (Figure 6B). We did not detect the presence of GPVI, GPIb, GPIV, or GPIIIa on GRP78 immunoprecipitates.

GRP78-TF colocalization was analyzed by immunofluorescence. We observed that GRP78 colocalized with TF both in platelets adhered to collagen and in effluent sheared platelets. The increase in platelet surface GRP78 induced by rosuvastatin colocalized with TF. Indeed, a double immunostaining of TF and GRP78 in effluent sheared platelets showed that in control platelets a 13.2 ± 3 % of the area positively stained for TF colocalized with the area that stained positive for GRP78, while in rosuvastatin treated samples a 54.7 ± 12 % of the area positively stained for TF colocalized with GRP78 (Figure 6C) ($P < 0.05$). Similarly when analyzing the platelets

adhered to collagen, in control samples a 23.9 ± 3.7 % of platelets positively stained for TF colocalized with GRP78, whereas in rosuvastatin treated samples (with total platelet deposition significantly reduced) this percentage increased up to 45.1 ± 5.9 % ($P<0.01$, Figure 7). Therefore, rosuvastatin maintained high GRP78 expression in the platelet surface that colocalized with TF.

DISCUSSION

In the present study we demonstrate that HMG-CoA reductase inhibition reduces platelet-collagen interaction by reducing platelet adhesion and thrombus growth under flow in normocholesterolemic conditions.

The post-perfusion confocal analysis allowed the study of thrombus formation on a thrombogenic substrate such as collagen, measuring platelet deposition and thrombus height. Rosuvastatin, at therapeutic doses, was able to reduce platelet deposition at both venous and arterial wall shear rates. Because statins have shown to exert several cellular effects, we aimed to identify novel target proteins modified by statin treatment on platelets. Here, we report for the first time that platelets have GRP78 both in the membrane and in the cytosol. GRP78 is translocated from the platelet membrane by shear forces and rosuvastatin inhibits this translocation in shear-activated platelets.

GRP78 is an ER chaperone that participates in many cellular processes, including translocation of newly synthesized polypeptides across the ER membrane, facilitating the folding and assembly of newly synthesized proteins by preventing intra- or intermolecular aggregation, targeting misfolded proteins for proteasome degradation, regulating calcium homeostasis, and serving as a sensor for ER stress²²⁻²⁴.

Although GRP78 resides inside the ER lumen, a number of studies demonstrate that GRP78 is also located on the cell surface²⁵⁻²⁷. Indeed, two independent groups have recently detected that a fraction of GRP78 can exist as a transmembrane protein^{28,29} in chinese hamster ovary (CHO), human leukemia, bladder carcinoma, and human embryonic kidney 293 T cells. These observations are in agreement with our findings. Indeed, we have identified GRP78 both in cytosol- and membrane/cytoskeleton-enriched fractions, and confocal analysis revealed that GRP78 translocated in and out the membrane depending on the activation state. On the other hand, there are evidences that GRP78 can be released from intact cells and it has been also detected in a circulating form in serum from healthy subjects³⁰.

In fact, we also identified GRP78 in plasma from effluent blood (data not shown), which means that platelet GRP78 could be eventually released.

GRP78 is preferentially expressed in advanced atherosclerotic lesions³¹ and on the fibrous cap surface in ApoE deficient mice³². A recent study has shown that atheroprone, but not atheroprotective flow upregulated GRP78 in endothelial cells, via p38MAPK and $\alpha 2\beta 1$ -dependent mechanism, and that increased GRP78 correlated with activation of the unfolded protein response, providing a protective compensatory effect in response to ER stress³³. We have observed by confocal microscopy analysis that GRP78 localization in platelets appears to be dependent on stimulation by shear rate and collagen. Platelet membrane GRP78 expression was stronger in resting platelets than in effluent platelets, suggesting that upon shear-induced activation surface GRP78 could have been either partially released or translocated inside the platelet. Interestingly, rosuvastatin-treated platelets maintained surface GRP78 expression in sheared platelets, probably indicating inhibition of shear-induced translocation of GRP78. This effect was also observed by 2-DE and western blot, as GRP78 expression was significantly increased in the urea-enriched fraction. It is important to note that the urea-enriched fraction not only contains the external membrane fraction but also the cytoskeleton fraction, which may account for the slightly different GRP78 patterns observed by 1- and 2-DE and confocal microscopy in sheared platelets.

In vivo rosuvastatin treatment in normocholesterolemic animals also increased platelet GRP78 –both cytoplasmic and membrane fractions-, thus suggesting a possible effect on megakaryocytes that is transmitted to the platelets. Further research in this area seems warranted. In line with these findings, it has been recently shown that statins activate the unfolded protein response and induce protective GRP78 expression in macrophages³⁴, through a mechanism involving c-Src, PKC, ERK, and p38MAPK. In their work, Chen et al suggested that statins could

also induce GRP78 expression independently of mevalonate by mobilizing Ca^{2+} stores other than those of the ER³⁴.

GRP78 provides dual functions either in the ER or on the cell membrane where it has multiple binding partners. Here we show that blockade of GRP78 in flow experiments markedly increased platelet deposition on collagen and significantly reduced clotting time, supporting a protective role of surface GRP78. Rosuvastatin was able to partially inhibit the increase in platelet deposition induced by GRP78 blockade indicating that it exerts additional protective functions besides translocating GRP78 to the membrane.

Cell-surface associated GRP78 has been speculated to serve a protective role by inhibiting TF through direct binding to the endothelium overlying the plaque^{35,36}.

Interestingly, we have shown that platelet GRP78 actively interacted with TF.

Moreover, confocal analysis of adhered and effluent platelets showed a greater degree of colocalization of GRP78 and TF in rosuvastatin treated platelets. The inhibitory effect of rosuvastatin in thrombus growth might be attributed in part to a reduced TF activity due to direct binding of surface GRP78 to TF. The role of surface GRP78 on thrombus growth could be related to its ability to attenuate TF activity or might be attributed to additional unknown mechanisms directly involved in platelet activation, which will require future studies.

In summary, our data indicate that rosuvastatin inhibits platelet deposition under flow conditions and maintains platelet surface GRP78 in shear-activated platelets. Our results also show that GRP78 interacts with TF blocking its function and that GRP78 blockade increases platelet deposition and reduces clotting time, suggesting a protective effect of GRP78 against thrombus formation.

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. The authors want to thank Monica Pescador and Olaya Garcia for their technical help. This work has been possible thanks to funds provided by the Ministry of Science and Education of Spain (PNS 2006/10091), Ministry of Health- Instituto Salud Carlos III (CIBEROBN-CB06/03), and Fundacion Jesus Serra. BM is a recipient of a fellowship from the Catalan Government (FI2005).

AUTHORSHIP

Contribution: **BM** performed research, collected data, analyzed and interpreted the data, performed statistical analysis, and wrote the manuscript; **EP** performed research, collected data, and analyzed and interpreted data; **LC** performed research and helped in the collection of the data; **TP** and **CM** helped in the collection of data and analyzed and interpreted data; **LB**: Designed research, analyzed and interpret the data, and wrote the manuscript.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Prof. Lina Badimon, Cardiovascular Research Center, St. Sant Antoni M^a Claret 167, 08025 Barcelona, Spain. e-mail: lbadimon@csic-iccc.org

REFERENCES

1. Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS). *Circulation*. 1998;97:1440-1445.
2. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet*. 1994;344:1383-1389.
3. Ridker PM, Danielson E, Fonseca FA, et al. Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein. *N Engl J Med*. 2008;359:2195-2207.
4. Badimon L, Chesebro JH, Badimon JJ. Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi. *Circulation*. 1992;86:III74-85.
5. Maron DJ, Fazio S, Linton MF. Current perspectives on statins. *Circulation*. 2000;101:207-213.
6. Vaughan CJ, Murphy MB, Buckley BM. Statins do more than just lower cholesterol. *Lancet*. 1996;348:1079-1082.
7. Brown JH, Del Re DP, Sussman MA. The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits. *Circ Res*. 2006;98:730-742.
8. Laufs U. Beyond lipid-lowering: effects of statins on endothelial nitric oxide. *Eur J Clin Pharmacol*. 2003;58:719-731.
9. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*. 2001;81:153-208.
10. Laufs U, Liao JK. Targeting Rho in cardiovascular disease. *Circ Res*. 2000;87:526-528.
11. Takemoto M, Sun J, Hiroki J, Shimokawa H, Liao JK. Rho-kinase mediates hypoxia-induced downregulation of endothelial nitric oxide synthase. *Circulation*. 2002;106:57-62.
12. Kwak BR, Mulhaupt F, Mach F. Atherosclerosis: anti-inflammatory and immunomodulatory activities of statins. *Autoimmun Rev*. 2003;2:332-338.
13. Broijersen A, Eriksson M, Leijd B, Angelin B, Hjerdahl P. No influence of simvastatin treatment on platelet function in vivo in patients with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1997;17:273-278.
14. Szczeklik A, Musial J, Undas A, et al. Inhibition of thrombin generation by simvastatin and lack of additive effects of aspirin in patients with marked hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:1286-1293.
15. 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;295:1556-1565.
16. Lawrence MB, McIntire LV, Eskin SG. Effect of flow on polymorphonuclear leukocyte/endothelial cell adhesion. *Blood*. 1987;70:1284-1290.
17. 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;28:2239-2246.
18. Molloy MP, Herbert BR, Walsh BJ, et al. Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis*. 1998;19:837-844.
19. 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.
20. Crosby D, Poole AW. Physical and functional interaction between protein kinase C delta and Fyn tyrosine kinase in human platelets. *J Biol Chem.* 2003;278:24533-24541.
21. Xiong Y, Westhead EW, Slakey LL. Role of phosphodiesterase isoenzymes in regulating intracellular cyclic AMP in adenosine-stimulated smooth muscle cells. *Biochem J.* 1995;305 (Pt 2):627-633.
22. Hendershot LM. The ER function BiP is a master regulator of ER function. *Mt Sinai J Med.* 2004;71:289-297.
23. Lee AS. The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications. *Trends Biochem Sci.* 2001;26:504-510.
24. Lee AS. The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress. *Methods.* 2005;35:373-381.
25. Davidson DJ, Haskell C, Majest S, et al. Kringle 5 of human plasminogen induces apoptosis of endothelial and tumor cells through surface-expressed glucose-regulated protein 78. *Cancer Res.* 2005;65:4663-4672.
26. Misra UK, Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Hart JP, Johnson CE, Pizzo SV. The role of Grp 78 in alpha 2-macroglobulin-induced signal transduction. Evidence from RNA interference that the low density lipoprotein receptor-related protein is associated with, but not necessary for, GRP 78-mediated signal transduction. *J Biol Chem.* 2002;277:42082-42087.
27. Misra UK, Gonzalez-Gronow M, Gawdi G, Wang F, Pizzo SV. A novel receptor function for the heat shock protein Grp78: silencing of Grp78 gene expression attenuates alpha2M*-induced signalling. *Cell Signal.* 2004;16:929-938.
28. Rao RV, Peel A, Logvinova A, et al. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett.* 2002;514:122-128.
29. Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem.* 2003;278:20915-20924.
30. Delpino A, Castelli M. The 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78/BIP) is expressed on the cell membrane, is released into cell culture medium and is also present in human peripheral circulation. *Biosci Rep.* 2002;22:407-420.
31. Liu C, Bhattacharjee G, Boisvert W, Dilley R, Edgington T. In vivo interrogation of the molecular display of atherosclerotic lesion surfaces. *Am J Pathol.* 2003;163:1859-1871.
32. Zhou J, Werstuck GH, Lhotak S, et al. Association of multiple cellular stress pathways with accelerated atherosclerosis in hyperhomocysteinemic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation.* 2004;110:207-213.
33. Feaver RE, Hastings NE, Pryor A, Blackman BR. GRP78 upregulation by atheroprone shear stress via p38-, alpha2beta1-dependent mechanism in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2008;28:1534-1541.
34. Chen JC, Wu ML, Huang KC, Lin WW. HMG-CoA reductase inhibitors activate the unfolded protein response and induce cytoprotective GRP78 expression. *Cardiovasc Res.* 2008.
35. Watson LM, Chan AK, Berry LR, et al. Overexpression of the 78-kDa glucose-regulated protein/immunoglobulin-binding protein (GRP78/BiP) inhibits tissue factor procoagulant activity. *J Biol Chem.* 2003;278:17438-17447.

36. Bhattacharjee G, Ahamed J, Pedersen B, et al. Regulation of tissue factor--mediated initiation of the coagulation cascade by cell surface grp78. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25:1737-1743.

TABLES

Table 1. Summary of differentially expressed spots with rosuvastatin treatment

	Protein Name	Fraction	Rosuvastatin-induced change
1	HSP70	Tris-soluble	↑
2	HSP70	Tris-soluble	↑
3	GRP78	Tris-soluble	↓
		Urea-soluble	↑
4	β actin	Tris-soluble	↑
5	albumin	Tris-soluble	↓
6	albumin	Tris-soluble	↓
		Urea-soluble	↑
7	NMHC-9	Urea-soluble	↓
8	NMHC-9	Tris-soluble	↓
9	vinculin	Urea-soluble	↑
10	Not identified	Tris-soluble	↓
11	Not identified	Tris-soluble	↓
12	Not identified	Tris-soluble	↑
13	Not identified	Urea-soluble	↑
14	Not identified	Urea-soluble	↑
15	Not identified	Urea-soluble	↑
16	Not identified	Urea-soluble	↑

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Effect of rosuvastatin on platelet deposition and thrombus height.

(A): Mean platelet deposition at low wall shear rate. Results are expressed as mean values of surface covered by platelets per field analyzed ($\mu\text{m}^2/\text{field}$) \pm SEM. (B): Thrombus height at 250 s^{-1} . Results are expressed as mean values of the two biggest aggregates observed in the proximal zone (μm) \pm SEM. Statistical analysis was performed by analysis of ANOVA (* $P < 0.01$). (C): Mean platelet deposition at 250 s^{-1} and 1500 s^{-1} . Results are expressed as mean values of surface covered by platelets per field analyzed ($\mu\text{m}^2/\text{field}$) \pm SEM. Different conditions were performed at least 3 times in each animal and 4 animals of each treatment were assessed.

Figure 2. Rosuvastatin-induced modifications in the proteomic profile of sheared platelets.

(A): Protein spots in 2-DE gels of the tris-soluble subproteome (cytosol-enriched fraction). (B): Protein spots in 2-DE gels of the urea/detergent-soluble subproteome (membrane and cytoskeleton-enriched fraction).

Figure 3. Effect of rosuvastatin on GRP78 expression in platelets by 2-DE and 1-DE.

(A): Enlarged images of region 3 of 2-DE gels containing spots identified as GRP78. (B): Percentage of change in the intensity of the 3 spots identified as GRP78 in sheared platelets treated with rosuvastatin. (C): Percentage of change in the global intensity of GRP78 in sheared platelets treated with rosuvastatin. (D): Western blot analysis of GRP78 in urea-detergent soluble fraction of sheared and unsheared platelets. Results are expressed as arbitrary units (AU) normalized by β -actin \pm SEM (n=3). Statistical analysis was performed by analysis of ANOVA (* $P < 0.05$).

Figure 4. Effect of rosuvastatin on GRP78 distribution on human platelets.

Representative confocal images of platelet surface GRP78. Platelets were immobilized on poly-L-lysine-coated coverslides and stained with a mouse FITC-

CD61 antibody (green) and a goat GRP78 antibody and an Alexa Fluor 633 antibody (red). Fluorescent images were acquired in a spatial data set (acquiring z-sections) and the maximum intensity projection was created. The maximum projection was linearly filtered to smooth edges and suppress noise and adjusted for brightness and contrast. **(I)**: Control unsheared platelets. **(II)**: Control sheared platelets (1500 s^{-1}). **(III)**: Rosuvastatin ($8 \mu\text{M}$) sheared platelets. Scale bar is $1 \mu\text{m}$.

Figure 5: Effect of *in vivo* rosuvastatin treatment in GRP78 expression of resting platelets. **(A)**: Western blot analysis of GRP78 from platelet lysates of control and rosuvastatin-treated animals. **(B)**: Western blot analysis of membrane and cytosolic GRP78 of control and rosuvastatin-treated animals. Results are expressed as arbitrary units (AU) normalized by β -actin \pm SEM ($n=3$). Statistical analysis was performed by analysis of ANOVA ($*P<0.05$).

Figure 6. Effect of blocking GRP78 on platelet deposition and GRP78 interaction with TF. **(A)**: Human heparinized blood was incubated with GRP78 antibody or goat IgG (control) prior rosuvastatin treatment and perfused for 3 min at 1500 s^{-1} . Results are expressed as mean values of surface covered by platelets per field analyzed ($\mu\text{m}^2/\text{field}$) \pm SEM. Statistical analysis was performed by analysis of ANOVA ($*P<0.0001$ vs. control and rosuvastatin; $**P<0.05$ vs. control, GRP78 blockade, and GRP78+rosuvastatin; $\#P<0.05$ vs. all). Different conditions were performed at least twice in each subject and 4 subjects of each treatment were assessed. **(B)**: Western blot of TF expression on GRP78 immunoprecipitated fractions of human platelets. (a) GRP78 immunoprecipitate of platelet membrane lysate, (b) GRP78 immunoprecipitate of total platelet lysate, (c) non-GRP78 immunoprecipitated platelet lysate (which corresponds to the GRP78-unbound fraction), (d) platelet lysate. **(C)**: Colocalization analysis of GRP78 and TF in effluent

human platelets. Immunofluorescence micrograph of control (i) and rosuvastatin-treated (ii) effluent platelets. Fluorescent images were acquired in a spatial data set (acquiring z-sections) and the maximum intensity projection was created. The maximum projection was linearly filtered to smooth edges and suppress noise and adjusted for brightness and contrast. Red: GRP78; green: TF; yellow: merge. Scale bar is 1 μm .

Figure 7. Immunofluorescence confocal analysis of GRP78 and TF

colocalization in adhered platelets. **(Ai)** Immunofluorescence micrograph of control platelets adhered to the collagen surface. **(Aii)** Enlarged image (x2) of Ai. **(Aiii)** Cytofluorogram of GRP78 and TF colocalization of control adhered platelets. **(Bi)** Immunofluorescence micrograph of platelets treated with rosuvastatin (8 μM). **(Bii)** Enlarged image (x2) of Bi. **(Biii)** Cytofluorogram of GRP78 and TF colocalization of treated adhered platelets treated with rosuvastatin. Red: GRP78; green: TF; yellow: merge.

FIGURE 1

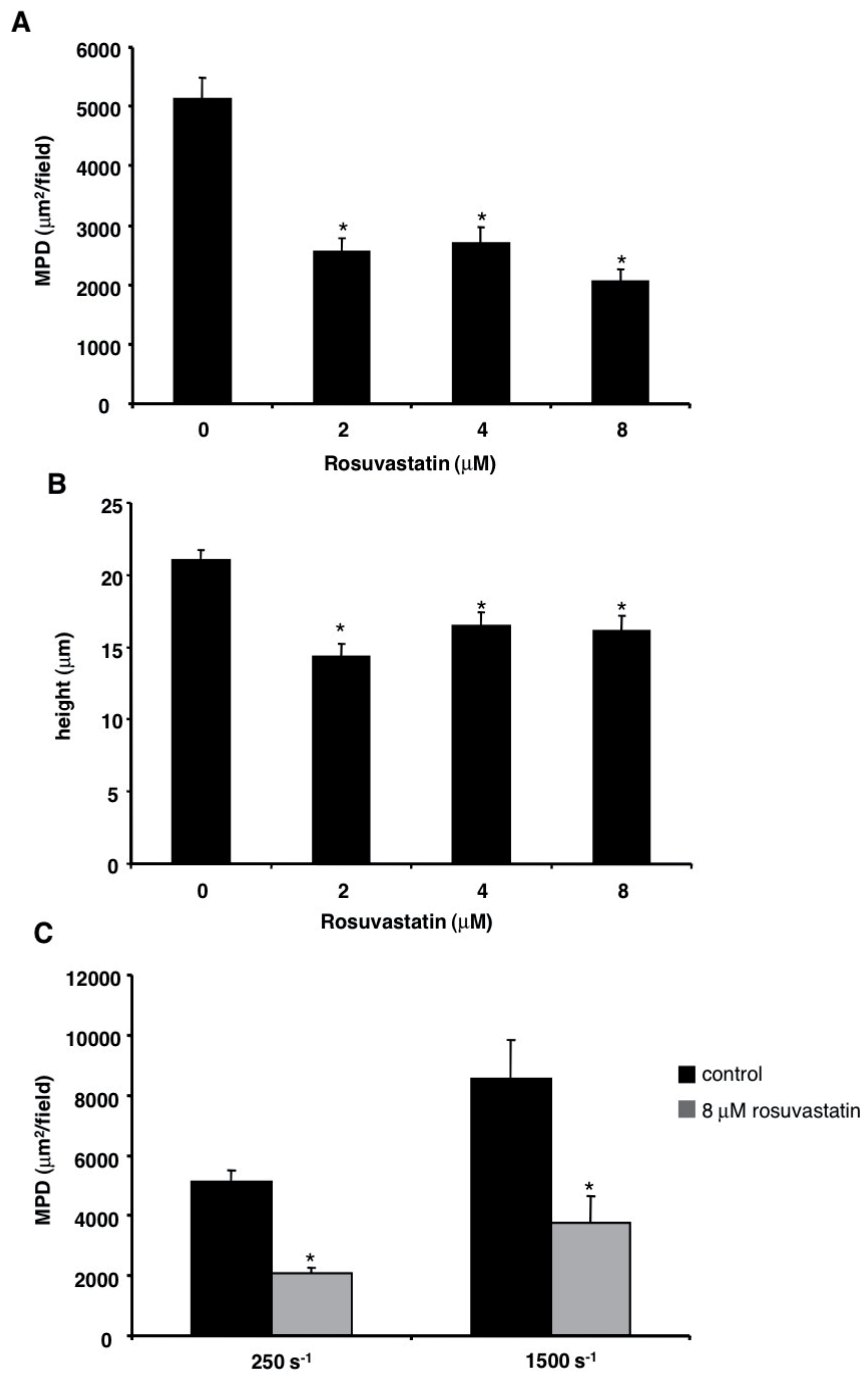


FIGURE 2

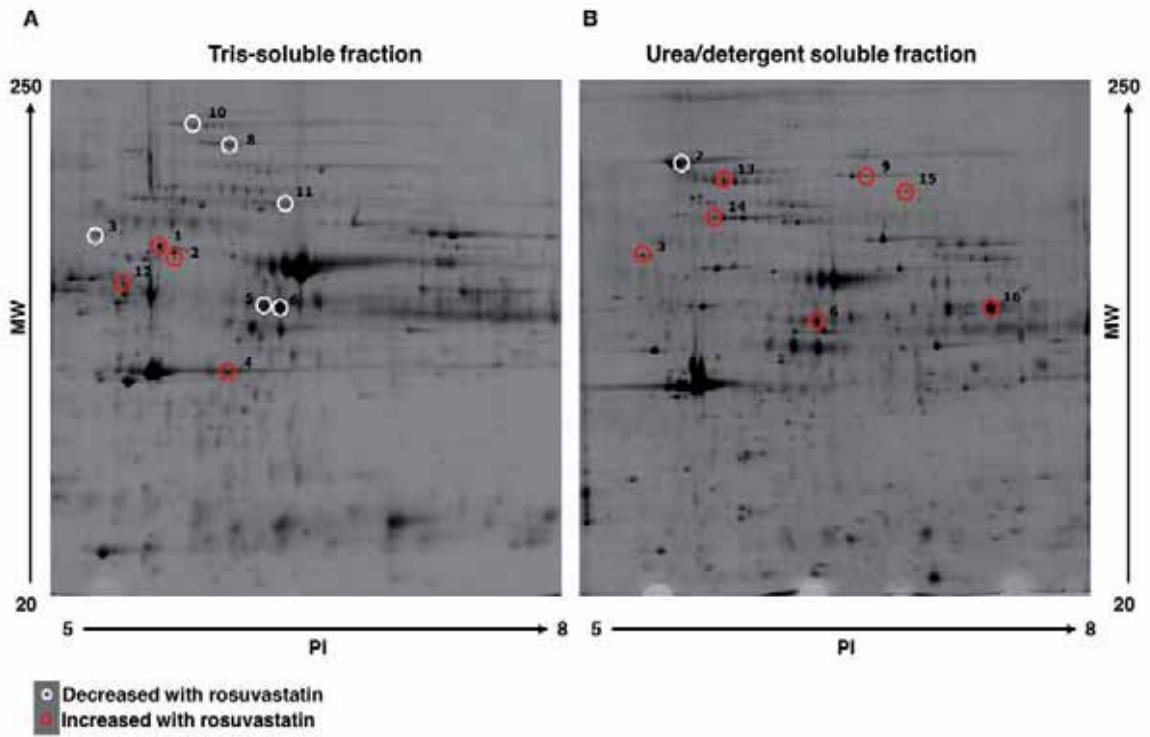


FIGURE 3

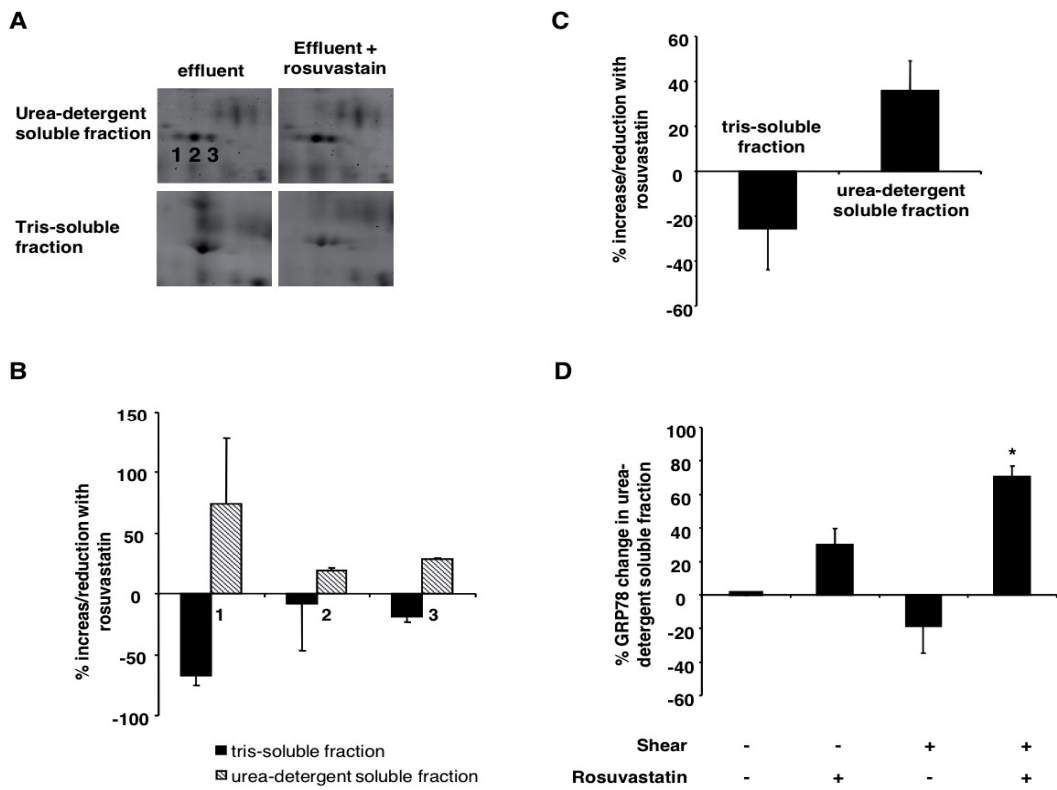


FIGURE 4

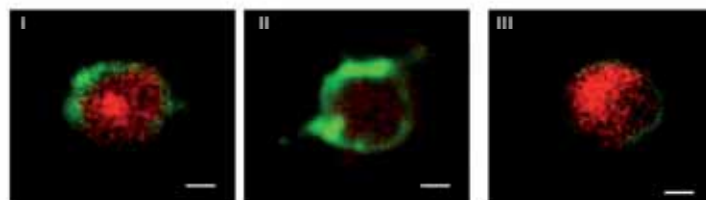
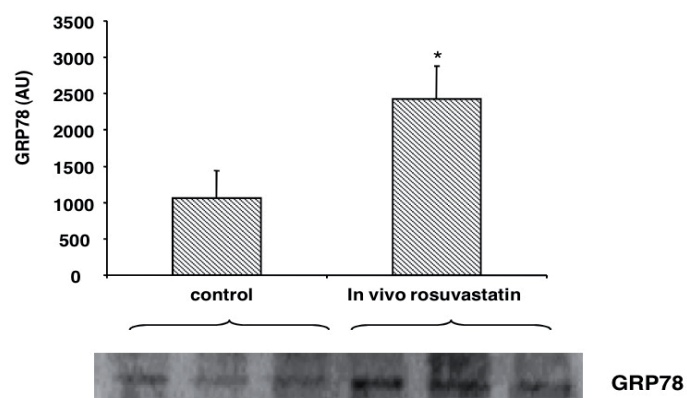


FIGURE 5

A



B

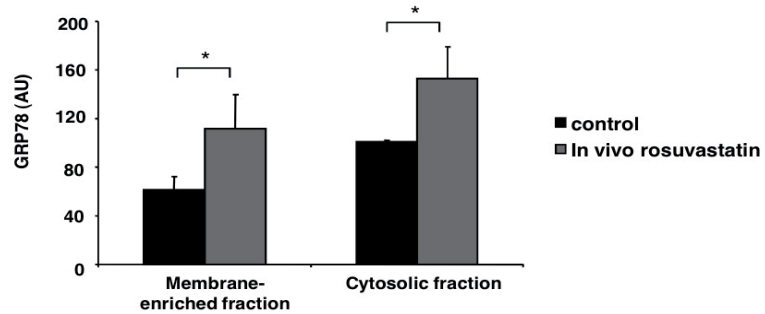


FIGURE 6

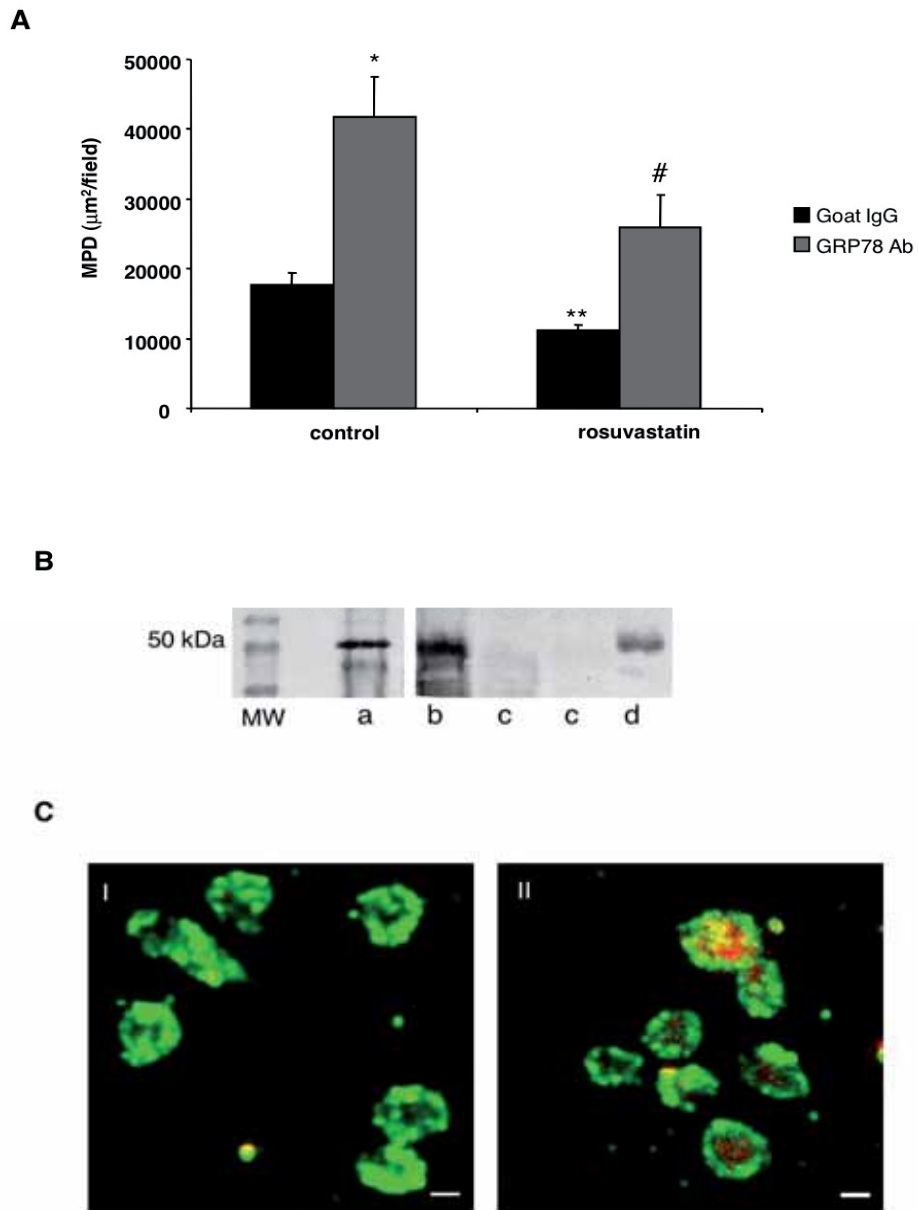
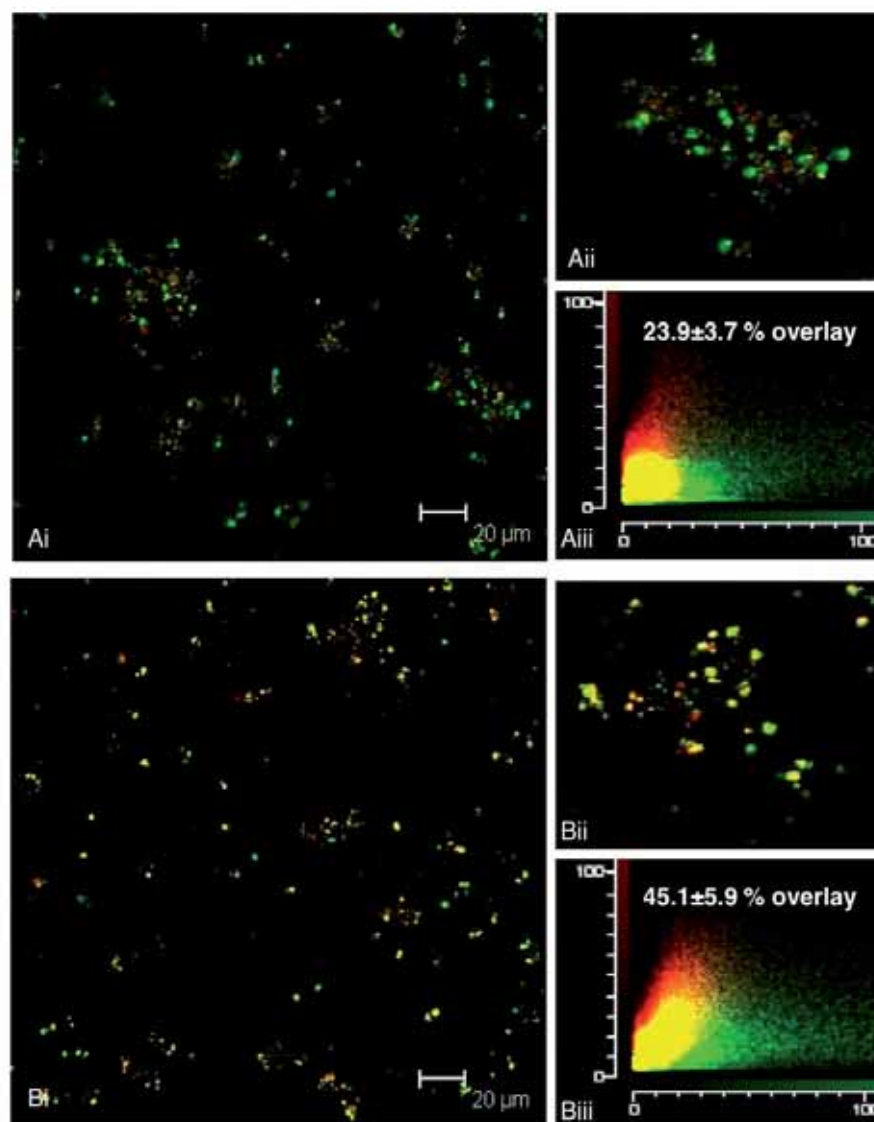


FIGURE 7



La Dra. Lina Badimon i el Dr. Carlos Mendieta, com codirectors de tesi de la doctoranda Blanca Molins Monteys certifiquen que la contribució de la doctoranda als articles presentats en aquesta tesi ha estat la següent:

A la publicació "*C-Reactive Protein Isoforms Differ in Their Effects on Thrombus Growth*" a la revista **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology** la realització dels experiments que configuren les figures 1, 2, 3, 4, 5, 6, sI, sII, així com la redacció de l'article.

A la publicació "*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*" a la revista **Journal of Thrombosis and Haemostasis** la realització dels experiments que configuren les figures 2, 5, 6 així com la participació en la redacció de l'article.

A la publicació "*Protective role of GRP78 on platelets: effect of rosuvastatin on platelet deposition*" pendent d'enviament la realització dels experiments que configuren les figures 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, així com la redacció del manuscrit.

A més, certifiquen que cap d'aquestes publicacions ha estat utilitzada en cap altra tesi doctoral.

Signat,

Lina Badimon

Carlos Mendieta

DISCUSSIÓ

Les complicacions trombòtiques són la principal causa de mortalitat i morbiditat en pacients amb aterosclerosi i malalties cardiovasculars en general. L'aterotrombosi és una malaltia inflamatòria crònica, dinàmica i progressiva, on hi contribueixen la disfunció endotelial, la inflamació i la trombosi subsegüent. La seva evolució silent es prorroga, en la majoria dels casos, durant anys en els quals la llum arterial va disminuint degut a l'acumulació lipídica de les cèl·lules escumoses a la paret. La formació del trombe en les zones de ruptura de la placa ateroscleròtica és el fenomen responsable de la majoria de síndromes coronàries, en un procés principalment regulat per adhesió, activació i agregació plaquetària. La primera resposta al dany vascular consisteix en l'adhesió plaquetària a la paret vascular o als components tissulars exposats i està regulada per interaccions dependents del flux sanguini que tenen una influència clau en el creixement subsegüent del trombe, sovint derivant en complicacions clíniques (Badimon et al. 1992).

El procés ateroscleròtic en si mateix, així com les seves complicacions trombòtiques són una font important d'estímuls inflamatoris (Ross 1999; Libby 2002). No obstant, s'ha postulat l'existència de fonts inflamatòries alternatives. De fet, resultats procedents de diversos estudis cas-control i estudis longitudinals han suggerit una correlació positiva entre la malaltia coronària i la malaltia periodontal (Bahekar et al. 2007). Els esmentats estudis, així com el consens sobre el caràcter inflamatori de l'arterioesclerosi han despertat un interès creixent en l'estudi de la relació entre la infecció oral i la patogènesi de la malaltia cardiovascular arterioescleròtica (Padró et al. 2005). Així, s'ha reportat que nivells elevats de mediadors inflamatoris associats a la malaltia aterotrombòtica com la CRP i el fibrinogen estan associats també amb malaltia periodontal (Graves et al. 2003; Hettne et al. 2007).

D'altra banda, també s'ha descrit que el teixit miocàrdic necròtic contribueix a l'alliberament de citocines inflamatòries que indueixen la producció hepàtica de CRP. Nivells alts de CRP en sèrum s'han vinculat al grau de necrosi miocàrdica en pacients amb infart de miocardi amb elevació del segment ST (Cusack et al. 2002). De fet, dades epidemiològiques afirmen la relació proporcional entre nivells elevats de CRP amb un major risc de patir malalties cardiovasculars en persones aparentment sanes i amb un major risc de recurrència de futurs events cardiovasculars (Ridker et al. 1997; Ridker et al. 2002; Blake et al. 2003). A més d'aquest valor diagnòstic, nombrosos resultats d'estudis *in vitro* i *in vivo* en models clínics i experimentals recolzen el paper de la CRP en el desenvolupament de la malaltia cardiovascular. No obstant, el paper de la CRP com a modulador d'inflamació i trombosi és controvertit, ja que se li han atribuït propietats anti- i

pro-inflamatòries i anti- i pro-trombòtiques (Vigo 1985; Xia et al. 1997; Zouki et al. 1997; Danenberg et al. 2003; Paul et al. 2004; Kovacs et al. 2007). Per explicar les aparents activitats contradictòries de CRP s'ha proposat la coexistència de dues isoformes de CRP amb diferents propietats i bioactivitats. En aquest treball s'ha demostrat que la forma nativa de CRP (natCRP) no exerceix cap efecte sobre el creixement del trombe ni sobre l'activació plaquetària. En canvi, la forma monomèrica associada a teixit (mCRP) presenta un fenotip protrombòtic, ja que indueix l'activació plaquetària i el creixement del trombe en condicions de flux arterial elevades.

Clínicament, els nivells plasmàtics de CRP associats a risc cardiovascular són superiors a 3 µg/mL, mentre que nivells superiors a 10 µg/mL estan normalment atribuïts a altres causes com infecció aguda o inflamació. Per aquesta raó, en els nostres experiments es van fer servir concentracions d'entre 1 i 25 µg/mL. Interessantment, mCRP va demostrar ésser capaç d'incrementar la formació del trombe en concentracions superiors a 1 µg/mL, el que coincideix amb les concentracions que prediuen risc cardiovascular.

mCRP, a diferència de natCRP, no només va incrementar l'adhesió, sinó també el tamany dels agregats i l'alçada dels trombes. Aquestes observacions recolzen la participació de mCRP en les interaccions plaqueta-plaqueta, fenomen responsable en el creixement del trombe i en la subsegüent oclusió trombòtica. En aquest sentit, vam observar que mCRP també induïa l'expressió de P-selectina, la qual ha demostrat estabilitzar els agregats plaqueta-plaqueta i plaqueta-leucòcit (Merten et al. 2000). De fet, l'anàlisi per citometria de flux també va demostrar l'augment de P-selectina produït per mCRP a l'activar les plaquetes amb col·lagen i ADP. No obstant, mCRP no va afectar l'expressió de CD63 (un altre marcador d'activació) a la superfície plaquetària ni va activar GPIIb/IIIa, suggerint que mCRP indueix l'activació plaquetària per excitació de grànuls α i l'alliberament d'agonistes plaquetars. Contràriament a resultats d'estudis anteriors (Khreiss et al. 2004b), els efectes de mCRP no van resultar ésser dependents del receptor Fc γ RIII (CD16). En canvi, els resultats d'immunofluorescència de plaquetes efluentes suggereixen que CD36, receptor de proteïnes agregades (Herczenik et al. 2007) entre d'altres lligands, podria mediar els efectes de mCRP en l'activació plaquetària. De totes maneres, calen més estudis que aclareixin el paper de mCRP en els mecanismes de senyalització relacionats amb l'activació plaquetària.

natCRP, en canvi, no va afectar ni l'adhesió plaquetària ni el creixement del trombe. De fet, concentracions elevades de natCRP inclús van produir una reducció del

tamany dels agregats plaquetars formats, el que concorda amb l'efecte inhibidor de l'agregació plaquetària descrit en estudis anteriors (Vigo 1985).

Diverses bioactivitats de CRP han resultat ésser dependents de calci (Danenberg et al. 2007). Per aquest motiu es va fer servir heparina sòdica en lloc d'altres anticoagulants quelants de calci. Com s'ha comentat anteriorment, estudis recents han qüestionat la validesa d'estudis *in vitro* amb CRP. Les preparacions comercials de CRP poden estar contaminades amb azida sòdica o LPS i al dialitzar-les, lliures d'aquests factors, es perden molts dels efectes de la CRP prèviament reportats (van den Berg et al. 2004; Taylor et al. 2005). Per eliminar aquests factors es van fer servir dues preparacions comercials diferents i, a més, en experiments de perfusió fets en presència de tampó control, no es va observar cap efecte en l'adhesió plaquetària.

Aquests resultats obren la possibilitat de que l'augment de resposta trombòtica induïda per dany arterial i l'increment d'agregats monòcit-plaqueta en ratolins CRPtg (Danenberg et al. 2003; Danenberg et al. 2007), podrien estar atribuïts a diferents isoformes de CRP, i no a natCRP. De fet, les nostres observacions concorden amb els efectes oposats de natCRP i mCRP sobre la formació d'agregats neutròfil-plaqueta descrits per Khreiss i els seus col·laboradors (Khreiss et al. 2004b). En línia amb aquests resultats, mCRP ha demostrat ésser més proinflamatòria que natCRP en cèl·lules endotelials i neutròfils (Khreiss et al. 2004a; Khreiss et al. 2005). Paradòxicament, no obstant, s'ha reportat que natCRP indueix i mCRP redueix l'aterosclerosi en ratolins ApoE^{-/-} (Schwedler et al. 2005). Aquests resultats no són necessàriament contradictoris amb les nostres observacions, perquè Schwedler i col·laboradors van estudiar l'efecte de les isoformes de CRP en un model d'aterosclerosi inicial i van dissenyar un model de dosificació baixa de mCRP en un període llarg de temps, el que podria haver produït un augment de la vigilància immunitària, atenuant el procés de formació de la placa ateroscleròtica. En canvi, el nostre treball estava dirigit a estudiar l'efecte directe de natCRP i mCRP en les complicacions trombòtiques desencadenades per la ruptura de la placa ateroscleròtica.

Es desconeix com mCRP regula l'activació de la plaqueta. La presència de CRP observada a la superfície plaquetària i dins l'estructura tridimensional dels trombes formats en presència de CRP suggereix una interacció directa i estable plaqueta-CRP. Quan natCRP es dissocia en les seves subunitats es genera la forma monomèrica de CRP, amb una pèrdua d'estructura secundària predominant de làmines β i un augment d'hèlix α (Khreiss et al. 2002), formant agregats insolubles, que podrien explicar la diferent distribució de natCRP i mCRP en l'estructura del trombe. La diferent distribució observada en l'estructura

del trombe podria atribuir-se a una interacció més forta de la isoforma monomèrica comparat amb la isoforma nativa. Tot i aixó, és important remarcar que existeix certa controvèrsia sobre l'afinitat de l'anticòs anti-CRP-clon 8 utilitzat en els nostres estudis. Segons el fabricant, l'anticòs reconeix ambdues isoformes, mentre que en un estudi (Schwedler et al. 2003) es va demostrar que l'anticòs reconeixia preferentment la isoforma monomèrica de CRP. D'altra banda, natCRP podria unir-se a la fosfocolina present a la superfície de les plaquetes activades. S'ha demostrat que les membranes cel·lulars dissocien natCRP formant un intermedi estructural, mCRP(m), que pot desprendre's de la membrana per formar mCRP (Ji et al. 2007). Recentment s'ha demostrat que cèl·lules apoptòtiques i plaquetes activades presents en lesions ateroscleròtiques poden dissociar natCRP en mCRP, en un procés mediat per l'exposició de lisofosfatidilcolina a la superfície de plaquetes activades (Eisenhardt et al. 2009). No obstant, aquesta dissociació té lloc en temps més llargs que el del nostre disseny experimental, amb el que és poc probable que natCRP s'hagués dissociat a la superfície de les plaquetes adherides al col·lagen. Així doncs, no està clar si la tinció amb l'anticòs anti-CRP-clon 8 a la superfície de les plaquetes adherides demostra la presència de mCRP, natCRP o l'intermedi mCRP(m). De totes maneres, les plaquetes adherides preincubades amb natCRP van ésser positives amb l'anticòs anti-CRP-clon 8 i negatives per mCRP amb l'anticòs anti-mCRP-clon 8C10, suggerint la manca de presència de mCRP en les mostres tractades amb natCRP.

L'efecte protrombòtic de mCRP es va demostrar no només quan mCRP es trobava en forma circulant (al afegir-la directament a la sang), sinó també quan es trobava immobilitzada amb el substrat de col·lagen, component abundant de les lesions ateroscleròtiques. Tot i que s'ha confirmat la presència de ARNm de CRP a la placa ateroscleròtica (Jabs et al. 2003; Krupinski et al. 2006), es desconeix si es tracta de la forma monomèrica o nativa de CRP. És probable que la ruptura de la placa resulti també en l'exposició de mCRP als components sanguinis, donant lloc a la formació del trombe. Alternativament, la inflamació en si mateixa podria donar lloc a la formació de mCRP a partir de la forma nativa circulant, lligant així inflamació i trombosi. De fet, aquestes observacions recolzen el fet que la presència de CRP a la sang per si mateixa no està associada amb agregació plaquetària, però és concebible que mCRP, igual que en el teixit, pugui ésser un factor desencadenant dels processos trombòtics.

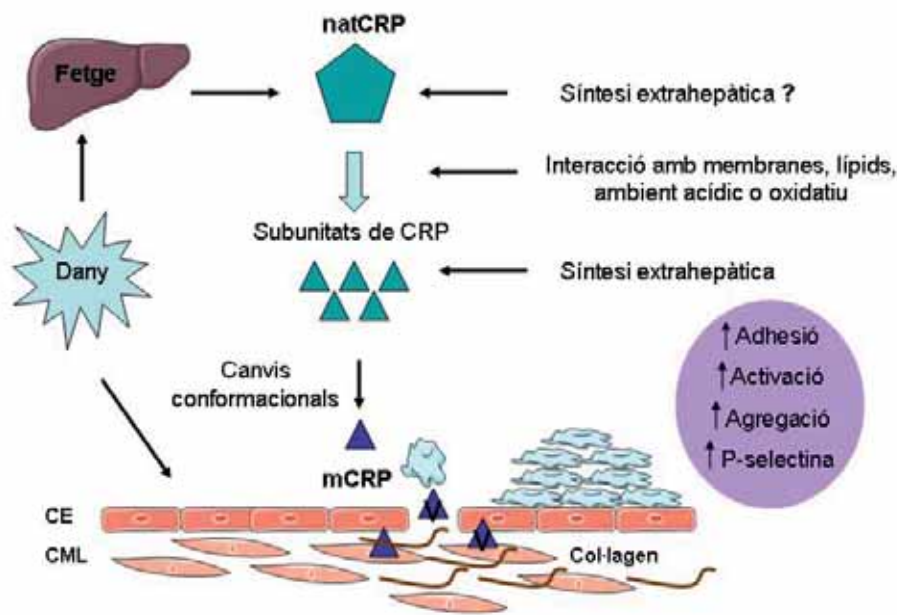


Figura 28. Esquema de la formació de mCRP i el seu potencial mecanisme en la formació del trombe. mCRP (triangles) podria generar-se localment a la paret vascular després del dany endotelial o bé originar-se extrahepàticament (com al teixit cardíac). Alternativament, un entorn inflamatori o oxidatiu podria produir la formació de mCRP a partir de la forma nativa circulant. natCRP es produeix principalment al fetge en resposta a la inducció de citocines proinflamatòries com IL-6, IL-1 β o TNF- α . La ruptura de la placa podria provocar l'exposició de mCRP als components sanguinis, donant lloc a una major activació i adhesió plaquetàries, provocant així la formació del trombe.

Tanmateix, en aquest treball hem demostrat que temps curts d'isquèmia miocàrdica provoquen un augment d'expressió de mCRP al teixit cardíac. En aquest context, també podria ésser possible que l'exposició de mCRP cardíaca als components sanguinis desencadenés una major reactivitat plaquetària i una major resposta inflamatòria a la microcirculació, o que l'ambient inflamatori produït per la isquèmia provoqués la formació de mCRP a partir de la forma nativa circulant. En aquest sentit, vam observar que la isquèmia miocàrdica induïa l'expressió de CRP, en un model d'infart sense aterosclerosi. La isquèmia va desencadenar una resposta inflamatòria local i sistèmica, convertint les plaquetes més susceptibles a l'activació i provocant una major adhesió plaquetària.

De fet, 90 min d'oclusió coronària van resultar en un augment d'expressió cardíaca de TNF- α , IL-6 i mCRP, nivells més elevats de citocines proinflamatòries circulants, un augment d'expressió de COX-2, MCP-1 i TF en cèl·lules mononuclears perifèriques i un

increment d'adhesió plaquetària a col·lagen *in vitro* en condicions de flux. A més, vam detectar que els macròfags infiltrats al teixit cardíac expressaven mCRP. No obstant, els resultats observats no descarten l'expressió de mCRP per part d'altres cèl·lules cardíques o infiltrades.

La inducció temprana de citocines proinflamatòries en el miocardi perinecròtic deguda a la isquèmia va contribuir probablement al reclutament de macròfags per la síntesi de citocines. Es va detectar un augment concomitant dependent del temps d'oclusió de citocines circulants. Una vegada al miocardi, es va induir l'expressió de mCRP per part dels macròfags. Cal dir però, que els nivells sistèmics de CRP no van variar al llarg del temps d'oclusió. La síntesi hepàtica de CRP està regulada principalment per IL-6. Caldria esperar doncs, que un augment d'IL-6 precedís la síntesi hepàtica de CRP. La inducció hepàtica de CRP té un pic d'expressió a les 48 h i transcorre un temps de 10 h des de l'inici de la síntesi de CRP i el moment en que els nivells de CRP en sèrum són mesurables. L'experiment va tenir una durada de 90 min per poder analitzar l'efecte de la isquèmia sense reperfusió, el que explica que no s'observessin diferències en els nivells de CRP al llarg de l'estudi.

La resposta inflamatòria resultant de l'oclusió coronària va produir un efecte sobre les plaquetes, fent-les més susceptibles a l'activació, tot i que els animals estaven pretractats amb clopidogrel. La hipereactivitat plaquetària associada a la isquèmia es va confirmar a nivell funcional i molecular. L'adhesió plaquetària a col·lagen en condicions de flux (1500 s^{-1}) en els experiments amb la cambra de perfusió va augmentar significativament amb el temps d'oclusió coronària. A més, el nivell de translocació de RhoA a la membrana plaquetària també va augmentar significativament amb el temps d'isquèmia. Cal dir que les plaquetes activades no només promouen adhesió i agregació, sinó que també acceleren i realcen la resposta inflamatòria inicial (Gawaz 2004).

D'altra banda, múltiples resultats clínics suggereixen que els efectes beneficiosos de les estatines poden estar relacionats amb factors que van més enllà de la reducció sistèmica de colesterol.

En aquest sentit, hem demostrat que la rosuvastatina, en un model de normolipèmia *in vitro*, redueix la interacció plaqueta-col·lagen en condicions de flux. L'anàlisi post-perfusió amb microscopia confocal va demostrar que la rosuvastatina, a dosis terapèutiques, inhibia l'adhesió plaquetària a velocitats de cisalla arterial (1500 s^{-1}) i venosa (250 s^{-1}). Amb l'objectiu d'identificar nous efectes protectors de les estatines es va abordar l'estudi proteòmic de plaquetes perfundides tractades amb i sense rosuvastatina.

En aquest aspecte, vam identificar per primera vegada a la literatura que les plaquetes contenen GRP78 a la membrana i al citoplasma i que, en activar-se les plaquetes, disminueix el seu contingut a la membrana. Aquest efecte és bloquejat per la rosuvastatina, que manté GRP78 a la membrana en plaquetes activades amb velocitat de cisalla arterial.

GRP78 és una proteïna majoritària del RE i juga un paper primordial en la homeòstasi del RE. GRP78 és una chaperona implicada en molts processos cel·lulars, que inclouen la translocació de nous pèptids sintetitzats a través de la membrana del RE, facilitant el plegament i ensamblatge de noves proteïnes sintetitzades, reconeixent polipèptids mal plegats i prevenint l'agregació intra- o intermolecular, regulant la homeòstasi del calci i actuant de sensor d'estrès del RE (Lee 2001; Hendershot 2004; Lee 2005). Al ésser una chaperona de RE, tradicionalment s'ha cregut que GRP78 resideix al lumen del RE. No obstant, diversos estudis demostren que GRP78 també es troba a la superfície cel·lular (Misra et al. 2002; Misra et al. 2004; Davidson et al. 2005). Recentment, dos grups independents han detectat que una fracció de GRP78 pot existir com a proteïna transmembrana en cèl·lules CHO (*chinese hamster ovary*), cèl·lules leucèmiques humanes i cèl·lules humanes de ronyó embrionàries (Rao et al. 2002; Reddy et al. 2003). El fet que GRP78 existeixi a la superfície cel·lular concorda amb els nostres resultats. De fet, vam identificar GRP78 tant a la fracció citosòlica com a la fracció de membrana de plaquetes. D'altra banda, s'ha descrit que GRP78 pot ésser secretada i també s'ha detectat en forma circulant en sèrum d'individus sans (Delpino et al. 2002). De fet, en experiments preliminars també vam detectar GRP78 en plasma procedent de sang perfundida, el que significa que la GRP78 de les plaquetes podria ésser secretada.

S'ha detectat la presència de GRP78 en lesions ateroscleròtiques avançades (Liu et al. 2003) i també a la coberta fibrosa de la placa en ratolins ApoE^{-/-} (Zhou et al. 2004). Recentment, s'ha demostrat que el flux proateroscleròtic (flux oscil·latori) indueix l'expressió de GRP78 en cèl·lules endotelials i que l'augment de GRP78 correlaciona amb l'activació de la resposta a proteïnes no plegades (UPR, *unfolded protein response*), proporcionant un efecte protector compensatiu en resposta a l'estrès del RE (Feaver et al. 2008). Mitjançant l'anàlisi per microscopia confocal vam demostrar que la localització de GRP78 a la plaqueta aparentment depenia bé de la velocitat de cisalla o bé de l'estimulació amb col·lagen. La immunodetecció de GRP78 va resultar ésser més forta en plaquetes inactivades que en plaquetes perfundides, suggerint que GRP78 podria haver estat secretada en resposta a l'activació per la velocitat de cisalla o reorganitzada a l'estructura interna de la plaqueta. Cal destacar que el tractament amb rosuvastatina va mantenir i

inclús va augmentar GRP78 a la superfície de plaquetes efluentes. Aquest augment també es va observar per electroforesi bidimensional (anàlisi proteòmic) i western blot, doncs GRP78 va augmentar significativament a la fracció soluble en urea. Cal remarcar que la fracció soluble en urea no només conté les proteïnes de membrana sinó també la fracció corresponent al citoesquelet, el que explicaria les petites diferències observades en els resultats de l'anàlisi proteòmic i en immunofluorescència de plaquetes perfundides.

El tractament *in vivo* amb rosuvastatina en animals normocolesterolèmics també va produir un augment de GRP78 a la plaqueta, tant a la fracció citosòlica com a la fracció de membrana, indicant així un efecte a nivell del megacariocit. En línia amb aquests resultats, un estudi recent ha demostrat que les estatines activen la UPR i indueixen l'expressió de GRP78 en macròfags (Chen et al. 2008).

GRP78 proporciona una dualitat funcional al RE o a la membrana cel·lular on té múltiples lligands, un dels quals és el TF. El bloqueig de GRP78 en experiments de perfusió va produir un augment significatiu de l'adhesió plaquetària sobre col·lagen i va reduir el temps de formació del quall per la via extrínseca de la coagulació, desencadenada pel TF. Aquests fets recolzen el paper protector de GRP78 de superfície en entorns proaterotrombòtics. El fet que el tractament amb rosuvastatina no revertís totalment l'increment d'adhesió plaquetària degut al bloqueig de GRP78 implica que la rosuvastatina exerceix altres funcions protectores a la plaqueta a més d'induir la translocació de GRP78 a la membrana. La GRP78 associada a membrana té una funció protectora en aterotrombosi inhibint l'activitat procoagulant del TF per unió directa a l'endoteli de la placa ateroscleròtica (Bhattacharjee et al. 2005). En aquest sentit, vam demostrar mitjançant immunoprecipitació que GRP78 a la plaqueta interactua activament amb el TF. A més, l'anàlisi per microscopia confocal de plaquetes perfundides va demostrar un major grau de col·localització de TF i GRP78 amb el tractament amb rosuvastatina, el que indica que l'efecte inhibidor de la rosuvastatina sobre el creixement del trombe es deu, en part, a una reducció de l'activitat del TF degut a una major interacció GRP78-TF. La funció de GRP78 en el creixement del trombe podria estar relacionada amb la seva habilitat d'apaivagar l'activitat del TF o podria atribuir-se a altres mecanismes encara desconeguts implicats directament en l'activació plaquetària. El coneixement del paper fisiològic de GRP78 en resposta al dany cel·lular i a l'estrès en aterotrombosi està en una etapa emergent. Així, amb aquests resultats s'amplia el ventall d'efectes beneficiosos i protectors de les estatines en aterotrombosi.

Els resultats derivats recentment de l'estudi JUPITER (Ridker et al. 2008) han demostrat els efectes beneficiosos associats al tractament amb rosuvastatina mitjançant la reducció de CRP en pacients sense evidències preexistents de malaltia cardiovascular i nivells de colesterol LDL normals. Aquests fets posen de manifest, no només l'impacte de la inflamació i la CRP en concret sobre el risc cardiovascular, sinó també noves possibles indicacions terapèutiques associades a l'ús d'estatines en prevenció primària i secundària.

En resum, els resultats d'aquest treball posen de manifest la importància de la implicació i interrelació dels processos inflamatoris sobre les complicacions aterotrombòtiques. Concretament la inflamació, ja sigui desencadenada per la CRP o la isquèmia miocàrdica, o bé modulada pel bloqueig de la HMG-CoA reductasa té un efecte directe en el desencadenament de l'adhesió i activació plaquetària i, conseqüentment, està directament implicada en el risc de trombosi arterial.

CONCLUSIONS

Considerant els resultats obtinguts en aquest treball podem concloure que:

I. Les diferents isoformes de la CRP difereixen en els seus efectes sobre el creixement del trombe. Concretament,

- **La isoforma monomèrica de CRP (mCRP) té un fenotip protrombòtic que indueix l'adhesió plaquetària i el creixement del trombe en condicions de flux arterial, tant quan es troba en forma circulant com immobilitzada.**
- **La isoforma nativa (natCRP), en canvi, no té cap efecte en l'adhesió plaquetària ni en el creixement del trombe.**
- **Les isoformes de CRP interaccionen amb les plaquetes i s'incorporen a l'estructura tridimensional del trombe.**
- **mCRP indueix l'activació plaquetària, induint l'augment d'expressió de P-selectina a la superfície de la plaqueta, sense produir cap canvi conformacional en GPIIb/IIIa ni sobre CD63.**
- **natCRP, en canvi, no indueix l'activació plaquetària.**

II. La isquèmia miocàrdica té efectes proinflamatoris i protrombòtics a nivell local i sistèmic. En concret,

- **La isquèmia miocàrdica, en absència d'aterosclerosi, indueix l'expressió de mCRP cardíaca.**
- **La isquèmia miocàrdica, en absència d'aterosclerosi, provoca una resposta inflamatòria i una major adhesió i activació plaquetària.**

III. El bloqueig de la HMG-CoA reductasa inhibeix l'adhesió plaquetària i manté GRP78 a la superfície de la plaqueta. En concret,

- **La rosuvastatina inhibeix l'adhesió plaquetària en condicions de flux arterial i venós.**
- **L'abordatge proteòmic va demostrar que la rosuvastatina produeix un augment de GRP78 a la membrana de les plaquetes perfundides.**
- **GRP78 de superfície interacciona amb el TF, redueix la seva activitat procoagulant i intervé en el creixement del trombe.**

BIBLIOGRAFIA

(4S). "Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (1994)." *Lancet* 344(8934): 1383-9.

(WOSCOPS). "Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland Coronary Prevention Study (1998)." *Circulation* 97(15): 1440-5.

A

Aarts, P. A., Heethaar, R. M., Sixma, J. J. (1984). "Red blood cell deformability influences platelets--vessel wall interaction in flowing blood." *Blood* 64(6): 1228-33.

Aarts, P. A., van den Broek, S. A., Prins, G. W., Kuiken, G. D., Sixma, J. J., Heethaar, R. M. (1988). "Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells, in the center in flowing blood." *Arteriosclerosis* 8(6): 819-24.

Alfon, J., Pueyo Palazon, C., Royo, T., Badimon, L. (1999). "Effects of statins in thrombosis and aortic lesion development in a dyslipemic rabbit model." *Thromb Haemost* 81(5): 822-7.

Andre, P., Prasad, K. S., Denis, C. V., He, M., Papalia, J. M., Hynes, R. O., Phillips, D. R., Wagner, D. D. (2002). "CD40L stabilizes arterial thrombi by a beta3 integrin--dependent mechanism." *Nat Med* 8(3): 247-52.

Arap, M. A., Lahdenranta, J., Mintz, P. J., Hajitou, A., Sarkis, A. S., Arap, W., Pasqualini, R. (2004). "Cell surface expression of the stress response chaperone GRP78 enables tumor targeting by circulating ligands." *Cancer Cell* 6(3): 275-84.

B

Badimon, L., Badimon, J. J. (1989). "Mechanisms of arterial thrombosis in nonparallel streamlines: platelet thrombi grow on the apex of stenotic severely injured vessel wall. Experimental study in the pig model." *J Clin Invest* 84(4): 1134-44.

Badimon, L., Badimon, J. J., Turitto, V. T., Vallabhajosula, S., Fuster, V. (1988). "Platelet thrombus formation on collagen type I. A model of deep vessel injury. Influence of blood rheology, von Willebrand factor, and blood coagulation." *Circulation* 78(6): 1431-42.

Badimon, L., Chesebro, J. H., Badimon, J. J. (1992). "Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on evolving thrombi." *Circulation* 86(6 Suppl): III74-85.

- Badimon, L., Martinez-Gonzalez, J.** (2002). "[Endothelium and vascular protection: an update]." *Rev Esp Cardiol* 55 Suppl 1: 17-26.
- Bahekar, A. A., Singh, S., Saha, S., Molnar, J., Arora, R.** (2007). "The prevalence and incidence of coronary heart disease is significantly increased in periodontitis: a meta-analysis." *Am Heart J* 154(5): 830-7.
- Barnes, M. J., Farndale, R. W.** (1999). "Collagens and atherosclerosis." *Exp Gerontol* 34(4): 513-25.
- Barstad, R. M., Roald, H. E., Cui, Y., Turitto, V. T., Sakariassen, K. S.** (1994). "A perfusion chamber developed to investigate thrombus formation and shear profiles in flowing native human blood at the apex of well-defined stenoses." *Arterioscler Thromb* 14(12): 1984-91.
- Baumgartner, H. R.** (1973). "The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition, and formation of mural thrombi." *Microvasc Res* 5(2): 167-79.
- Beck, J. D., Offenbacher, S., Williams, R., Gibbs, P., Garcia, R.** (1998). "Periodontitis: a risk factor for coronary heart disease?" *Ann Periodontol* 3(1): 127-41.
- Bhattacharjee, G., Ahamed, J., Pedersen, B., El-Sheikh, A., Mackman, N., Ruf, W., Liu, C., Edgington, T. S.** (2005). "Regulation of tissue factor--mediated initiation of the coagulation cascade by cell surface grp78." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(8): 1737-43.
- Blake, G. J., Ridker, P. M.** (2003). "C-reactive protein and other inflammatory risk markers in acute coronary syndromes." *J Am Coll Cardiol* 41(4 Suppl S): 37S-42S.
- Bodie, S. L., Ford, I., Greaves, M., Nixon, G. F.** (2001). "Thrombin-induced activation of RhoA in platelet shape change." *Biochem Biophys Res Commun* 287(1): 71-6.
- Born, G. V.** (1970). "Observations on the change in shape of blood platelets brought about by adenosine diphosphate." *J Physiol* 209(2): 487-511.
- Bray, R. A., Samberg, N. L., Gewurz, H., Potempa, L. A., Landay, A. L.** (1988). "C-reactive protein antigenicity on the surface of human peripheral blood lymphocytes. Characterization of lymphocytes reactive with anti-neo-CRP." *J Immunol* 140(12): 4271-8.
- Brosnan, M. J., Hamilton, C. A., Graham, D., Lygate, C. A., Jardine, E., Dominiczak, A. F.** (2002). "Irbesartan lowers superoxide levels and increases nitric oxide bioavailability in blood vessels from spontaneously hypertensive stroke-prone rats." *J Hypertens* 20(2): 281-6.
- Brown, J. H., Del Re, D. P., Sussman, M. A.** (2006). "The Rac and Rho hall of fame: a decade of hypertrophic signaling hits." *Circ Res* 98(6): 730-42.

Burke, A. P., Farb, A., Malcom, G. T., Liang, Y. H., Smialek, J., Virmani, R. (1997). "Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly." *N Engl J Med* 336(18): 1276-82.

C

Cannon, C. P., Braunwald, E., McCabe, C. H., Rader, D. J., Rouleau, J. L., Belder, R., Joyal, S. V., Hill, K. A., Pfeffer, M. A., Skene, A. M. (2004). "Intensive versus moderate lipid lowering with statins after acute coronary syndromes." *N Engl J Med* 350(15): 1495-504.

Casani, L., Sanchez-Gomez, S., Vilahur, G., Badimon, L. (2005). "Pravastatin reduces thrombogenicity by mechanisms beyond plasma cholesterol lowering." *Thromb Haemost* 94(5): 1035-41.

Chardin, P., Boquet, P., Madaule, P., Popoff, M. R., Rubin, E. J., Gill, D. M. (1989). "The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by Clostridium botulinum exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells." *EMBO J* 8(4): 1087-92.

Chen, J. C., Wu, M. L., Huang, K. C., Lin, W. W. (2008). "HMG-CoA reductase inhibitors activate the unfolded protein response and induce cytoprotective GRP78 expression." *Cardiovasc Res* 80(1): 138-50.

Collins, R. G., Velji, R., Guevara, N. V., Hicks, M. J., Chan, L., Beaudet, A. L. (2000). "P-Selectin or intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 deficiency substantially protects against atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *J Exp Med* 191(1): 189-94.

Corrigall, V. M., Bodman-Smith, M. D., Fife, M. S., Canas, B., Myers, L. K., Wooley, P., Soh, C., Staines, N. A., Pappin, D. J., Berlo, S. E., van Eden, W., van Der Zee, R., Lanchbury, J. S., Panayi, G. S. (2001). "The human endoplasmic reticulum molecular chaperone BiP is an autoantigen for rheumatoid arthritis and prevents the induction of experimental arthritis." *J Immunol* 166(3): 1492-8.

Coughlin, S. R. (2000). "Thrombin signalling and protease-activated receptors." *Nature* 407(6801): 258-64.

Creager, M. A., Luscher, T. F., Cosentino, F., Beckman, J. A. (2003). "Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I." *Circulation* 108(12): 1527-32.

Cusack, M. R., Marber, M. S., Lambiase, P. D., Bucknall, C. A., Redwood, S. R. (2002). "Systemic inflammation in unstable angina is the result of myocardial necrosis." *J Am Coll Cardiol* 39(12): 1917-23.

D

- Danenberg, H. D., Kantak, N., Grad, E., Swaminathan, R. V., Lotan, C., Edelman, E. R.** (2007). "C-reactive protein promotes monocyte-platelet aggregation: an additional link to the inflammatory-thrombotic intricacy." *Eur J Haematol* 78(3): 246-52.
- Danenberg, H. D., Szalai, A. J., Swaminathan, R. V., Peng, L., Chen, Z., Seifert, P., Fay, W. P., Simon, D. I., Edelman, E. R.** (2003). "Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice." *Circulation* 108(5): 512-5.
- Danesh, J., Collins, R., Appleby, P., Peto, R.** (1998). "Association of fibrinogen, C-reactive protein, albumin, or leukocyte count with coronary heart disease: meta-analyses of prospective studies." *JAMA* 279(18): 1477-82.
- Danesh, J., Wheeler, J. G., Hirschfield, G. M., Eda, S., Eiriksdottir, G., Rumley, A., Lowe, G. D., Pepys, M. B., Gudnason, V.** (2004). "C-reactive protein and other circulating markers of inflammation in the prediction of coronary heart disease." *N Engl J Med* 350(14): 1387-97.
- Daniel, J. L., Molish, I. R., Rigmaiden, M., Stewart, G.** (1984). "Evidence for a role of myosin phosphorylation in the initiation of the platelet shape change response." *J Biol Chem* 259(15): 9826-31.
- Davidson, D. J., Haskell, C., Majest, S., Kherzai, A., Egan, D. A., Walter, K. A., Schneider, A., Gubbins, E. F., Solomon, L., Chen, Z., Lesniewski, R., Henkin, J.** (2005). "Kringle 5 of human plasminogen induces apoptosis of endothelial and tumor cells through surface-expressed glucose-regulated protein 78." *Cancer Res* 65(11): 4663-72.
- Davies, P. F.** (1995). "Flow-mediated endothelial mechanotransduction." *Physiol Rev* 75(3): 519-60.
- de Boer, O. J., van der Wal, A. C., Teeling, P., Becker, A. E.** (1999). "Leucocyte recruitment in rupture prone regions of lipid-rich plaques: a prominent role for neovascularization?" *Cardiovasc Res* 41(2): 443-9.
- de Gaetano G.M., D., C., Cerletti, V., Bertelé, M.G., Lampugnani, D., Coen, M., Colucci, E., Dejana, A., Del Maschio, A., Falanga, M., Livio, A.** (1984). *Plaquetas: origen y aspectos morfológicos*. Barcelona, Masson.
- Delpino, A., Castelli, M.** (2002). "The 78 kDa glucose-regulated protein (GRP78/BIP) is expressed on the cell membrane, is released into cell culture medium and is also present in human peripheral circulation." *Biosci Rep* 22(3-4): 407-20.

- Devaraj, S., Venugopal, S., Jialal, I.** (2006). "Native pentameric C-reactive protein displays more potent pro-atherogenic activities in human aortic endothelial cells than modified C-reactive protein." *Atherosclerosis* 184(1): 48-52.
- Dickson, B. C., Gotlieb, A. I.** (2003). "Towards understanding acute destabilization of vulnerable atherosclerotic plaques." *Cardiovasc Pathol* 12(5): 237-48.
- Diehl, E. E., Haines, G. K., 3rd, Radosevich, J. A., Potempa, L. A.** (2000). "Immunohistochemical localization of modified C-reactive protein antigen in normal vascular tissue." *Am J Med Sci* 319(2): 79-83.
- Dobrin, P. B., Littooy, F. N., Endean, E. D.** (1989). "Mechanical factors predisposing to intimal hyperplasia and medial thickening in autogenous vein grafts." *Surgery* 105(3): 393-400.
- Dong, Z. M., Chapman, S. M., Brown, A. A., Frenette, P. S., Hynes, R. O., Wagner, D. D.** (1998). "The combined role of P- and E-selectins in atherosclerosis." *J Clin Invest* 102(1): 145-52.
- Du, X.** (2007). "Signaling and regulation of the platelet glycoprotein Ib-IX-V complex." *Curr Opin Hematol* 14(3): 262-9.
- Dupuis, J., Tardif, J. C., Cernacek, P., Theroux, P.** (1999). "Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes. The RECIFE (reduction of cholesterol in ischemia and function of the endothelium) trial." *Circulation* 99(25): 3227-33.

E

- Eisenhardt, S. U., Habersberger, J., Murphy, A., Chen, Y. C., Woollard, K. J., Bassler, N., Qian, H., von Zur Muhlen, C., Hagemeyer, C. E., Ahrens, I., Chin-Dusting, J., Bobik, A., Peter, K.** (2009). "Dissociation of Pentameric to Monomeric C-Reactive Protein on Activated Platelets Localizes Inflammation to Atherosclerotic Plaques." *Circ Res*.

F

- Feaver, R. E., Hastings, N. E., Pryor, A., Blackman, B. R.** (2008). "GRP78 upregulation by atheroprone shear stress via p38-, alpha2beta1-dependent mechanism in endothelial cells." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(8): 1534-41.
- Fiedel, B. A.** (1985). "Platelet agonist synergism by the acute phase reactant C-reactive protein." *Blood* 65(2): 264-9.
- Fiedel, B. A., Potempa, L. A., Frenzke, M. E., Simpson, R. M., Gewurz, H.** (1982). "Platelet inhibitory effects of CRP preparations are due to a co-isolating low molecular weight factor." *Immunology* 45(1): 15-22.

- Finet, G., Ohayon, J., Rioufol, G.** (2004). "Biomechanical interaction between cap thickness, lipid core composition and blood pressure in vulnerable coronary plaque: impact on stability or instability." *Coron Artery Dis* 15(1): 13-20.
- Fox, J. E., Phillips, D. R.** (1982). "Role of phosphorylation in mediating the association of myosin with the cytoskeletal structures of human platelets." *J Biol Chem* 257(8): 4120-6.
- Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J. J., Chesebro, J. H.** (1992). "The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (1)." *N Engl J Med* 326(4): 242-50.
- Fuster, V., Badimon, L., Badimon, J. J., Chesebro, J. H.** (1992). "The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes (2)." *N Engl J Med* 326(5): 310-8.

G

- Galis, Z. S., Khatri, J. J.** (2002). "Matrix metalloproteinases in vascular remodeling and atherogenesis: the good, the bad, and the ugly." *Circ Res* 90(3): 251-62.
- Gawaz, M.** (2004). "Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium." *Cardiovasc Res* 61(3): 498-511.
- Gershov, D., Kim, S., Brot, N., Elkon, K. B.** (2000). "C-Reactive protein binds to apoptotic cells, protects the cells from assembly of the terminal complement components, and sustains an antiinflammatory innate immune response: implications for systemic autoimmunity." *J Exp Med* 192(9): 1353-64.
- Geyer, M., Wittinghofer, A.** (1997). "GEFs, GAPs, GDIs and effectors: taking a closer (3D) look at the regulation of Ras-related GTP-binding proteins." *Curr Opin Struct Biol* 7(6): 786-92.
- Goldsmith, H. L., Turitto, V. T.** (1986). "Rheological aspects of thrombosis and haemostasis: basic principles and applications. ICTH-Report--Subcommittee on Rheology of the International Committee on Thrombosis and Haemostasis." *Thromb Haemost* 55(3): 415-35.
- Goto, S., Salomon, D. R., Ikeda, Y., Ruggeri, Z. M.** (1995). "Characterization of the unique mechanism mediating the shear-dependent binding of soluble von Willebrand factor to platelets." *J Biol Chem* 270(40): 23352-61.
- Gould, J. M., Weiser, J. N.** (2001). "Expression of C-reactive protein in the human respiratory tract." *Infect Immun* 69(3): 1747-54.
- Graves, D. T., Cochran, D.** (2003). "The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction." *J Periodontol* 74(3): 391-401.

Griselli, M., Herbert, J., Hutchinson, W. L., Taylor, K. M., Sohail, M., Krausz, T., Pepys, M. B. (1999). "C-reactive protein and complement are important mediators of tissue damage in acute myocardial infarction." *J Exp Med* 190(12): 1733-40.

Grybauskas, P. (2003). "[Role of tissue factor in atherothrombosis]." *Medicina (Kaunas)* 39(12): 1165-70.

H

Hahn, C., Schwartz, M. A. (2009). "Mechanotransduction in vascular physiology and atherogenesis." *Nat Rev Mol Cell Biol* 10(1): 53-62.

Hansson, G. K. (2001). "Immune mechanisms in atherosclerosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21(12): 1876-90.

Hansson, G. K. (2005). "Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease." *N Engl J Med* 352(16): 1685-95.

Harbeck, B., Huttelmaier, S., Schluter, K., Jockusch, B. M., Illenberger, S. (2000). "Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin." *J Biol Chem* 275(40): 30817-25.

Hartwig, J., Italiano, J., Jr. (2003). "The birth of the platelet." *J Thromb Haemost* 1(7): 1580-6.

Hartwig, J. H. (1992). "Mechanisms of actin rearrangements mediating platelet activation." *J Cell Biol* 118(6): 1421-42.

Hayek, T., Attias, J., Coleman, R., Brodsky, S., Smith, J., Breslow, J. L., Keidar, S. (1999). "The angiotensin-converting enzyme inhibitor, fosinopril, and the angiotensin II receptor antagonist, losartan, inhibit LDL oxidation and attenuate atherosclerosis independent of lowering blood pressure in apolipoprotein E deficient mice." *Cardiovasc Res* 44(3): 579-87.

Hendershot, L. M. (2004). "The ER function BiP is a master regulator of ER function." *Mt Sinai J Med* 71(5): 289-97.

Herczenik, E., Bouma, B., Korporaal, S. J., Strangi, R., Zeng, Q., Gros, P., Van Eck, M., Van Berkel, T. J., Gebbink, M. F., Akkerman, J. W. (2007). "Activation of human platelets by misfolded proteins." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27(7): 1657-65.

Hettne, K. M., Weeber, M., Laine, M. L., ten Cate, H., Boyer, S., Kors, J. A., Loos, B. G. (2007). "Automatic mining of the literature to generate new hypotheses for the possible link between periodontitis and atherosclerosis: lipopolysaccharide as a case study." *J Clin Periodontol* 34(12): 1016-24.

- Heuertz, R. M., Schneider, G. P., Potempa, L. A., Webster, R. O.** (2005). "Native and modified C-reactive protein bind different receptors on human neutrophils." *Int J Biochem Cell Biol* 37(2): 320-35.
- Hirschfield, G. M., Gallimore, J. R., Kahan, M. C., Hutchinson, W. L., Sabin, C. A., Benson, G. M., Dhillon, A. P., Tennent, G. A., Pepys, M. B.** (2005). "Transgenic human C-reactive protein is not proatherogenic in apolipoprotein E-deficient mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(23): 8309-14.
- Hjalmarson, A., Gilpin, E. A., Kjekshus, J., Schieman, G., Nicod, P., Henning, H., Ross, J., Jr.** (1990). "Influence of heart rate on mortality after acute myocardial infarction." *Am J Cardiol* 65(9): 547-53.
- Hoffman, M., Blum, A., Baruch, R., Kaplan, E., Benjamin, M.** (2004). "Leukocytes and coronary heart disease." *Atherosclerosis* 172(1): 1-6.
- Holme, P. A., Orvim, U., Hamers, M. J., Solum, N. O., Brosstad, F. R., Barstad, R. M., Sakariassen, K. S.** (1997). "Shear-induced platelet activation and platelet microparticle formation at blood flow conditions as in arteries with a severe stenosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17(4): 646-53.
- Hovig, T.** (1970). "Blood platelet surface and shape. A scanning electron microscopic study." *Scand J Haematol* 7(6): 420-7.

J

- Jabs, W. J., Theissing, E., Nitschke, M., Bechtel, J. F., Duchrow, M., Mohamed, S., Jahrbeck, B., Sievers, H. H., Steinhoff, J., Bartels, C.** (2003). "Local generation of C-reactive protein in diseased coronary artery venous bypass grafts and normal vascular tissue." *Circulation* 108(12): 1428-31.
- Ji, S. R., Wu, Y., Zhu, L., Potempa, L. A., Sheng, F. L., Lu, W., Zhao, J.** (2007). "Cell membranes and liposomes dissociate C-reactive protein (CRP) to form a new, biologically active structural intermediate: mCRP(m)." *FASEB J* 21(1): 284-94.
- Jialal, I., Devaraj, S., Venugopal, S. K.** (2004). "C-reactive protein: risk marker or mediator in atherothrombosis?" *Hypertension* 44(1): 6-11.
- Jonsson, A. P.** (2001). "Mass spectrometry for protein and peptide characterisation." *Cell Mol Life Sci* 58(7): 868-84.

K

- Kaartinen, M., Penttila, A., Kovanen, P. T.** (1994). "Accumulation of activated mast cells in the shoulder region of human coronary atheroma, the predilection site of atheromatous rupture." *Circulation* 90(4): 1669-78.

- Kaartinen, M., Penttila, A., Kovanen, P. T.** (1996). "Mast cells in rupture-prone areas of human coronary atheromas produce and store TNF-alpha." *Circulation* 94(11): 2787-92.
- Kakio, T., Matsumori, A., Ono, K., Ito, H., Matsushima, K., Sasayama, S.** (2000). "Roles and relationship of macrophages and monocyte chemoattractant and activating factor/monocyte chemoattractant protein-1 in the ischemic and reperfused rat heart." *Lab Invest* 80(7): 1127-36.
- Khreiss, T., Jozsef, L., Hossain, S., Chan, J. S., Potempa, L. A., Filep, J. G.** (2002). "Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with delayed apoptosis of human neutrophils." *J Biol Chem* 277(43): 40775-81.
- Khreiss, T., Jozsef, L., Potempa, L. A., Filep, J. G.** (2004). "Conformational rearrangement in C-reactive protein is required for proinflammatory actions on human endothelial cells." *Circulation* 109(16): 2016-22.
- Khreiss, T., Jozsef, L., Potempa, L. A., Filep, J. G.** (2004). "Opposing effects of C-reactive protein isoforms on shear-induced neutrophil-platelet adhesion and neutrophil aggregation in whole blood." *Circulation* 110(17): 2713-20.
- Khreiss, T., Jozsef, L., Potempa, L. A., Filep, J. G.** (2005). "Loss of pentameric symmetry in C-reactive protein induces interleukin-8 secretion through peroxynitrite signaling in human neutrophils." *Circ Res* 97(7): 690-7.
- Khurana, R., Zhuang, Z., Bhardwaj, S., Murakami, M., De Muinck, E., Yla-Herttuala, S., Ferrara, N., Martin, J. F., Zachary, I., Simons, M.** (2004). "Angiogenesis-dependent and independent phases of intimal hyperplasia." *Circulation* 110(16): 2436-43.
- Kim, S., Iwao, H.** (2000). "Molecular and cellular mechanisms of angiotensin II-mediated cardiovascular and renal diseases." *Pharmacol Rev* 52(1): 11-34.
- Kinlay, S., Libby, P., Ganz, P.** (2001). "Endothelial function and coronary artery disease." *Curr Opin Lipidol* 12(4): 383-9.
- Kiuru, S., Javela, K., Somer, H., Kekomaki, R.** (2000). "Altered platelet shape change in hereditary gelsolin Asp187Asn-related amyloidosis." *Thromb Haemost* 83(3): 491-5.
- Kobayashi, S., Inoue, N., Ohashi, Y., Terashima, M., Matsui, K., Mori, T., Fujita, H., Awano, K., Kobayashi, K., Azumi, H., Ejiri, J., Hirata, K., Kawashima, S., Hayashi, Y., Yokozaki, H., Itoh, H., Yokoyama, M.** (2003). "Interaction of oxidative stress and inflammatory response in coronary plaque instability: important role of C-reactive protein." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(8): 1398-404.

- Kolb-Bachofen, V., Puchta-Teudt, N., Egenhofer, C.** (1995). "Expression of membrane-associated C-reactive protein by human monocytes: indications for a selectin-like activity participating in adhesion." *Glycoconj J* 12(2): 122-7.
- Kotha, J., Longhurst, C., Appling, W., Jennings, L. K.** (2008). "Tetraspanin CD9 regulates beta 1 integrin activation and enhances cell motility to fibronectin via a PI-3 kinase-dependent pathway." *Exp Cell Res* 314(8): 1811-22.
- Kovacs, A., Tornvall, P., Nilsson, R., Tegner, J., Hamsten, A., Bjorkegren, J.** (2007). "Human C-reactive protein slows atherosclerosis development in a mouse model with human-like hypercholesterolemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(34): 13768-73.
- Kresl, J. J., Potempa, L. A., Anderson, B., Radosevich, J. A.** (1999). "Inhibition of mouse mammary adenocarcinoma (EMT6) growth and metastases in mice by a modified form of C-reactive protein." *Tumour Biol* 20(2): 72-87.
- Kresl, J. J., Potempa, L. A., Anderson, B. E.** (1998). "Conversion of native oligomeric to a modified monomeric form of human C-reactive protein." *Int J Biochem Cell Biol* 30(12): 1415-26.
- Krupinski, J., Turu, M. M., Martinez-Gonzalez, J., Carvajal, A., Juan-Babot, J. O., Iborra, E., Slevin, M., Rubio, F., Badimon, L.** (2006). "Endogenous expression of C-reactive protein is increased in active (ulcerated noncomplicated) human carotid artery plaques." *Stroke* 37(5): 1200-4.
- Kunjathoor, V. V., Febbraio, M., Podrez, E. A., Moore, K. J., Andersson, L., Koehn, S., Rhee, J. S., Silverstein, R., Hoff, H. F., Freeman, M. W.** (2002). "Scavenger receptors class A-I/II and CD36 are the principal receptors responsible for the uptake of modified low density lipoprotein leading to lipid loading in macrophages." *J Biol Chem* 277(51): 49982-8.

L

- Landmesser, U., Harrison, D. G.** (2001). "Oxidant stress as a marker for cardiovascular events: Ox marks the spot." *Circulation* 104(22): 2638-40.
- LaRosa, J. C.** (2003). "Reduction of serum LDL-C levels: a relationship to clinical benefits." *Am J Cardiovasc Drugs* 3(4): 271-81.
- Ledue, T. B., Rifai, N.** (2003). "Preanalytic and analytic sources of variations in C-reactive protein measurement: implications for cardiovascular disease risk assessment." *Clin Chem* 49(8): 1258-71.
- Lee, A. S.** (2001). "The glucose-regulated proteins: stress induction and clinical applications." *Trends Biochem Sci* 26(8): 504-10.

- Lee, A. S.** (2005). "The ER chaperone and signaling regulator GRP78/BiP as a monitor of endoplasmic reticulum stress." *Methods* 35(4): 373-81.
- Leone, A.** (2003). "Relationship between cigarette smoking and other coronary risk factors in atherosclerosis: risk of cardiovascular disease and preventive measures." *Curr Pharm Des* 9(29): 2417-23.
- Li, S. H., Szmikto, P. E., Weisel, R. D., Wang, C. H., Fedak, P. W., Li, R. K., Mickle, D. A., Verma, S.** (2004). "C-reactive protein upregulates complement-inhibitory factors in endothelial cells." *Circulation* 109(7): 833-6.
- Libby, P.** (2002). "Inflammation in atherosclerosis." *Nature* 420(6917): 868-74.
- Libby, P., Aikawa, M.** (2002). "Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets." *Nat Med* 8(11): 1257-62.
- Libby, P., Ridker, P. M.** (1999). "Novel inflammatory markers of coronary risk: theory versus practice." *Circulation* 100(11): 1148-50.
- Lindahl, B., Toss, H., Siegbahn, A., Venge, P., Wallentin, L.** (2000). "Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease." *N Engl J Med* 343(16): 1139-47.
- Littlewood, T. D., Bennett, M. R.** (2003). "Apoptotic cell death in atherosclerosis." *Curr Opin Lipidol* 14(5): 469-75.
- Liu, C., Bhattacharjee, G., Boisvert, W., Dilley, R., Edgington, T.** (2003). "In vivo interrogation of the molecular display of atherosclerotic lesion surfaces." *Am J Pathol* 163(5): 1859-71.
- Liu, C., Wang, S., Deb, A., Nath, K. A., Katusic, Z. S., McConnell, J. P., Caplice, N. M.** (2005). "Proapoptotic, antimigratory, antiproliferative, and antiangiogenic effects of commercial C-reactive protein on various human endothelial cell types in vitro: implications of contaminating presence of sodium azide in commercial preparation." *Circ Res* 97(2): 135-43.
- Liuzzo, G., Biasucci, L. M., Gallimore, J. R., Grillo, R. L., Rebuffi, A. G., Pepys, M. B., Maseri, A.** (1994). "The prognostic value of C-reactive protein and serum amyloid A protein in severe unstable angina." *N Engl J Med* 331(7): 417-24.
- Llorente-Cortes, V., Badimon, L.** (2005). "LDL receptor-related protein and the vascular wall: implications for atherothrombosis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(3): 497-504.
- Llorente-Cortes, V., Martinez-Gonzalez, J., Badimon, L.** (1998). "Esterified cholesterol accumulation induced by aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells is reduced by HMG-CoA reductase inhibitors." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 18(5): 738-46.

- Llorente-Cortes, V., Otero-Vinas, M., Hurt-Camejo, E., Martinez-Gonzalez, J., Badimon, L.** (2002). "Human coronary smooth muscle cells internalize versican-modified LDL through LDL receptor-related protein and LDL receptors." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(3): 387-93.
- Llorente-Cortes, V., Otero-Vinas, M., Sanchez, S., Rodriguez, C., Badimon, L.** (2002). "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* 106(24): 3104-10.
- Longhurst, C. M., White, M. M., Wilkinson, D. A., Jennings, L. K.** (1999). "A CD9, alphaIIb beta3, integrin-associated protein, and GPIb/V/IX complex on the surface of human platelets is influenced by alphaIIb beta3 conformational states." *Eur J Biochem* 263(1): 104-11.
- Luscher, T. F., Creager, M. A., Beckman, J. A., Cosentino, F.** (2003). "Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part II." *Circulation* 108(13): 1655-61.

M

- Mackay, D. J., Hall, A.** (1998). "Rho GTPases." *J Biol Chem* 273(33): 20685-8.
- Mackiewicz, A., Speroff, T., Ganapathi, M. K., Kushner, I.** (1991). "Effects of cytokine combinations on acute phase protein production in two human hepatoma cell lines." *J Immunol* 146(9): 3032-7.
- Mackman, N.** (2006). "Role of tissue factor in hemostasis and thrombosis." *Blood Cells Mol Dis* 36(2): 104-7.
- Mailhac, A., Badimon, J. J., Fallon, J. T., Fernandez-Ortiz, A., Meyer, B., Chesebro, J. H., Fuster, V., Badimon, L.** (1994). "Effect of an eccentric severe stenosis on fibrin(ogen) deposition on severely damaged vessel wall in arterial thrombosis. Relative contribution of fibrin(ogen) and platelets." *Circulation* 90(2): 988-96.
- Malek, A. M., Alper, S. L., Izumo, S.** (1999). "Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis." *JAMA* 282(21): 2035-42.
- Mancini, G. B., Henry, G. C., Macaya, C., O'Neill, B. J., Pucillo, A. L., Carere, R. G., Wargovich, T. J., Mudra, H., Luscher, T. F., Klibaner, M. I., Haber, H. E., Uprichard, A. C., Pepine, C. J., Pitt, B.** (1996). "Angiotensin-converting enzyme inhibition with quinapril improves endothelial vasomotor dysfunction in patients with coronary artery disease. The TREND (Trial on Reversing ENdothelial Dysfunction) Study." *Circulation* 94(3): 258-65.

- Mannucci, P. M., Sharp, A. A.** (1967). "Platelet volume and shape in relation to aggregation and adhesion." *Br J Haematol* 13(4): 604-17.
- Manolio, T.** (2003). "Novel risk markers and clinical practice." *N Engl J Med* 349(17): 1587-9.
- Maron, D. J., Fazio, S., Linton, M. F.** (2000). "Current perspectives on statins." *Circulation* 101(2): 207-13.
- Mattila, K. J., Nieminen, M. S., Valtonen, V. V., Rasi, V. P., Kesaniemi, Y. A., Syrjala, S. L., Jungell, P. S., Isoluoma, M., Hietaniemi, K., Jokinen, M. J.** (1989). "Association between dental health and acute myocardial infarction." *BMJ* 298(6676): 779-81.
- Mattila, K. J., Valle, M. S., Nieminen, M. S., Valtonen, V. V., Hietaniemi, K. L.** (1993). "Dental infections and coronary atherosclerosis." *Atherosclerosis* 103(2): 205-11.
- Mattila, K. J., Valtonen, V. V., Nieminen, M., Huttunen, J. K.** (1995). "Dental infection and the risk of new coronary events: prospective study of patients with documented coronary artery disease." *Clin Infect Dis* 20(3): 588-92.
- Mazer, S. P., Rabbani, L. E.** (2004). "Evidence for C-reactive protein's role in (CRP) vascular disease: atherothrombosis, immuno-regulation and CRP." *J Thromb Thrombolysis* 17(2): 95-105.
- Mazzucato, M., Pradella, P., Cozzi, M. R., De Marco, L., Ruggeri, Z. M.** (2002). "Sequential cytoplasmic calcium signals in a 2-stage platelet activation process induced by the glycoprotein Ibalph mechanoreceptor." *Blood* 100(8): 2793-800.
- McEver, R. P.** (2001). "Adhesive interactions of leukocytes, platelets, and the vessel wall during hemostasis and inflammation." *Thromb Haemost* 86(3): 746-56.
- Merino, A., Cohen, M., Badimon, J. J., Fuster, V., Badimon, L.** (1994). "Synergistic action of severe wall injury and shear forces on thrombus formation in arterial stenosis: definition of a thrombotic shear rate threshold." *J Am Coll Cardiol* 24(4): 1091-7.
- Merten, M., Thiagarajan, P.** (2000). "P-selectin expression on platelets determines size and stability of platelet aggregates." *Circulation* 102(16): 1931-6.
- Misra, U. K., Gonzalez-Gronow, M., Gawdi, G., Hart, J. P., Johnson, C. E., Pizzo, S. V.** (2002). "The role of Grp 78 in alpha 2-macroglobulin-induced signal transduction. Evidence from RNA interference that the low density lipoprotein receptor-related protein is associated with, but not necessary for, GRP 78-mediated signal transduction." *J Biol Chem* 277(44): 42082-7.

- Misra, U. K., Gonzalez-Gronow, M., Gawdi, G., Wang, F., Pizzo, S. V.** (2004). "A novel receptor function for the heat shock protein Grp78: silencing of Grp78 gene expression attenuates alpha2M*-induced signalling." *Cell Signal* 16(8): 929-38.
- Miyazawa, K., Kiyono, S., Inoue, K.** (1988). "Modulation of stimulus-dependent human platelet activation by C-reactive protein modified with active oxygen species." *J Immunol* 141(2): 570-4.
- Molloy, M. P., Herbert, B. R., Walsh, B. J., Tyler, M. I., Traini, M., Sanchez, J. C., Hochstrasser, D. F., Williams, K. L., Gooley, A. A.** (1998). "Extraction of membrane proteins by differential solubilization for separation using two-dimensional gel electrophoresis." *Electrophoresis* 19(5): 837-44.
- Moons, A. H., Levi, M., Peters, R. J.** (2002). "Tissue factor and coronary artery disease." *Cardiovasc Res* 53(2): 313-25.
- Moreno, P. R., Falk, E., Palacios, I. F., Newell, J. B., Fuster, V., Fallon, J. T.** (1994). "Macrophage infiltration in acute coronary syndromes. Implications for plaque rupture." *Circulation* 90(2): 775-8.
- Moreno, P. R., Purushothaman, K. R., Fuster, V., Echeverri, D., Trusczyńska, H., Sharma, S. K., Badimon, J. J., O'Connor, W. N.** (2004). "Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability." *Circulation* 110(14): 2032-8.
- Murphy, T. M., Baum, L. L., Beaman, K. D.** (1991). "Extrahepatic transcription of human C-reactive protein." *J Exp Med* 173(2): 495-8.

N

- Nachmias, V. T., Kavalier, J., Jacobowitz, S.** (1985). "Reversible association of myosin with the platelet cytoskeleton." *Nature* 313(5997): 70-2.
- Nesbitt, W. S., Westein, E., Tovar-Lopez, F. J., Tolouei, E., Mitchell, A., Fu, J., Carberry, J., Fouras, A., Jackson, S. P.** (2009). "A shear gradient-dependent platelet aggregation mechanism drives thrombus formation." *Nat Med* 15(6): 665-73.
- Nissen, S. E., Nicholls, S. J., Sipahi, I., Libby, P., Raichlen, J. S., Ballantyne, C. M., Davignon, J., Erbel, R., Fruchart, J. C., Tardif, J. C., Schoenhagen, P., Crowe, T., Cain, V., Wolski, K., Goormastic, M., Tuzcu, E. M.** (2006). "Effect of very high-intensity statin therapy on regression of coronary atherosclerosis: the ASTEROID trial." *JAMA* 295(13): 1556-65.
- Nissen, S. E., Tuzcu, E. M., Schoenhagen, P., Crowe, T., Sasiela, W. J., Tsai, J., Orazem, J., Magorien, R. D., O'Shaughnessy, C., Ganz, P.** (2005). "Statin

therapy, LDL cholesterol, C-reactive protein, and coronary artery disease." *N Engl J Med* 352(1): 29-38.

O

Ouchi, N., Kihara, S., Funahashi, T., Nakamura, T., Nishida, M., Kumada, M., Okamoto, Y., Ohashi, K., Nagaretani, H., Kishida, K., Nishizawa, H., Maeda, N., Kobayashi, H., Hiraoka, H., Matsuzawa, Y. (2003). "Reciprocal association of C-reactive protein with adiponectin in blood stream and adipose tissue." *Circulation* 107(5): 671-4.

P

Padró, T., Mendieta, C., Badimon, L. (2005). "Inflamación y arteriosclerosis." *Hipertensión* 22(4): 173-82.

Paul, A., Ko, K. W., Li, L., Yechoor, V., McCrory, M. A., Szalai, A. J., Chan, L. (2004). "C-reactive protein accelerates the progression of atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice." *Circulation* 109(5): 647-55.

Paul, B. Z., Daniel, J. L., Kunapuli, S. P. (1999). "Platelet shape change is mediated by both calcium-dependent and -independent signaling pathways. Role of p160 Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase in platelet shape change." *J Biol Chem* 274(40): 28293-300.

Pearson, T. A., Mensah, G. A., Alexander, R. W., Anderson, J. L., Cannon, R. O., 3rd, Criqui, M., Fadl, Y. Y., Fortmann, S. P., Hong, Y., Myers, G. L., Rifai, N., Smith, S. C., Jr., Taubert, K., Tracy, R. P., Vinicor, F. (2003). "Markers of inflammation and cardiovascular disease: application to clinical and public health practice: A statement for healthcare professionals from the Centers for Disease Control and Prevention and the American Heart Association." *Circulation* 107(3): 499-511.

Pepys, M. B., Baltz, M. L. (1983). "Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein." *Adv Immunol* 34: 141-212.

Potempa, L. A., Maldonado, B. A., Laurent, P., Zemel, E. S., Gewurz, H. (1983). "Antigenic, electrophoretic and binding alterations of human C-reactive protein modified selectively in the absence of calcium." *Mol Immunol* 20(11): 1165-75.

Q

Qamirani, E., Ren, Y., Kuo, L., Hein, T. W. (2005). "C-reactive protein inhibits endothelium-dependent NO-mediated dilation in coronary arterioles by activating p38 kinase and NAD(P)H oxidase." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(5): 995-1001.

R

Rao, R. V., Peel, A., Logvinova, A., del Rio, G., Hermel, E., Yokota, T., Goldsmith, P. C., Ellerby, L. M., Ellerby, H. M., Bredesen, D. E. (2002). "Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78." *FEBS Lett* 514(2-3): 122-8.

Reddy, R. K., Mao, C., Baumeister, P., Austin, R. C., Kaufman, R. J., Lee, A. S. (2003). "Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation." *J Biol Chem* 278(23): 20915-24.

Reifenberg, K., Lehr, H. A., Baskal, D., Wiese, E., Schaefer, S. C., Black, S., Samols, D., Torzewski, M., Lackner, K. J., Husmann, M., Blettner, M., Bhakdi, S. (2005). "Role of C-reactive protein in atherogenesis: can the apolipoprotein E knockout mouse provide the answer?" *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(8): 1641-6.

Ridker, P. M., Cushman, M., Stampfer, M. J., Tracy, R. P., Hennekens, C. H. (1997). "Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men." *N Engl J Med* 336(14): 973-9.

Ridker, P. M., Danielson, E., Fonseca, F. A., Genest, J., Gotto, A. M., Jr., Kastelein, J. J., Koenig, W., Libby, P., Lorenzatti, A. J., MacFadyen, J. G., Nordestgaard, B. G., Shepherd, J., Willerson, J. T., Glynn, R. J. (2008). "Rosuvastatin to prevent vascular events in men and women with elevated C-reactive protein." *N Engl J Med* 359(21): 2195-207.

Ridker, P. M., Rifai, N., Rose, L., Buring, J. E., Cook, N. R. (2002). "Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events." *N Engl J Med* 347(20): 1557-65.

Ross, R. (1999). "Atherosclerosis--an inflammatory disease." *N Engl J Med* 340(2): 115-26.

Ross, R., Glomset, J. A. (1976). "The pathogenesis of atherosclerosis (first of two parts)." *N Engl J Med* 295(7): 369-77.

Ross, R., Glomset, J. A. (1976). "The pathogenesis of atherosclerosis (second of two parts)." *N Engl J Med* 295(8): 420-5.

- Roux, S. P., Sakariassen, K. S., Turitto, V. T., Baumgartner, H. R.** (1991). "Effect of aspirin and epinephrine on experimentally induced thrombogenesis in dogs. A parallelism between in vivo and ex vivo thrombosis models." *Arterioscler Thromb* 11(5): 1182-91.
- Ruggeri, Z. M.** (2002). "Platelets in atherothrombosis." *Nat Med* 8(11): 1227-34.
- Ruggeri, Z. M., De Marco, L., Gatti, L., Bader, R., Montgomery, R. R.** (1983). "Platelets have more than one binding site for von Willebrand factor." *J Clin Invest* 72(1): 1-12.
- Ruggeri, Z. M., Dent, J. A., Saldivar, E.** (1999). "Contribution of distinct adhesive interactions to platelet aggregation in flowing blood." *Blood* 94(1): 172-8.

S

- Sakariassen, K. S., Barstad, R. M.** (1993). "Mechanisms of thromboembolism at arterial plaques." *Blood Coagul Fibrinolysis* 4(4): 615-25.
- Sakariassen, K. S., Muggli, R., Baumgartner, H. R.** (1989). "Measurements of platelet interaction with components of the vessel wall in flowing blood." *Methods Enzymol* 169: 37-70.
- Salonen, E. M., Vartio, T., Hedman, K., Vaheri, A.** (1984). "Binding of fibronectin by the acute phase reactant C-reactive protein." *J Biol Chem* 259(3): 1496-501.
- Sambola, A., Osende, J., Hathcock, J., Degen, M., Nemerson, Y., Fuster, V., Crandall, J., Badimon, J. J.** (2003). "Role of risk factors in the modulation of tissue factor activity and blood thrombogenicity." *Circulation* 107(7): 973-7.
- Sambrano, G. R., Weiss, E. J., Zheng, Y. W., Huang, W., Coughlin, S. R.** (2001). "Role of thrombin signalling in platelets in haemostasis and thrombosis." *Nature* 413(6851): 74-8.
- Savage, B., Almus-Jacobs, F., Ruggeri, Z. M.** (1998). "Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow." *Cell* 94(5): 657-66.
- Savage, B., Cattaneo, M., Ruggeri, Z. M.** (2001). "Mechanisms of platelet aggregation." *Curr Opin Hematol* 8(5): 270-6.
- Savage, B., Ginsberg, M. H., Ruggeri, Z. M.** (1999). "Influence of fibrillar collagen structure on the mechanisms of platelet thrombus formation under flow." *Blood* 94(8): 2704-15.
- Savage, B., Saldivar, E., Ruggeri, Z. M.** (1996). "Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor." *Cell* 84(2): 289-97.
- Schwedler, S. B., Amann, K., Wernicke, K., Krebs, A., Nauck, M., Wanner, C., Potempa, L. A., Galle, J.** (2005). "Native C-reactive protein increases whereas

- modified C-reactive protein reduces atherosclerosis in apolipoprotein E-knockout mice." *Circulation* 112(7): 1016-23.
- Schwedler, S. B., Guderian, F., Dammrich, J., Potempa, L. A., Wanner, C.** (2003). "Tubular staining of modified C-reactive protein in diabetic chronic kidney disease." *Nephrol Dial Transplant* 18(11): 2300-7.
- Shapira, L., Soskolne, W. A., Sela, M. N., Offenbacher, S., Barak, V.** (1994). "The secretion of PGE₂, IL-1 beta, IL-6, and TNF alpha by adherent mononuclear cells from early onset periodontitis patients." *J Periodontol* 65(2): 139-46.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M.** (1996). "Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels." *Anal Chem* 68(5): 850-8.
- Shine, B., de Beer, F. C., Pepys, M. B.** (1981). "Solid phase radioimmunoassays for human C-reactive protein." *Clin Chim Acta* 117(1): 13-23.
- Slack, S. M., Cui, Y., Turitto, V. T.** (1993). "The effects of flow on blood coagulation and thrombosis." *Thromb Haemost* 70(1): 129-34.
- Stary, H. C.** (2000). "Natural history and histological classification of atherosclerotic lesions: an update." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(5): 1177-8.
- Steitz, S. A., Speer, M. Y., Curinga, G., Yang, H. Y., Haynes, P., Aebbersold, R., Schinke, T., Karsenty, G., Giachelli, C. M.** (2001). "Smooth muscle cell phenotypic transition associated with calcification: upregulation of Cbfa1 and downregulation of smooth muscle lineage markers." *Circ Res* 89(12): 1147-54.
- Sternik, L., Samee, S., Schaff, H. V., Zehr, K. J., Lerman, L. O., Holmes, D. R., Herrmann, J., Lerman, A.** (2002). "C-reactive protein relaxes human vessels in vitro." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22(11): 1865-8.
- Strawn, W. B., Chappell, M. C., Dean, R. H., Kivlighn, S., Ferrario, C. M.** (2000). "Inhibition of early atherogenesis by losartan in monkeys with diet-induced hypercholesterolemia." *Circulation* 101(13): 1586-93.
- Strony, J., Beaudoin, A., Brands, D., Adelman, B.** (1993). "Analysis of shear stress and hemodynamic factors in a model of coronary artery stenosis and thrombosis." *Am J Physiol* 265(5 Pt 2): H1787-96.
- Suresh, M. V., Singh, S. K., Agrawal, A.** (2004). "Interaction of calcium-bound C-reactive protein with fibronectin is controlled by pH: in vivo implications." *J Biol Chem* 279(50): 52552-7.
- Szalai, A. J., Briles, D. E., Volanakis, J. E.** (1995). "Human C-reactive protein is protective against fatal *Streptococcus pneumoniae* infection in transgenic mice." *J Immunol* 155(5): 2557-63.

Szalai, A. J., VanCott, J. L., McGhee, J. R., Volanakis, J. E., Benjamin, W. H., Jr. (2000). "Human C-reactive protein is protective against fatal *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection in transgenic mice." *Infect Immun* 68(10): 5652-6.

T

Taylor, K. E., Giddings, J. C., van den Berg, C. W. (2005). "C-reactive protein-induced in vitro endothelial cell activation is an artefact caused by azide and lipopolysaccharide." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 25(6): 1225-30.

Taylor, K. E., van den Berg, C. W. (2007). "Structural and functional comparison of native pentameric, denatured monomeric and biotinylated C-reactive protein." *Immunology* 120(3): 404-11.

Torzewski, M., Rist, C., Mortensen, R. F., Zwaka, T. P., Bienek, M., Waltenberger, J., Koenig, W., Schmitz, G., Hombach, V., Torzewski, J. (2000). "C-reactive protein in the arterial intima: role of C-reactive protein receptor-dependent monocyte recruitment in atherogenesis." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(9): 2094-9.

Toschi, V., Gallo, R., Lettino, M., Fallon, J. T., Gertz, S. D., Fernandez-Ortiz, A., Chesebro, J. H., Badimon, L., Nemerson, Y., Fuster, V., Badimon, J. J. (1997). "Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques." *Circulation* 95(3): 594-9.

Turitto, V., Baumgartner HR (1974). "Effect of physical factors on platelet adherence to subendothelium." *Thromb Diath Haemorrh* 60: 17-24.

Turitto, V. T., Baumgartner, H. R. (1975). "Platelet deposition on subendothelium exposed to flowing blood: mathematical analysis of physical parameters." *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 21: 593-601.

V

van Breugel, H. F., de Groot, P. G., Heethaar, R. M., Sixma, J. J. (1992). "Role of plasma viscosity in platelet adhesion." *Blood* 80(4): 953-9.

van den Berg, C. W., Taylor, K. E., Lang, D. (2004). "C-reactive protein-induced in vitro vasorelaxation is an artefact caused by the presence of sodium azide in commercial preparations." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24(10): e168-71.

van Zanten, G. H., de Graaf, S., Slootweg, P. J., Heijnen, H. F., Connolly, T. M., de Groot, P. G., Sixma, J. J. (1994). "Increased platelet deposition on atherosclerotic coronary arteries." *J Clin Invest* 93(2): 615-32.

Varga-Szabo, D., Pleines, I., Nieswandt, B. (2008). "Cell adhesion mechanisms in platelets." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28(3): 403-12.

- Vaughan, C. J., Murphy, M. B., Buckley, B. M.** (1996). "Statins do more than just lower cholesterol." *Lancet* 348(9034): 1079-82.
- Verma, S., Anderson, T. J.** (2002). "Fundamentals of endothelial function for the clinical cardiologist." *Circulation* 105(5): 546-9.
- Verma, S., Szmitko, P. E., Yeh, E. T.** (2004). "C-reactive protein: structure affects function." *Circulation* 109(16): 1914-7.
- Vigo, C.** (1985). "Effect of C-reactive protein on platelet-activating factor-induced platelet aggregation and membrane stabilization." *J Biol Chem* 260(6): 3418-22.
- Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A., Schwartz, S. M.** (2000). "Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(5): 1262-75.
- Volanakis, J. E., Wirtz, K. W.** (1979). "Interaction of C-reactive protein with artificial phosphatidylcholine bilayers." *Nature* 281(5727): 155-7.
- Vondriska, T. M., Zhang, J., Song, C., Tang, X. L., Cao, X., Baines, C. P., Pass, J. M., Wang, S., Bolli, R., Ping, P.** (2001). "Protein kinase C epsilon-Src modules direct signal transduction in nitric oxide-induced cardioprotection: complex formation as a means for cardioprotective signaling." *Circ Res* 88(12): 1306-13.

W

- Walther, C., Gielen, S., Hambrecht, R.** (2004). "The effect of exercise training on endothelial function in cardiovascular disease in humans." *Exerc Sport Sci Rev* 32(4): 129-34.
- Wang, C. H., Li, S. H., Weisel, R. D., Fedak, P. W., Dumont, A. S., Szmitko, P., Li, R. K., Mickle, D. A., Verma, S.** (2003). "C-reactive protein upregulates angiotensin type 1 receptors in vascular smooth muscle." *Circulation* 107(13): 1783-90.
- Wang, S., Tarbell, J. M.** (2000). "Effect of fluid flow on smooth muscle cells in a 3-dimensional collagen gel model." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20(10): 2220-5.
- Weiss, S. J.** (1989). "Tissue destruction by neutrophils." *N Engl J Med* 320(6): 365-76.
- Whitehead, A. S., Bruns, G. A., Markham, A. F., Colten, H. R., Woods, D. E.** (1983). "Isolation of human C-reactive protein complementary DNA and localization of the gene to chromosome 1." *Science* 221(4605): 69-71.
- Witke, W., Sharpe, A. H., Hartwig, J. H., Azuma, T., Stossel, T. P., Kwiatkowski, D. J.** (1995). "Hemostatic, inflammatory, and fibroblast responses are blunted in mice lacking gelsolin." *Cell* 81(1): 41-51.
- Woodside, D. G., Liu, S., Ginsberg, M. H.** (2001). "Integrin activation." *Thromb Haemost* 86(1): 316-23.

X

Xia, D., Samols, D. (1997). "Transgenic mice expressing rabbit C-reactive protein are resistant to endotoxemia." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(6): 2575-80.

Y

Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E. G., McGeer, P. L. (2000). "Human neurons generate C-reactive protein and amyloid P: upregulation in Alzheimer's disease." *Brain Res* 887(1): 80-9.

Yasojima, K., Schwab, C., McGeer, E. G., McGeer, P. L. (2001). "Generation of C-reactive protein and complement components in atherosclerotic plaques." *Am J Pathol* 158(3): 1039-51.

Ying, S. C., Gewurz, H., Kinoshita, C. M., Potempa, L. A., Siegel, J. N. (1989). "Identification and partial characterization of multiple native and neoantigenic epitopes of human C-reactive protein by using monoclonal antibodies." *J Immunol* 143(1): 221-8.

Z

Zhou, J., Werstuck, G. H., Lhotak, S., de Koning, A. B., Sood, S. K., Hossain, G. S., Moller, J., Ritskes-Hoitinga, M., Falk, E., Dayal, S., Lentz, S. R., Austin, R. C. (2004). "Association of multiple cellular stress pathways with accelerated atherosclerosis in hyperhomocysteinemic apolipoprotein E-deficient mice." *Circulation* 110(2): 207-13.

Zouki, C., Beauchamp, M., Baron, C., Filep, J. G. (1997). "Prevention of In vitro neutrophil adhesion to endothelial cells through shedding of L-selectin by C-reactive protein and peptides derived from C-reactive protein." *J Clin Invest* 100(3): 522-9.

Zouki, C., Haas, B., Chan, J. S., Potempa, L. A., Filep, J. G. (2001). "Loss of pentameric symmetry of C-reactive protein is associated with promotion of neutrophil-endothelial cell adhesion." *J Immunol* 167(9): 5355-61.

ANNEX

Durant el transcurs d'aquesta tesi, la doctoranda ha col.laborat en estudis addicionals, que han permès una millor formació investigadora de la doctoranda:

1. Participació en l'estudi proteòmic del mecanisme d'acció de donadors d'òxid nítric sobre la inhibició de l'activació plaquetària. Aquest estudi ha donat lloc a la preparació d'un manuscrit, que es resumeix a continuació:

"High nitric oxide levels block thrombin-induced signaling pathways and cytoskeleton protein translocation in platelets"

Peña E, **Molins B**, Padró T, Vilahur G, Badimon L

Background: Growing insight into the antiplatelet properties of new NO-donors has expanded their potential use in cardiovascular diseases. As such, we have recently reported significant antiplatelet effects without hypotension achieved after oral administration of the exogenous NO donor LA419.

Objective: Our aim was to evaluate the effect of the NO donor LA419 on thrombin induced platelet activation, using proteomic and confocal technologies.

Methods: Platelets were obtained from swine orally treated with a nitrate thiol (0,9 mg/kg) for 8 days and from a placebo group. Washed platelets were stimulated with/without thrombin (0,4 NIH/mL) for 2 minutes, sequentially extracted based on differential protein solubility and studied following proteomic analysis. Results were confirmed by western blot and immunofluorescence.

Results: NO treatment was able to inhibit/block the effect of thrombin in 27 proteins involved in actin assembly, signalling, and metabolic activity. Among them, NO treatment prevented the thrombin-induced translocation of gelsolin, filamin, 14-3-3, PI3K, and grb2.

Conclusions: Our results show that the antithrombotic effects of LA419 are mediated by a pasivation of the platelet response to agonists such as thrombin, by inhibiting mechanisms involved in platelet shape change.

2. Molecular and Experimental Medicine Department, The Scripps Research Institute, La Jolla (CA, USA)

Estada de sis mesos al laboratori del Professor ZM. Ruggeri. Durant aquest temps, la doctoranda va realitzar estudis de caracterització de les propietats biomecàniques de plaquetes artificials polimèriques amb propietats adhesives específiques. Aquest estudi s'ha presentat al XXII Congrés de la Societat Internacional de Trombosi i Hemostàsia (Boston, juliol 2009), i ha donat lloc a un manuscrit adjuntat a continuació:

Effect of Particle Shape on Surface Adhesion Mediated by the von Willebrand Factor-Glycoprotein Iba bond under Flow Conditions

Blanca Molins,^{*1#} Jennifer Orje,^{*1} Sheryl Harvey,² Samir Mitragotri,³ Jeffrey Smith,² Zaverio M. Ruggeri¹

**These two authors contributed equally to the work*

¹Department of Molecular and Experimental Medicine, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA; ²The Burnham Institute, La Jolla, CA; ³Department of Chemical Engineering, University of California, Santa Barbara, CA

[#]Blanca Molins current address is: Centre d'Investigació Cardiovascular CSIC-ICCC, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Pavelló del Convent Sant Antoni Maria Claret, 167, 08025 Barcelona, Spain

Introduction

Platelets are circulating cell fragments derived from the cytoplasm of bone marrow-resident megakaryocytes that play an essential role in hemostasis (1, 2), the defense mechanism that prevents blood loss (hemorrhage) when the continuity of the vascular tree is interrupted by traumatic injury to tissues. Platelets exert this function by surveying the integrity of the vascular system and adhering where alterations of the endothelial cell lining are detected. Moreover, the adhesive properties of platelets contribute to maintaining vascular integrity and to host defense from external pathogens (3).

After the initial attachment to the injured vessel wall, adherent platelets can rapidly recruit to the site of injury additional platelets necessary to form the hemostatic plug, which also contains abundant fibrin formed through the coagulation cascade. All these functions depend on regulated adhesive properties and, as they develop in flowing blood, are influenced by fluid dynamic parameters. Platelets and the hemostatic system, however, cannot discriminate between alterations of the vessel wall caused by traumatic wounds and those resulting from pathologic processes. As a consequence, chronic vascular diseases can acutely induce massive platelet responses, usually initiated by the occurrence of destabilizing events

such as the sudden rupture of an atherosclerotic plaque, which lead to the formation of intravascular occluding aggregates and fibrin clots (thrombi) (4). Under such circumstances, the same processes that underlie the beneficial hemostatic function become a life-threatening disease mechanism that, by curtailing the supply of blood to vital organs, may cause ischemic syndromes of the heart and brain leading to death.

One of the key adhesive interactions supporting platelet function is mediated by the binding of platelet glycoprotein (GP) Iba, the main functional component of the GPIb-IX-V receptor complex, to the von Willebrand Factor (VWF) A1 domain (VWF-A1). This bond allows the initial tethering of platelets to an injured vessel wall even under elevated shear stress and is thought to be uniquely specific owing to the restricted expression of GPIba in the megakaryocytic lineage (5, 6). Thus, the interacting domains of VWF and GPIba involved in the bimolecular interaction should represent useful anchoring sensors to direct nanodevices to sites of ongoing thrombus formation. To test this hypothesis, we have coated plastic microparticles (MPs) incorporating a fluorescent dye with isolated recombinant domains representing VWF-A1 (residues 445-733 of the mature human VWF subunit) or the amino terminal domain of GPIba (GPIb-N, residues -2-288 of the native human

sequence). We engineered these proteins in a dimeric configuration (dVWF-A1 and dGPIb-N) in order to mimic more closely the corresponding native functional conformations (Fig. 1).

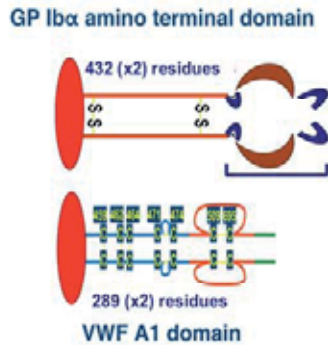


Figure 1. Schematic representation of the VWF-A1 domain fragment and of the GPIIb amino terminal domain fragment used in the targeting experiments. Note that the former is a dimer in its native configuration, while the latter was dimerized as a chimeric molecule using residues -2-288 of human GPIIb and a carboxyl terminal extension of 132 residues from a constitutively dimeric viral protein. Proteins were coated on spherical or, as shown here by red ellipsoids, on platelet-shaped plastic microparticles incorporating a fluorescent dye.

With the ultimate goal of using specifically targeted micro- and nanoparticles to incorporate engineered devices into forming thrombi in vivo, we started the characterization of the biomechanical properties of the VWF-GPIIb bond and, specifically, to investigate how particle shape might affect the initiation and lifetime of adhesive interactions.

Methods

Preparation of microparticles of different shape. Microparticles were made from polystyrene beads with a diameter of 1 μm , and used in their original spherical shape or stretched to form ellipsoids with a 2:1 diameter ratio. The particles incorporated a red fluorescent dye and were coated with dVWF-A1 or dGPIIb-N. Binding sites on the plastic surface were saturated with bovine serum albumin (BSA).

Preparation of recombinant dVWF-A1 and dGPIIb-N domains. A recombinant human VWF fragment comprising residues 445-733 of the mature subunit was expressed in stably

transfected *D. melanogaster* cells using the vector pMT/BiP/V5-HisA (Invitrogen, Carlsbad, CA). The expressed protein contained a six His sequence at the carboxyl terminal end of the coding sequence to facilitate purification. The general methodology used for vector preparation was similar to that previously described for expression in Chinese hamster ovary (CHO) cells (7). Human recombinant GPIIb -2-288 was expressed in the same insect cell system used for dVWF-A1, using a vector derived from one previously described for expression in CHO cells (8). The human GPIIb sequence was fused on the carboxyl terminal side with partial sequence from the large T antigen (TALA) of the simian virus 40 (SV40). This chimeric construct was secreted constitutively as assembled dimers, which were first identified in transfected CHO cells as a result of spontaneous recombination (8). Expressed proteins were purified by metal-ion affinity chromatography (IMAC) as previously described for His-tagged proteins from conditioned medium containing free copper ions (9). The final purification step to separate dimeric from unassembled monomeric fragment was performed by gel-permeation chromatography on a Superdex 200 column. Protein concentration was measured with the BCA Protein Assay reagent (Pierce, Rockford, IL) using bovine serum albumin (BSA) as a standard. SDS polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) was performed using 4–20% gels. Assays showed that dVWF-A1 and dGPIIb-N were at least 90% homogeneous.

Perfusion experiments. Adhesion studies under flow conditions were performed using blood drawn in D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginine chloromethyl ketone dihydrochloride (PPACK; 80 μM final concentration) to inhibit α -thrombin. Plasma was removed by centrifugation and replaced with 50 mg/mL BSA to maintain blood viscosity. The number of platelets was decreased to <3% by differential centrifugation and prostaglandin (PG) E_1 was added to prevent platelet activation. MPs coated with dVWF-A1 or dGPIIb-N were mixed with the washed blood and perfused over immobilized dGPIIb-N or dVWF-A1, respectively, in a parallel plate flow chamber. MP adhesion to and rolling onto the surface was recorded in real time and subsequently analyzed to determine the extent of surface coverage and

the bond lifetime (off rate) at various levels of wall shear rate (γ_w). In separate experiments, to study incorporation into a platelet thrombus, we added MPs into whole blood drawn in PPACK and perfused the mixture over a surface coated with collagen type I fibrils.

Analysis of flow studies: Measurement of contact events and residence times. The interaction between targeted particles and the chosen adhesive substrate immobilized onto a surface was studied using a parallel plate perfusion chamber in which a glass coverslip coated with the adhesive substrate formed the lower surface. A silicone rubber gasket determined a flow path height between this and the upper plate made of non-reactive plastic. The chamber was assembled, filled with Hepes-buffered saline (HBS, composed of 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid and 135 mM NaCl, pH 7.4), and mounted on the stage of an inverted microscope. To allow a laminar flow to become established in the flow chamber, the channel length, l , has to be greater than $\beta \cdot h \cdot Re$, where β is a numeric factor of ~ 1.8 , h is the channel height and Re is the Reynolds number. Re , in turn, is $\rho \cdot Q / (w \cdot \eta)$, where Q is the volumetric flow rate, ρ and η denote the density and viscosity of the fluid, and w is the channel width. We used a chamber with a flow channel 2.8 cm long, 2 mm wide, and 127 μm high. A syringe pump (Harvard Apparatus, Holliston MA) and silicone tubing connections were used to aspirate blood through the chamber at a constant flow rate calculated to give the desired wall shear rates, $\gamma_w = 6Q / (w \cdot h^2)$. Surface events were analyzed in real-time with an analogic silicone-intensified target (SIT) videocamera (Hamatsu Corporation USA, Bridgewater, NJ) at a sampling rate of 30 frames per second and recorded digitally.

Recorded images were analyzed with customized software based on the Metamorph (Universal Imaging, West Chester, PA) or Image J (free from NIH at: <http://rsb.info.nih.gov/ij/download/>) software packages. After correcting for uneven illumination of the background, a threshold was applied to distinguish the particles from the background. The position of the centroid of each particle was calculated in every frame, and their relative coordinates (x and y) were measured.

Particle recognition across the sequence of images was performed using a tailored particle-tracking program, which allowed measuring the interaction times between particles and surface-immobilized adhesive substrate (i.e., residence time or duration of a transient tether). A transient tether is defined as a particle that remains stationary on the surface for a defined period of time before resuming free-flow velocity.

Measurement of particle incorporation into platelet aggregates. These experiments were performed by adding particles that incorporated a red fluorochrome (typically, excitation at 540 nm and emission at 580 nm) into whole blood in which platelets were rendered fluorescent by incorporation of a green fluorochrome (typically mepacrine; excitation at 488 nm and emission at 515 nm). Platelet aggregate formation and particle deposition was monitored in real time using confocal videomicroscopy. In this case, real time recording obtained as described above was integrated by the collection of stacks of confocal z-sections at defined time points. Spatial resolution in the z-axis was set at 1 μm , corresponding approximately to the diameter of analyzed particles. The total particle relative to platelet volume deposited on the surface was measured from the z-sections as an interpolation of surface coverage and height determined separately for the two fluorescence channels. In brief, each confocal plane (optical section) was analyzed to determine the number of pixels with signal above background, as determined by an applied threshold using an unbiased algorithm (automatic threshold); this represents the surface coverage (total object area) in that plane. The volume was obtained by multiplying the object area in a given plane by the height, i.e. the z interval between adjacent planes. The sum of these "section" volumes represents the total volume, which is a reflection of the number of particles within a thrombus. The ratio between particle volume and platelet volume provides a measure of the targeting efficiency for a given particle.

Statistical analysis. Each experiment was repeated at least twice. One-way ANOVA was used to compare the average of multiple (>2) unmatched experimental groups for data distributed normally, and the Kruskal-Wallis test

(non parametric) was used for data not distributed normally or in case of ambiguous distribution. An appropriate multiple comparisons test (Bonferroni following ANOVA and Dunns following Kruskal-Wallis) was then used for evaluating the significance of differences between selected pairs of experimental groups. Statistical significance was set at a P-value <0.05, and all tests were two-tailed.

Results

Coating of Microparticles and adhesive substrate. We first determined the conditions to coat microparticles with dVWF-A1 or dGPIb-N by passive adsorption. Flow cytometric analysis revealed that beads could be coated with both protein fragments, although dVWF-A1 reproducibly yielded a more homogeneous population with a higher density of protein per particle (Fig. 2). There was no difference in the coating of particles of different shape, spherical or elliptical.

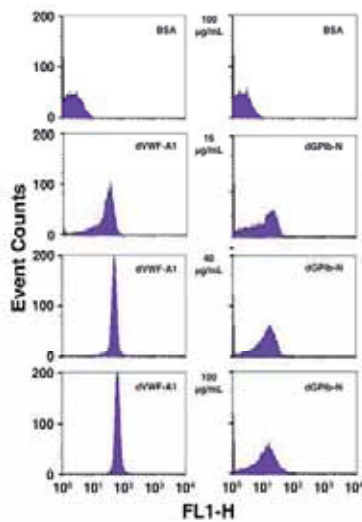


Figure 2. Coating of elliptical MPs with dVWF-A1 or dGPIb-N. Protein solution at the indicated concentrations in Hepes buffer, pH 7.4, was incubated with MPs for 2 h at room temperature. After washing, MPs were incubated with specific mouse monoclonal antibodies against dVWF-A1 or dGPIb-N, followed by fluoresceinated rabbit anti-mouse IgG and flow-cytometric analysis.

The highest protein density on the MP surface was achieved with a coating solution concentration of ~ 40 $\mu\text{g/mL}$, and the optimal pH for coating was 7.4 (Fig. 3). To determine quantitatively the number of molecules bound per microparticle we used monovalent Fab fragments generated from high affinity monoclonal antibodies against dVWF-A1 (antibody NMC4) or dGPIb-N (antibody LJ-P3); both antibodies have been characterized previously (10, 11). We found that, under these conditions, the maximal surface density achieved with dGPIb-N was ~ 8 -fold lower than with dVWF-A1, i.e. 600 as opposed to 5,000 molecules per particle (Fig. 3).

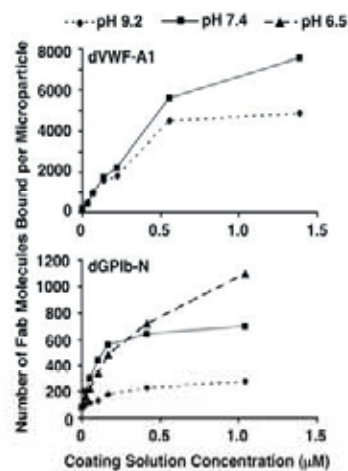


Figure 3. Determination of the number of molecules adsorbed onto the surface of spherical MPs. Coating with dVWF-A1 or dGPIb-N was done as described in the legend to Fig. 2 at three different pH values, as indicated. Specific monovalent Fab fragment fluoresceinated at a known fluorescein to protein ratio was then added. After incubation and washing, MPs were analyzed by flow cytometry, and the number of Fab molecules bound per microparticle was calculated on the basis of instrument calibration with beads having known molecular equivalent of soluble fluorescein value and the measured fluorescein/protein ratio of the monovalent Fab fragment.

Using a similar approach we determined the coating density achieved with dVWF-A1 and dGPIb-N on the glass surface used at the bottom of the perfusion chamber onto which adhesive events were visualized. In this case, the glass slide was covered with protein solution and incubated

for 1 hour at room temperature. The surface was then washed and incubated for 1 hour with the appropriate fluoresceinated monovalent Fab fragment. After further washing, bound antibody was detected with a fluorescence plate reader. Even in this case there was a more efficient coating with dVWF-A1, and the number of molecules on the surface was ~two-fold greater than with dGPIb-N (Fig. 4).

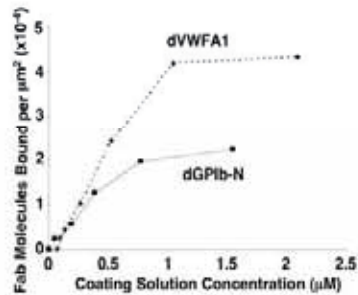


Figure 4. Coating of the flow chamber surface with dVWF-A1 or dGPIb-N. The number of specific Fab molecules bound to the surface was measured as a function of the coating solution concentration for both dVWF-A1 and dGPIb-N.

Adhesion of Microparticles to Purified Substrates. In these experiments, the glass surface of the flow chamber was coated with dVWF-A1 or dGPIb-N, and MPs coated with the cognate ligand, dGPIb-N or dVWF-A1, respectively, were added (1,000-5,000/ μL) to a suspension of washed blood cells and perfused through the chamber at selected wall shear rates. The number of microparticles used varied depending on the selected flow condition, as fewer were needed at the lower shear rates to achieve surface saturation. We wanted to avoid having an excessive number of adherent MPs as this could make computer-assisted individual particle tracking less reliable. Experiments were performed separately with spherical or elliptical MPs. In spite of the difference in surface density, the adhesive properties of MPs coated with dGPIb-N or dVWF-A1 were similar at the lower shear rate of 5,000 s^{-1} when elliptical MPs were used (Fig. 5). In contrast, spherical MPs coated with dVWF-A1 adhered in significantly greater number than those coated with dGPIb-N when the

ligand density on the surface was maximal (Fig. 5). This indicates that the number of bonds formed can influence the efficiency of particle tethering to the surface as a function of particle shape.

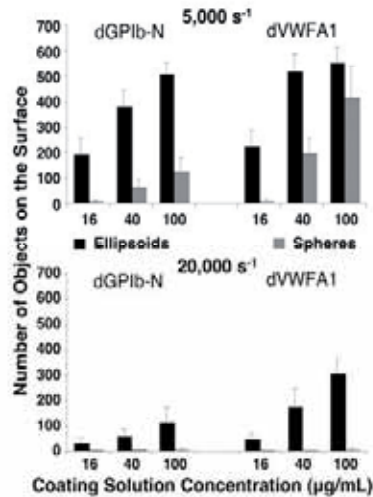
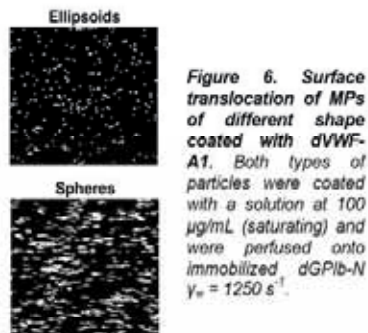


Figure 5. Microparticle adhesion to an adhesive substrate as a function of shear rate and particle shape. The molecule used for coating the particles is indicated; the cognate ligand is immobilized onto the bottom of the perfusion chamber. Elliptical and spherical MPs were tested under equivalent coating conditions at two different shear rates, as indicated. The protein concentration of the solution used to coat the microparticles is shown; the flow chamber surface was coated at saturation for both dVWF-A1 and dGPIb-N (see Fig. 4). The results are the average of at least two experiments; the standard error of the mean is shown.

Findings were different at the higher γ_w of 20,000 s^{-1} . In this situation, only elliptical MPs could establish an adhesive interaction with the flow chamber surface, and those coated with dVWF-A1 adhered in significantly greater number than those coated with dGPIb-N ($P = 0.02$; Fig. 5).

As typical of adhesion mediated by the VWF-A1/GPIIb/IIIa bond, MPs interacting with the surface were not irreversibly attached, but displayed translocation in the direction of flow in a proportion and with a velocity that varied as a function of γ_w value and was also greatly influenced by the shape of the particle. This

behavior was apparent while analyzing particle-surface interactions in real time, but can also be demonstrated in a static image by superposing series of successive frames from real time recordings (30 frames per second) and performing a “maximum” operation based on pixel intensity, creating a single image in which each pixel represents the maximum value observed for that position throughout the entire series of frames (Fig. 6). In this manner, moving particles are seen as “streaks” the length of which is a function of translocation velocity, while non-moving particles appear as “dots” (Fig. 6). This analysis demonstrated that, at equivalent surface ligand density, spherical MPS translocate with a significantly faster velocity than elliptical ones.



The influence of ligand surface density and particle shape on the stability of adhesion was evaluated quantitatively by using MPs coated with different concentrations of dVWF-A1 perfused over a surface presenting maximal density of dGPIb-N. To obtain an estimate of the stability of adhesive bonds, we measured the time required for each MP attached to surface to move from the initial contact position, defined as the time required for the centroid of the object to fall outside of the perimeter outlined by the initial area of contact. At each of the three different ligand densities used, obtained with coating solution concentrations of 16, 40 and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (see Fig. 3), elliptical MPs established a significantly more stable adhesion to the surface than equivalent spherical MPs. This was seen at the two γ_w values tested, 1,250 and 5,000 s^{-1} . For example, elliptical MPs with the highest ligand

density perfused at $\gamma_w = 1,250 \text{ s}^{-1}$ exhibited long-lasting attachment to the surface, essentially stable for all the particles during the observation period; in contrast, spherical MPs always showed significantly shorter adhesion times such that, even with the highest ligand density and at $\gamma_w = 1,250 \text{ s}^{-1}$, half of the adherent particles detached from the initial contact site in 20 seconds (Fig. 7). The shorter contact time of spherical as compared to elliptical MPs became even more apparent with increasing shear rate (Fig. 7).

Microparticle Incorporation into Platelet Aggregates. We performed these experiments to begin to assess whether MPs coated with adhesive molecules that support platelet adhesion to the vessel wall can be used to target forming platelet

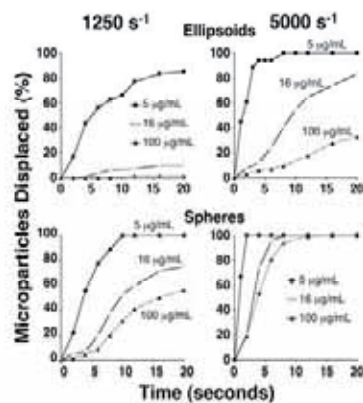


Figure 7. Quantitative evaluation of the stability of MP-surface contacts. Elliptical or spherical MPs were coated with dVWF-A1 at the indicated coating solution concentrations and perfused over immobilized dGPIb-N at the indicated shear rates. The duration of each stable contact was measured for all MPs that became adherent during the observation period. Displacement expressed as percentage of the total number of established adhesive contacts is inversely related to the stability of interaction (i.e. stable adhesion after initial contact corresponds to 0% displacement). Note that, under all conditions, elliptical MPs establish more stable contacts than equivalent spherical MPs, as shown by the lower percentage of displacement. As expected, increasing surface ligand density results in decreasing displacement.

aggregates, i.e. areas of ongoing arterial thrombosis. For this purpose, we added elliptical MPs (6,000/ μL final count) into whole human blood (containing 40 PPACK anticoagulant) and perfused the mixture over a surface of fibrillar collagen Type I at $\gamma_w = 1,500 \text{ s}^{-1}$, corresponding to the value in the arteriolar microcirculation. The microparticles were coated with dGPIb-N, normal dVWF-A1 (WT) or, as a control for specificity, the loss-of-function mutant, G561S, which has essentially absent GPIb-binding function. As an additional specificity control we also used MPs coated with human serum albumin (HSA). To visualize forming aggregate on the collagen surface, platelets were rendered fluorescent in the green channel by addition of 10 μM quinacrine hydrochloride. Platelet aggregate formation and MP deposition were monitored in real time by confocal videomicroscopy. Stacks of z-section with a z-axis resolution of 1 μm were collected after 5 min of perfusion in separate channels: green fluorescence (platelets; filter set: excitation 488 nm, emission 515 nm) and red fluorescence (MPs; filter set: excitation 540 nm; emission 580 nm). The total MP relative to platelet volume deposited on the surface was measured from the z-sections as an interpolation of surface coverage and height. The results were consistent in different experiments and showed a significantly greater incorporation of MPs targeted with dVWF-A1 as compared to dGPIb-N (13% vs. 6.2%; Fig. 8). Specificity was demonstrated by

the low incorporation of MPs targeted with the loss-of-function mutant dVWF-A1/G561S (4.5%) or human serum albumin (HSA, 2%). Altogether, these experimental results show that microparticles coated with dVWF-A1 are incorporated more efficiently than those coated with dGPIb-N (targeting VWF) into platelet aggregates forming upon perfusion of whole blood over collagen type I fibrils.

Discussion

The results of these studies demonstrate that recombinant adhesive domains can be used to endow synthetic microparticles with functional activities typical of blood platelets. The unique biomechanical properties of these particles allow interrogation of important determinants of function, such as the influence of ligand coating density and particle shape on the stability of adhesive bonds. Here we show that MPs with elliptical shape, chosen to mimic that of anucleated mammalian platelets, have a significant functional advantage over spherical MPs at equivalent conditions of ligand surface density and fluid dynamic environment. There may be two main reasons to explain this finding, and they are not mutually exclusive. One relates to the greater interactive surface that an elliptical particle can establish with a planar surface presenting an appropriate cognate ligand. This is an intuitive consequence of the different radius of

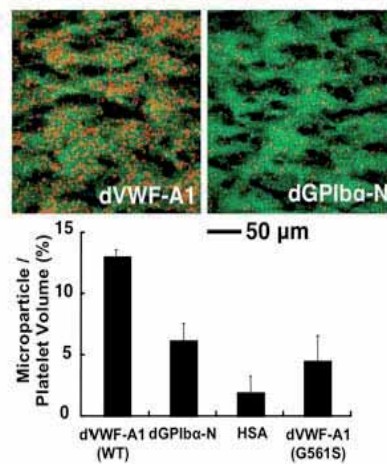


Fig. 8. Incorporation of targeted MPs into platelet aggregates formed upon perfusion of whole human blood (containing 10 μM mepacrine to label platelets) onto fibrillar collagen type I for 5 min at 37 $^{\circ}\text{C}$, γ_w 1,500 s^{-1} . The images on top show a 3-D reconstruction from stacks of z-sections through the height of thrombi. Platelets appear in green, MPs in red (left, coated with dVWF-A1; right, coated with dGPIb-N), merge in yellow. The graph on the bottom shows the quantitative incorporation of MPs into platelet aggregates. Volumes of the two components were measured from the z-sections over the surface corresponding to a field of view; the volume of MPs is shown as percentage of the volumes of platelets for MPs coated as indicated. HSA = human serum albumin.

curvature of the elliptical particle relative to the spherical one in relation to the orientation that the two assume in flow. The other explanation relates to the lesser drag imposed by fluid flow on an elliptical as compared to a spherical particle adherent to the surface through a tethering bond. This is a consequence of the smaller section presented by the elliptical as compared to the spherical particle in the plane perpendicular to the direction of flow. The consequence of this shape difference would predictably be a decreased tensile stress on the tethering bond, which in turn should favor a slower off-rate as compared to the same bond subjected to a greater tensile stress. It is obvious that both consequences of the elliptical shape, i.e. the possibility of forming a greater number of adhesive bonds and the lesser tensile stress on the formed bond, can independently or, even more so, concurrently lead to more stable surface contacts. Such a conclusion is fully supported by all our experimental findings, but evidence to define the relative importance of bond number vs. decreased off-rate remains to be obtained and is the topic of ongoing research.

As a biologically relevant consequence of these studies, we have also demonstrated that synthetic microparticles can efficiently target forming platelet thrombi. This has mechanistic as well as practical implications. Micro- or nano-devices that can target platelet thrombi could be used for diagnostic purposes to reveal the existence of vulnerable lesions in locations such as the coronary or cerebral arteries; they could be used for the local delivery of therapeutic agents in high concentrations for enhanced efficacy of treatments such as thrombolysis; and they could be coupled to specific chemical or physical probes to report on local conditions of the vessel wall that, in turn, could explain the progression of pathological processes.

References

1. Weiss, H.J. 1975. Platelet physiology and abnormalities of platelet function (First of two parts). *New England Journal of Medicine* 293:531-541.
2. Weiss, H.J. 1975. Platelet physiology and abnormalities of platelet function (Second of two parts). *New England Journal of Medicine* 293:580-588.
3. Ruggeri, Z.M., and Mendolicchio, G.L. 2007. Adhesion Mechanisms in Platelet Function. *Circulation Research* 100:1673-1685.
4. Ruggeri, Z.M. 2002. Platelets in atherothrombosis. *Nature Medicine* 8:1227-1234.
5. Savage, B., Saldivar, E., and Ruggeri, Z.M. 1996. Initiation of platelet adhesion by arrest onto fibrinogen or translocation on von Willebrand factor. *Cell* 84:289-297.
6. Savage, B., Almus-Jacobs, F., and Ruggeri, Z.M. 1998. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell* 94:657-666.
7. Azuma, H., Dent, J.A., Sugimoto, M., Ruggeri, Z.M., and Ware, J. 1991. Independent assembly and secretion of a dimeric adhesive domain of von Willebrand factor containing the glycoprotein Ib-binding site. *Journal of Biological Chemistry* 266:12342-12347.
8. Marchese, P., Saldivar, E., Ware, J., and Ruggeri, Z.M. 1999. Adhesive properties of the isolated amino terminal domain of platelet glycoprotein Iba in a flow field. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96:7837-7842.
9. Lehr, R.V., Elefante, L.C., Kikly, K.K., O'Brien, S.P., and Kirkpatrick, R.B. 2000. A modified metal-ion affinity chromatography procedure for the purification of histidine-tagged recombinant proteins expressed in drosophila S2 cells protein express. *Protein Expression and Purification* 19:362-368.
10. Celikel, R., Madhusudan, Varughese, K.I., Shima, M., Yoshioka, A., Ware, J., and Ruggeri, Z.M. 1997. Crystal structure of NMC-4 Fab anti-von Willebrand Factor A1 domain. *Blood Cells, Molecules, and Diseases* 23:124-134.
11. Handa, M., Titani, K., Holland, L.Z., Roberts, J.R., and Ruggeri, Z.M. 1986. The von Willebrand factor-binding domain of platelet membrane glycoprotein Ib. Characterization by monoclonal antibodies and partial amino acid sequence analysis of proteolytic fragments. *Journal of Biological Chemistry* 261:12579-12585.