

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE BIOLOGIA  
DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

Tesi doctoral presentada per Na.

**ESTHER PEÑA SENDRA**

amb el títol:

***“Sistema fibrinolítico, plasmina y  
metaloproteasas en la arteriosclerosis”***

per a l'obtenció del títol de

**DOCTORA EN BIOLOGIA**

*Barcelona, 28 de novembre de 2001*

---

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>Significado y epidemiología actual de la arteriosclerosis</b> .....	3
<b>Sistema arterial</b> .....	4
Intima .....	4
Media .....	4
Adventicia .....	4
<b>Clasificación de las arterias según su calibre</b> .....	5
Arterias de gran calibre .....	5
Arterias de mediano calibre .....	5
Arterias de pequeño calibre .....	6
<b>Fisiopatología de la arteriosclerosis</b> .....	7
Teorías .....	7
<b>Factores de riesgo cardiovascular</b> .....	10
Edad y Sexo .....	10
Herencia .....	11
Dislipemia .....	11
Lipoproteína (a) .....	12
Hipertensión .....	12
Tabaco .....	13
Obesidad .....	14
Diabetes .....	14
Homocisteinemia .....	15
Hiperuricemia .....	15
Vida Sedentaria .....	16
Fibrinógeno .....	16
Factores de coagulación .....	17
Factor VII .....	17
Factor VIII/factor von Willebrand .....	17
Inhibidores y Activadores de la coagulación .....	17
Plaquetas .....	18

Factores fibrinolíticos .....	18
<b>Elementos de la pared arterial que intervienen en la lesion arteriosclerótica .....</b>	<b>19</b>
Células fijas .....	19
Células Endoteliales .....	19
Células Musculares Lisas .....	22
Células circulantes .....	23
Monocitos-Macofagos .....	23
Linfocitos-T .....	25
Granulocitos y mastocitos .....	26
Plaquetas .....	26
Matriz extracelular .....	29
Componentes .....	29
Colágeno .....	30
Tipos y distribución .....	30
Síntesis .....	30
Patología .....	31
Fibras elásticas .....	31
Distribución y propiedades .....	31
Síntesis .....	32
Patología .....	32
Proteoglicanos/Hialuronano .....	33
Síntesis .....	33
Patología .....	33
Glicoproteínas .....	34
Fibronectina .....	34
Laminina .....	34
Trombospondina .....	34
Tenascina .....	34
Osteopontina .....	34
<b>Origen y evolución del ateroma .....</b>	<b>36</b>
Clasificación de la lesion arteriosclerótica .....	45
<b>Fibrinógeno .....</b>	<b>46</b>
Estructura .....	46

Fisiopatología .....	48
Influencia de los genes y el medio ambiente en los niveles de fibrinógeno .....	51
<b>Fibrinogeno y hemostasia</b> .....	<b>52</b>
Coagulación .....	52
Sistema Extrínseco .....	52
Via Plaquetar .....	53
Via Intrínseca .....	54
Inhibidores de la coagulación .....	54
Sistema fibrinolítico .....	57
Plasminógeno .....	58
Activadores del plasminogeno .....	60
Activador tisular del plasminogeno .....	60
Activador tipo uroquinasa .....	61
Receptor del activador tipo uroquinasa .....	62
Inhibidores de la fibrinólisis .....	64
Inhibidores de los activadores de plasminogeno.....	64
Inhibidores de la plasmina .....	64
$\alpha$ 2-antiplasmina .....	64
<b>Fisiopatología de la fibrinólisis</b> .....	<b>65</b>
<b>Sistema hemostático y arteriosclerosis</b> .....	<b>70</b>
<b>Metaloproteasas</b> .....	<b>71</b>
Introducción .....	71
Estructura .....	72
Substratos y nomenclatura .....	75
Colagenasas.....	75
Estromelisinias .....	77
Gelatinasas .....	77
Metaloproteasas de Membrana .....	78

Activacion .....	81
Inhibición .....	83
Regulación de la producción de MMPs .....	84
Papel de las MMPs en la arteriosclerosis .....	84
MMP y angiogenesis .....	88
MMPs y plasminógeno .....	89
MMPs y rotura de la placa .....	90
Interrelacion de las MMPs y el sistema fibrinolítico .....	92
<b>HIPÓTESIS</b> .....	95
<b>OBJETIVOS</b> .....	99
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	103
<b>Selección y características de los pacientes donadores</b> .....	105
<b>Descripción de la extracción quirúrgica de las muestra</b> .....	106
<b>Características de las muestras</b> .....	106
<b>Extracción de la muestra de sangre</b> .....	108
<b>Procesamiento de las muestras</b> .....	108
<b>Diseño experimental</b> .....	109
<b>Valoraciones en fragmentos arteriales</b> .....	110
Actividad fibrinolítica de la pared arterial .....	110
Actividad fibrinolítica de la superficie de la pared .....	110
Capacidad generadora de plasmina .....	110
Preparación del coágulo laminar de fibrina .....	110
Valoración frente a uroquinasa .....	112
Activadores e inhibidores de la fibrinólisis .....	112
t-PA .....	112
u-PA .....	112
PAI-1 .....	112
Evaluación de metaloproteasas .....	113
Estudio zimográfico .....	113
Western Blot .....	114
<b>Estudio Histológico</b> .....	117
Cortes por congelación .....	117
Estudio de lípidos .....	117
Tinción por inmunofluorescencia	

del fibrinógeno-fibrina .....	117
Cortes por parafina .....	118
Estudio de la pared del vaso .....	118
<b>Valoraciones en sangre</b> .....	119
Elementos formes .....	119
<b>Valoraciones en plasma</b> .....	119
Evaluación del fibrinógeno .....	119
Fibrinógeno antigénico .....	119
Fibrinógeno von-Clauss .....	120
Productos de degradación de la fibrina .....	120
Fibrinopeptido A .....	120
Dímero D .....	120
Activadores e inhibidores de la fibrinolisis .....	121
t-PA .....	121
u-PA .....	121
PAI-1 .....	122
<b>Métodos estadísticos</b> .....	122
 <b>RESULTADOS</b> .....	 123
<b>Arteriales</b> .....	125
Estudio histológico .....	125
Clasificación de las muestras .....	125
Estudio bioquímico .....	129
Parámetros fibrinolíticos .....	129
Actividad fibrinolítica de la pared arterial .....	129
Capacidad generadora de plasmina de la pared arterial .....	130
Activadores e inhibidores de la fibrinolisis .....	131
Valoración de la actividad gelatinolítica de las metaloproteasas .....	132

---

Fibrinógeno en pared .....	134
Correlaciones entre parámetros de la pared arterial .....	136
Actividad fibrinolítica de las superficies arteriales .....	136
Capacidad generadora de plasmina de la pared arterial .....	136
Activadores e inhibidores de la fibrinólisis .....	137
Estudio Plasmático .....	139
Parámetros fibrinolíticos .....	139
Dímero D, fibrinopeptido A y fibrinógeno .....	140
Células blancas .....	142
Correlaciones entre parámetros plasmáticos .....	143
Activadores e inhibidores de la fibrinólisis .....	143
Dímero D, fibrinopeptido A y fibrinógeno .....	144
Factores de riesgo .....	146
<b>Sectores arteriales: carótida, aorta y femoral .....</b>	<b>150</b>
Estudio histológico .....	150
Clasificación de las muestras .....	150
Estudio bioquímico .....	151
Parámetros fibrinolíticos .....	151
Actividad fibrinolítica de la pared arterial .....	151
Capacidad generadora de plasmina de la pared arterial .....	152
Activadores e inhibidores de la fibrinólisis .....	153
Identificación de la actividad gelatinolítica de las metaloproteasas .....	156
Valoración de la actividad gelatinolítica .....	156
Fibrinógeno en pared arterial .....	159
Correlaciones de parámetros de la pared arterial .....	161
Actividad fibrinolítica de la pared arterial .....	161
Capacidad generadora de plasmina de la pared arterial .....	162
Activadores e inhibidores de la fibrinólisis .....	163

Estudio Plasmático .....	165
Parámetros fibrinolíticos .....	165
Dímero D, fibrinopeptido A y fibrinógeno .....	167
Células blancas .....	172
Correlaciones entre parámetros plasmáticos .....	176
Activadores e inhibidores de la fibrinolisis .....	176
Dímero D, fibrinopeptido A y fibrinógeno .....	177
Correlaciones entre parámetros plasmáticos y tisulares .....	179
Factores de riesgo .....	181
Arteria carótida .....	181
Arteria aorta .....	182
Arteria femoral .....	183
Diferencias entre factores de riesgo de carótida, aorta y femoral .....	184
Diferencias entre carótida, aorta y femoral .....	185
<b>DISCUSIÓN</b> .....	187
<b>Tejido</b> .....	189
Clasificación morfológica de las muestras .....	189
Actividad de la superficie arterial (endotelio, adventicia) .....	189
Capacidad generadora de plasmina por la pared arterial .....	190
Activadores e inhibidores de la fibrinolisis .....	192
Metaloproteasas .....	194
Fibrinógeno en pared .....	197
<b>Plasma</b> .....	198
Activadores e inhibidores de la fibrinolisis .....	198
Dímero D .....	200
Fibrinopeptido A .....	203
Leucocitos, linfocitos, monocitos .....	203
Fibrinógeno .....	204
<b>Correlaciones plasma tejido</b> .....	2
PAI plasmático-PAI tisular .....	2
Fibrinógeno plasmático-fibrinógeno tisular .....	2

<b>Factores de riesgo .....</b>	<b>2</b>
<b>Variaciones entre carótida, aorta y femoral .....</b>	<b>2</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>213</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>217</b>

## ABREVIATURAS

---

- **α1-AT** α1-antitrombina.
- **ADP** Adenosin difosfato.
- **aFGF** Factor ácido de crecimiento de fibroblastos.
- **AG** Antígeno.
- **ATP** Adenosin trifosfato.
- **AVC** Accidente vascular cerebral.
- **B12** Vitamina B12.
- **B6** Vitamina B6.
- **bFGF** Factor básico de crecimiento de fibroblastos.
- **CCR2** Receptor para MCP-1 en monocitos.
- **CD40L** Ligando de CD40, en linfocitos T.
- **cDNA** Ácido desoxiribonucleico codificante.
- **CMH** Complejo mayor de histocompatibilidad.
- **CML** Células musculares lisas.
- **COX-2** Ciclooxygenasa-2.
- **CSA** Condroitin Sulfato.
- **CSPG** Versicán.
- **DD** Dímero-D.
- **DG** Diacilglicerol.
- **DNA** Ácido desoxiribonucleico.
- **DS** Dermatán sulfato.
- **DSPG** Decorín.
- **ECGF** Factor de crecimiento de las células endoteliales.
- **EDHF** Factor hiperpolarizante derivado del endotelio.
- **ELAM** Molécula de adhesión endotelial de leucocitos.
- **ELISA** Ensayo inmunoabsorbente con enzima conjugado.
- **ET** Endotelinas.
- **ET-1** Endotelina 1.
- **FGF** Factor de crecimiento de fibroblastos.
- **FPA** Fibrinopeptido A.
- **FPB** Fibrinopeptido B.
- **GTP** Guanidil trifosfato.
- **HDL** Lipoproteínas de alta densidad.
- **HMW** Fibrinógeno de alto peso molecular.
- **HMWK** Quiminógeno de alto peso molecular.
- **HPS** Heparinoides.
- **HRP** Peroxidasa de rábano.
- **HS** Heparán sulfato.
- **HSPG** Perlecán.
- **ICAM** Molécula de adhesión intercelular.
- **IFN-γ** Interferón-γ.
- **Ig** Inmunoglobulina.
- **IGF-1** Factor-1 de crecimiento parecido a la insulina.
- **IgG** Inmunoglobulina G.
- **IIBB-CSIC** Instituto de Investigaciones Biomédicas de Barcelona-Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- **IL** Interleucina.
- **IP-10** Proteína 10.
- **IP-3** Inositol 1,4,5-trifosfato.
- **ISAC** Especificidad Inmunológica y control preciso.
- **I-TAC** Quimioatrayente de células T.
- **kD** Kilo daltons.
- **KS** Queratán sulfato.
- **KSPG** Lumicán.
- **L1** Arterias con lesión 1 (inicial).
- **L2** Arterias con lesión 2 (moderada).
- **L3** Arterias con lesión 3 (avanzada).

## ABREVIATURAS

---

- **LDL** Lipoproteínas de baja densidad.
- **LMW, LMW'** Fibrinógeno de bajo peso molecular.
- **Lp(a)** Lipoproteína (a).
- **LPS** Lipopolisacáridos.
- **LRP** Proteína hepática, receptor de membrana afín a LDL.
- **MCP** Proteína quimiotáctica de monocitos.
- **MCP-1** Proteína quimiotáctica de monocitos 1.
- **M-CSF** Factor estimulante de colonias de monocitos-macrófagos.
- **Mig** Monocina.
- **MMPs** Metaloproteasas.
- **mRNA** Ácido ribonucleico mensajero.
- **MT-MMPs** Metaloproteasas de tipo membrana.
- **N<sub>2</sub>** Nitrógeno.
- **NC** No correlaciona.
- **ND** No determinado.
- **NFκβ** Factor nuclear-kappa B.
- **NO** Óxido nítrico.
- **NS** No significativo.
- **OPD** Peroxidasa.
- **PAF** Factor de activación plaquetar.
- **PAI-1** Inhibidor del activador del plasminógeno 1.
- **PAI-2** Inhibidor del activador del plasminógeno 2.
- **PAIs** Inhibidores del activador del plasminógeno.
- **PAs** Activadores del plasminógeno.
- **PC** Proteína C.
- **PCa** Proteína C activada.
- **PCR** Proteína C-reactiva.
- **PDF** Productos de degradación del fibrinógeno/fibrina.
- **PDGF** Factor de crecimiento derivado de plaquetas.
- **PGH2** Prostaglandina H2.
- **PGI2** Prostaciclina.
- **sct-PA** Activador tisular del plasminógeno de una cadena polipeptídica.
- **scu-PA** Prouroquinasa.
- **TF** Factor tisular.
- **TFPI** Inhibidor del factor tisular.
- **TGF** Factor de crecimiento transformante.
- **TGF-β** Factor de crecimiento transformante B.
- **TIMPs** Inhibidores endógenos de las MMPs.
- **TIMPs** Inhibidores.
- **TM** Trombomodulina.
- **TNF** Factor de necrosis tumoral.
- **TNF-α** Factor de necrosis tumoral -α.
- **TNF-β** Factor de necrosis tumoral-β.
- **t-PA, tct-PA** Activador tisular del plasminógeno.
- **TXA2** Tromboxano A2.
- **UP** Unidades Ploug.
- **u-PA, tcu-PA** Activador del plasminógeno tipo uroquinasa.
- **uPAR** Receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa.
- **VCAM** Molécula de adhesión de células vasculares.
- **VCAM-1** Molécula de adhesión de células vasculares-1.
- **VEGF** Factor de crecimiento vascular endotelial.
- **VLA-4** "Very late antigen-4". Receptor de VCAM-1 expresado en monocitos y linfocitos.
- **VLDL** Lipoproteínas de muy baja densidad.
- **VN** Vitronectina.
- **vWF** Factor de von Willebrand.
- **WOSCOPS** *West of Scotland Coronary Prevention Study.*

## **SIGNIFICADO Y EPIDEMIOLOGÍA ACTUAL DE LA ARTERIOSCLEROSIS**

La arteriosclerosis es una enfermedad multifactorial con un desarrollo lento y silente, hasta que desencadena un evento isquémico. La arteriosclerosis es la causa subyacente a las enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares y vasculares periféricas.

Dichas enfermedades son la causa más común de muerte en los países industrializados y en numerosos países en vías de desarrollo. Además, las predicciones sobre el impacto de las enfermedades cardiovasculares en la salud para los próximos veinte años siguen siendo iguales de desalentadoras. Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en España según datos del Ministerio de Sanidad y Consumo, originando casi el 40% de todas las defunciones. La enfermedad isquémica del corazón y la enfermedad cerebrovascular representan cerca del 60% de la mortalidad cardiovascular total (Boix R, 2000). Desde mediados de los años setenta, debido fundamentalmente al envejecimiento de la población, se ha producido en España un aumento del número de muertes por cardiopatía isquémica. Por ello, el impacto demográfico, sanitario y social de estas enfermedades aumentará a lo largo de las próximas décadas.

Catalunya presenta un patrón de mortalidad por enfermedades del sistema circulatorio, semejante al de los países industrializados. El número de fallecimientos por estas enfermedades, según datos del Departament de Sanitat i Seguretat Social, es de 19.661, que representan un 36,01% del total de defunciones. A partir de los 30 años, la primera causa de muerte es la cardiopatía isquémica, y la segunda los accidentes cerebrovasculares. En la población mayor de 64 años las enfermedades del aparato circulatorio constituyen la primera causa de mortalidad en ambos sexos, en hombres representan un 35,08 % del total de defunciones, y en mujeres un 44,7% (Butlletí Epidemiològic de Catalunya, 2001).

La enfermedad oclusiva vascular contribuye de forma muy marcada a la mortalidad y la morbilidad del mundo occidental. Los problemas cardiovasculares serán el principal problema de salud mundial en el año 2020 (Murray CJ, 1997).

## SISTEMA ARTERIAL

La estructura de la pared arterial se repite en todos los tipos de arterias, variando la proporción de algunos de los elementos de las mismas (láminas elásticas y células musculares lisas) según el territorio en el que se encuentren.

Se compone básicamente de tres capas concéntricas: íntima, media y adventicia.

### **Íntima:**

La túnica íntima está formada por endotelio y subendotelio o capa basal que limita con la lámina elástica interna. El endotelio está formado por una monocapa de células endoteliales que revisten la luz del vaso. El subendotelio es la lámina basal, constituida por una tenue capa de tejido conjuntivo. Debajo, se halla la lámina elástica interna, formada por una malla compacta de elastina con fenestraciones, distribuidas regularmente.

### **Media:**

La túnica media es la de mayor grosor, está formada por células musculares lisas dispuestas circularmente o helicoidalmente respecto al eje del vaso, formando capas que se alternan en mayor o menor proporción, según el calibre del vaso, con capas elásticas. Esta túnica está limitada exteriormente por la lámina elástica externa e internamente por la lamina elástica interna. Estas láminas, son hojas de fibras elásticas con fenestraciones que permiten el paso de sustancias y de células en ambas direcciones.

### **Adventicia:**

La túnica adventicia está formada por tejido conjuntivo con fibras de colágeno, fibras elásticas y fibroblastos, junto con algunas células musculares lisas. Este tejido conjuntivo se prolonga gradualmente relacionándose con las estructuras vecinas.

Por este tejido conjuntivo perivascular, discurre una red de vasos de muy pequeño calibre, los “vasa vasorum” que ocasionalmente penetran en la media y cuya función parece estar relacionada con el metabolismo de la pared (oxígeno, nutrientes, drenaje, etc.) (Heistad DD, 1979; Buerk D, 1986; Stefanadis C, 1995).

También encontramos una red de fibras nerviosas amielínicas que terminan en las células musculares de la túnica media (nervios vasomotores) y algunas fibras mielínicas que llegan hasta la íntima, fibras sensitivas de los vasos.

Además hay vasos linfáticos, que se originan en la media o en la íntima. Su función es drenar el agua y solutos, especialmente macromoléculas y lípidos que, de no ser así, se acumularían entre los tejidos de la pared (Yoffey J, 1970). Wolinsky (Wolinsky H,

1969) observó en aorta abdominal de humanos una carencia de vasa vasorum, sugiriendo que este podría ser una de las razones de que esta región sea particularmente vulnerable a la aterogénesis.

## **CLASIFICACIÓN DE LAS ARTERIAS SEGÚN SU CALIBRE**

### **Arterias de gran calibre:**

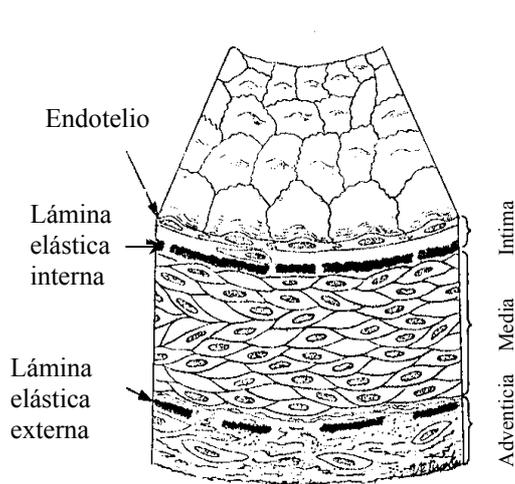
Presentan un predominio del material elástico en su túnica media (*arterias elásticas*), ver figuras 1 y 3. Su lámina interna es menos evidente y su lámina elástica externa está relativamente poco desarrollada. La capa media contiene múltiples lamelas de células musculares lisas, cada una equivalente a una única túnica media de las arteriolas. Cada lamela está limitada por el exterior y el interior por una lámina elástica fenestrada. El número de unidades lamelares está en relación con el tamaño o la posición anatómica de la arteria. Estas arterias juegan un doble papel fisiológico: son conductores del caudal sanguíneo y a la vez reguladores de dicho caudal. Debido a su elasticidad, transforman el flujo pulsante a la salida del corazón en flujo prácticamente continuo a nivel de las arteriolas. Ejemplos de este tipo de arterias lo encontramos en la aorta a sus niveles torácico y abdominal, la arteria pulmonar, la arteria braquicefalia, la arteria carótida común, la arteria subclavia y las arterias ilíacas comunes. En comparación con su gran luz, la pared es relativamente delgada ya que ocupa menos de una décima parte del diámetro del vaso (Ross R, 1976).

### **Arterias de mediano calibre:**

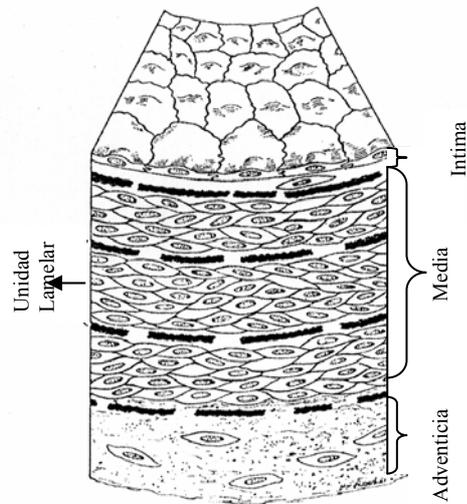
Tienen un predominio de células musculares lisas en su túnica media, por lo que se denominan *arterias musculares*, ver figura 2. La capa media de estas arterias está formada por laminas de células musculares lisas en forma espiral, unidas unas a otras. Entre las células hay fibras de colágeno y proteoglicanos. Fisiológicamente parece que su función es controlar la luz del vaso y regular el flujo sanguíneo. Ejemplos de este tipo de arterias son las arterias coronarias, la arteria poplítea, la arteria femoral y la arteria media cerebral. El espesor de la pared representa en la mayoría de los casos una cuarta parte del diámetro de la arteria. (Ross R, 1976). La lámina elástica interna y externa están bien definidas.

### Arterias de pequeño calibre:

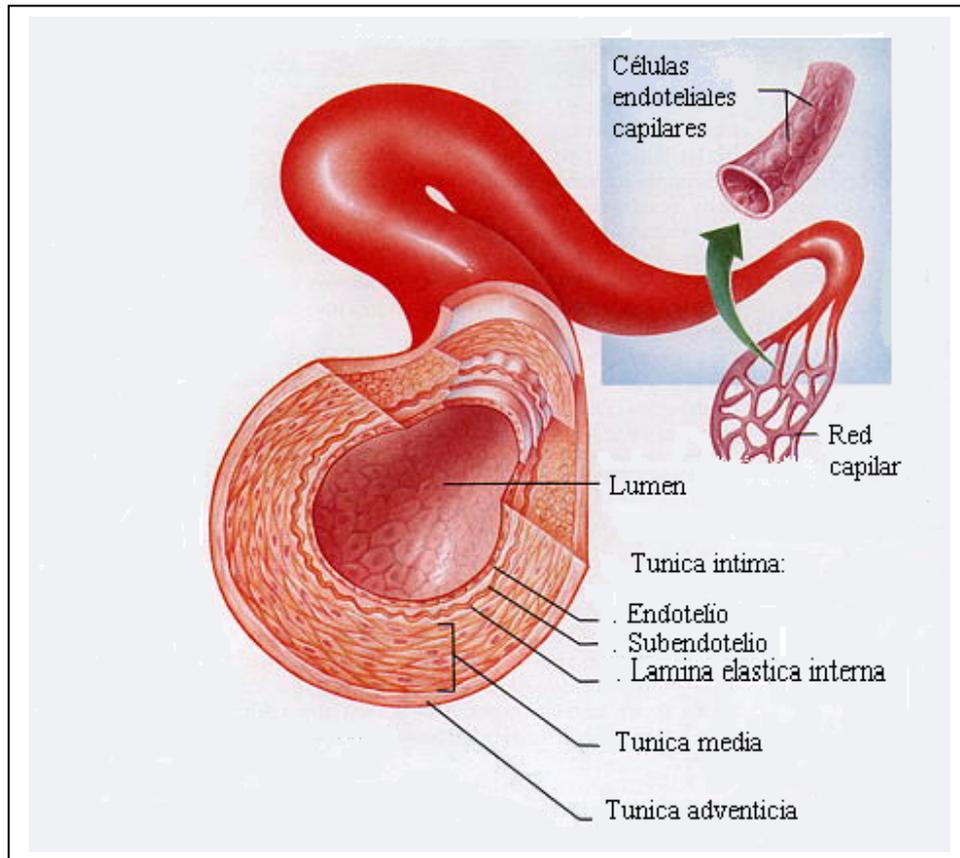
Las arteriolas son las arterias más pequeñas cuya túnica media se reduce a una simple capa de células musculares. En los lugares donde el flujo varía mucho, existen muchas arteriolas directamente conectadas con las vénulas por medio de derivaciones cortas en espiral, llamadas anastomosis arteriovenosas. Su diámetro oscila de 12 a 15 micras. Forman parte esencial de los cuerpos carotídeos, aórtico y coccígeo.



**Figura 1.**-Estructura de una arteria muscular sana (Ross R, 1976).



**Figura 2.**- Estructura de una arteria elástica sana (Ross R, 1976).



*Figura 3.-* Sección transversal de una arteria elástica.

## FISIOPATOLOGÍA DE LA ARTERIOSCLEROSIS

### Teorías:

Son diversas las teorías que a lo largo de la historia de la arteriosclerosis han tratado de explicar la etiología de esta enfermedad. Las dos hipótesis con mayor documentación y aceptadas como clásicas son:

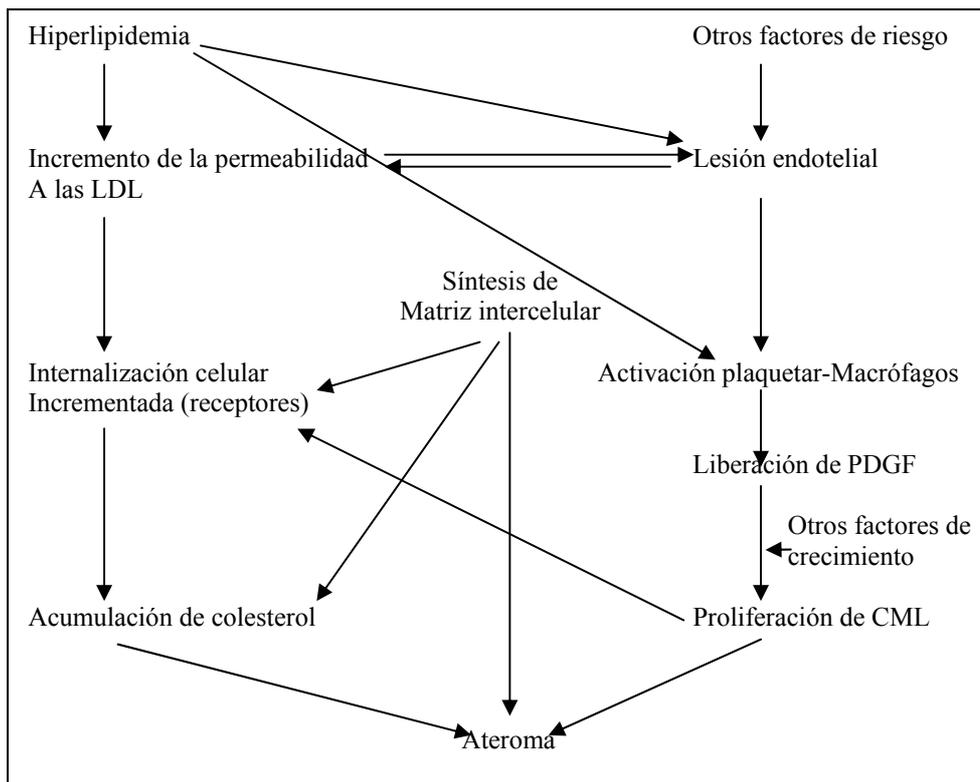
La teoría trombogénica de la arteriosclerosis, conocida como de la “incrustación”, propuesta por Rokitanski (Rokitanski K, 1852). Esta teoría sugiere que la deposición de fibrina y su organización subsiguiente mediante fibroblastos, con un enriquecimiento secundario en lípidos, que conduciría al engrosamiento de la íntima. Esta teoría ha sido recientemente apoyada por la observación de los depósitos de plaquetas en áreas desendotelizadas o en áreas con endotelio anormal; dichas deposiciones de plaquetas pueden disparar el proceso de migración y proliferación de la célula muscular lisa.

La teoría de la “insudación”, fue propuesta por Virchow (Virchow R, 1856). Consideraba al ateroma como el producto de un proceso inflamatorio y el engrosamiento como el producto de una proliferación reactiva celular del tejido

conectivo. Postulaba que debido a la infiltración a través de la pared vascular de sustancias grasas procedentes del torrente circulatorio, se originan depósitos de colesterol que a su vez actúan como irritantes dando lugar a las reacciones inflamatorias indicadas. Esta teoría se confirmó con los trabajos posteriores de Anitschow y Chaladow (Anitschow N, 1913) que inducían lesiones arterioscleróticas en conejos alimentados con colesterol, viéndose que la acumulación lipídica en la pared vascular, era consecuencia de la transudación de lípidos plasmáticos con un predominio de la deposición sobre la eliminación.

Estas dos teorías se integraron posteriormente dentro de una sola hipótesis, en lo que se ha llamado la teoría multifactorial de la arteriosclerosis postulada por Kottke y Subbiah (Kottke BA, 1978), según ellos la arteriosclerosis es, al menos parcialmente, el resultado de la respuesta celular a la lesión, siendo esta respuesta similar a la inducida por la inflamación. Durante los últimos 25 años, esta teoría ha sido modificada y redefinida, dando como resultado la caracterización de los procesos que dan lugar a la formación de la placa arteriosclerótica (Ross R, 1993a; Mitchell ME, 1998), ver figura 4. El proceso se iniciaría con una lesión endotelial inducida por factores hemorreológicos o por la coexistencia de uno o más factores de riesgo tales como la hiperlipidemia, el hábito tabáquico etc.-. Esto produciría una disfunción en el endotelio que provocaría cambios en la permeabilidad, en la adhesión y una respuesta a varios factores estimulantes y de crecimiento. Las células endoteliales y las células musculares lisas interactuarían con los monocitos, linfocitos T y plaquetas dando lugar al componente celular de la respuesta fibroproliferativa que finalmente tendría como resultado la formación de la placa arteriosclerótica. Las interacciones celulares son moduladas por multitud de agentes quimiotácticos, citoquinas y factores de crecimiento. Estas sustancias controlan la migración celular y la producción y secreción de proteínas. Las células endoteliales activadas atraen leucocitos y células musculares lisas, éstas se acumulan y proliferan en el espacio subendotelial de la pared arterial. Estos componentes celulares producen una cantidad excesiva de tejido conectivo en la matriz. La consecuencia de todas estas interacciones y modificaciones es la formación de una placa fibrosa madura.

Cuando el crecimiento de la placa obstruye la luz del vaso o se produce una hemorragia en su interior o su ruptura induce la formación de un trombo, aparece la isquemia y sus síntomas: dolor, angustia, etc.



**Figura 4.**-Diagrama esquematizado de la hipótesis multifactorial sobre el origen de la arteriosclerosis. Modificada de Badimon (Badimon L, 1994). CML: células musculares lisas.

También han sido postuladas otras teorías entre las que se encuentran la monoclonal (Benditt EP, 1973; Poole JC, 1977), la inmunológica (Emeson EE, 1988) o la de origen viral o infecciosa (Hajjar DP, 1991; Leinonem M, 1993; Gurfinkel EP, 1999).

El papel de la infección en el desarrollo de la arteriosclerosis ha sido debatido durante años. Pruebas recientes implican ahora a los citomegalovirus y *Chlamydia pneumoniae* como agentes causales de la arteriosclerosis.

La infección por citomegalovirus ha sido asociada con la reestenosis después de angioplastia coronaria (Epstein SE, 1996).

Se han aislado antígenos de citomegalovirus de placas de carótida y niveles elevados de anticuerpos de estos virus se han asociado con el incremento del grosor de la íntima-media en carótida (Nieto FJ, 1996).

Se ha visto que la *Chlamydia pneumoniae* acelera el desarrollo de la arteriosclerosis en conejos sometidos a dietas elevadas en colesterol y que este efecto se puede prevenir con el tratamiento con azitromicina (Muhlestein JB, 1998).

La hipótesis monoclonal sugiere que cada lesión arteriosclerótica deriva de una única célula muscular lisa, sugiriendo que la arteriosclerosis sería una forma de neoplasia.

Está basada en la hipótesis del cromosoma X inactivo postulada por Linder y Gartler (Linder D, Gartler SM, 1965). Las observaciones de estos autores se usaron para formular esta hipótesis monoclonal (Benditt EP, 1973). Partiendo de la observación de que las placas arterioscleróticas frecuentemente aparecen de forma aislada formando nódulos rodeados por áreas de tejido normal.

Benditt interpretando los resultados obtenidos en sus experiencias llegó a la conclusión de que cada lesión arterial representa un clon derivado de una única célula muscular lisa, al que llamó monotipo. También sugirió que la transformación celular inicial podría ser inducida por virus, agentes químicos u otros mutágenos. Sin embargo es muy difícil determinar si este monotipo es causado por la monoclonalidad o por una policlonalidad, que por selección ventajosa para un tipo celular, acabaría por ser predominante.

## **FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR**

Se llaman factores de riesgo aquellas características personales y hábitos de vida que se relacionan, de modo independiente, con la probabilidad de desarrollar enfermedad cardiovascular. Existen dos tipos de factores de riesgo: unos no modificables entre los que se encuentran el sexo, la edad y la historia familiar; otros son factores modificables que pueden ser prevenidos o bien controlados con tratamiento médico o modificando los hábitos higiénico-dietéticos.

### **Edad y sexo:**

La edad está asociada con la progresiva disfunción endotelial, aunque la arteriosclerosis coronaria y cerebral tiende a ocurrir más tarde en mujeres, pero aumenta con la edad en ambos sexos (Celermajer DS, 1994). La frecuencia de cardiopatía coronaria aumenta en las mujeres después de la menopausia, aunque en ninguna edad de la vida es superior a la de los varones. Los hombres además poseen unos niveles de HDL (lipoproteínas de alta densidad) menores que las mujeres debido posiblemente a la diferente proporción de andrógenos y estrógenos (Nikkila M, 1996).

**Herencia:**

En el estudio de Framingham (Kannel WB, 1961) se comprobó que el riesgo de padecer enfermedad coronaria estaba relacionado con los antecedentes familiares de cardiopatía coronaria. La mayor susceptibilidad genética para padecer enfermedad coronaria u otras presentaciones clínicas de la arteriosclerosis tiene su traducción bioquímica, apareciendo en forma de dislipemias, resistencia a la insulina, niveles altos de fibrinógeno, homocisteinemia o lipoproteína (a) (Lp(a)) (Pedro-Botet J, 1993).

**Dislipemia:**

Se han realizado gran cantidad de estudios epidemiológicos que han estudiado la asociación entre los niveles de colesterol plasmático y la enfermedad cardiovascular. Entre los más relevantes y pioneros están el Estudio de los Siete Países (Keys A, 1970), Framingham (Kannel WB, 1971) y el estudio de los emigrantes japoneses a Hawaii y California (Kagan A, 1974). De todos estos estudios se desprende que el colesterol plasmático, sobre todo el unido a LDL (lipoproteínas de baja densidad), es un factor de riesgo asociado estrechamente con la aparición de enfermedad coronaria. Estos resultados obtenidos en estudios observacionales se han corroborado con estudios experimentales en modelos animales (Carew TE, 1987; Kita T, 1987).

El primer factor que determinaría la aterogénesis es el transporte de lipoproteínas hacia la pared arterial; así, el aumento de los niveles de colesterol de las LDL es suficiente para inducir el proceso (Ishibashi S, 1994).

La hipercolesterolemia también está asociada con una hipercoagulabilidad y con una respuesta superior de las plaquetas en vasos lesionados experimentalmente (Badimon JJ, 1991).

La reducción de un 1% en los niveles de colesterol plasmático implica una reducción del 2% en el riesgo de accidente coronario (Lipid Research Clinics Program, 1984).

Los estudios WOSCOP (Shepherd J, 1995) y 4S (Scandinavian Simvastatin Survival Study, 1994) han demostrado la importancia del mantenimiento de unas concentraciones adecuadas de colesterol plasmático en la prevención de accidentes cardiovasculares en el hombre.

Los niveles de colesterol plasmático están condicionados por el colesterol ingerido y por la cantidad y tipo de ácidos grasos de la dieta (LaRosa JC, 1997).

El papel de los triglicéridos como factor de riesgo ha sido más discutido (Bainton D, 1992; Pocock SJ, 1989). Estos resultados discordantes se deben, sobretudo, a que el

metabolismo de los triglicéridos está estrechamente relacionado con el de las lipoproteínas de alta densidad, además los triglicéridos son constituyentes de casi todas las lipoproteínas pero únicamente los triglicéridos unidos a las LDL, IDL o VLDL (lipoproteínas de muy baja densidad) tienen capacidad aterogénica. Actualmente se acepta que los niveles altos de triglicéridos son un factor de riesgo independiente (Austin MA, 1997; Jeppesen J, 1998).

### **Lipoproteína (a):**

Es un factor de riesgo reconocido posteriormente (Utermann G, 1989; Scanu AM, 1990; Fujino A, 2000). Esta lipoproteína fue descubierta en 1963 (Berg K, 1963).

Es un factor aterotrombogénico compuesto por LDL y apo (a). Los niveles plasmáticos de Lp(a) están en su mayor parte controlados por los alelos del locus de apo (a), aunque ciertas hormonas pueden afectar también estos niveles como los estrógenos (Sacks FM, 1994), o bien patologías renales (Haffner SM, 1992) o estados inflamatorios (Noma A, 1994).

La Lp(a) se acumula en la lesión arteriosclerótica, unida a la fibrina con alta afinidad (Smith EB, 1993) y es capaz de estimular la proliferación de células musculares lisas, unir lipoproteínas que contienen apo(b), unirse a proteoglicanos y promover la acumulación de colesterol en la célula.

La apo(a) se localiza predominantemente en zonas de la arteria con lesión arteriosclerótica, donde operan enzimas elastasas y metaloproteasas (MMPs), las cuales degradan a apo(a) generándose fragmentos que se unen a la matriz extracelular (Klezovitch O, 1998). La apo(a) también puede unirse directamente al fibrinógeno favoreciendo el acumulo de fibrina en la placa arteriosclerótica (Loscalzo J, 1990), a la fibronectina (Edelstein C, 1996) y a proteoglicanos (Klezovitch O, 1998) potenciándose así el acumulo de estos componentes de la matriz extracelular en la pared arterial y promoviendo la formación y progresión de la placa (Scanu AM, 1998).

### **Hipertensión:**

Es el principal factor de riesgo en los accidentes cerebrovasculares (AVC), tanto hemorrágicos como trombóticos y uno de los principales factores de riesgo presentes en los enfermos con cardiopatía (Balaguer I, 1990). Su impacto en la mortalidad es considerable (Banegas J, 1999).

La hipertensión induce cambios morfológicos y funcionales en el endotelio. Muchos estudios sugieren que la disfunción provocada por la hipertensión es el resultado de la elevada presión sanguínea y no la causa (Lüscher TF, 1994). La presión intrarterial elevada puede aumentar la permeabilidad del endotelio facilitando la penetración del colesterol; además, el endotelio sufre un estrés por presión y cizallamiento, alterando sus funciones y secreciones normales, con un predominio del tono vasoconstrictor (Chobanian AV, 1992; Lithell H 1994).

Los trabajos de Liao (Liao D, 1999) sugieren que el desarrollo de la hipertensión está relacionada con una pérdida de la elasticidad de la arteria.

En pacientes hipertensos se ha observado un incremento del factor von-Willebrand (vWF) (Blann AD, 1993) así como de angiotensina II que es un potente vasoconstrictor y estimulante del crecimiento de las células musculares lisas. En estos pacientes también hay un incremento de la formación de peróxidos de hidrógeno y radicales libres, aumentándose así la adhesión de leucocitos y la resistencia periférica (Ross R, 1999).

#### **Tabaco:**

Está bien determinado que el hábito tabáquico es un factor de riesgo independiente que induce el desarrollo de la arteriosclerosis (Lakier JB, 1992; Doll R, 1994; Feeman WE, 1999), pero los mecanismos por lo que esto ocurre no son bien conocidos. La exposición a la nicotina incrementa las tasas de muerte de las células endoteliales y disminuye la replicación celular (Lin SJ, 1992). El tabaco posee un efecto agudo inducido por la nicotina que causa la liberación de catecolaminas facilitando así la isquemia y por el monóxido de carbono, reduciendo la capacidad de transporte de oxígeno de la hemoglobina. También posee un efecto crónico que facilita la aterogénesis reduciendo la cantidad de colesterol transportado por las HDL, aumentando la liberación de factores quimiotácticos y mitogénicos para las células musculares lisas y el CO lesiona el endotelio (Smith FB, 1993).

Los estudios realizados por Ottensen MM (1999) parecen indicar que en los fumadores hay más trombogénesis y menos lesión arteriosclerótica.

**Obesidad:**

La obesidad acusada representa un factor de riesgo para la cardiopatía coronaria (Rissanen A, 1989; Manson JE, 1990). En individuos obesos se ha observado que se induce una activación endotelial temprana (Ferri C, 1999).

Hay dos tipos de distribución de la obesidad: una obesidad central, abdominal, androide, visceral o masculina con una repartición de grasas en la parte superior del cuerpo; otra, genito-femoral o femenina con una distribución de grasas en la parte inferior del cuerpo (Juhan-Vague I, 1999).

Estudios prospectivos indican que la obesidad central puede ser considerada como un factor de riesgo independiente de padecer enfermedad coronaria (Larsson B, 1984; Björntorp P, 1990).

La distribución de grasa se cuantifica por la ratio de las circunferencias cintura-cadera o por tomografía de escaning. Niveles elevados de PAI-1 (inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1) y t-PA (activador tisular del plasminógeno) antigénicos están asociados a un índice de masa corporal elevado, un incremento de la ratio cintura-cadera y un incremento de grasa visceral (Cigolini M, 1996; Janand-Delenne B, 1998).

La distribución de grasas en mujeres no está acompañada por marcadores de resistencia a la insulina y riesgo vascular. Sin embargo la obesidad central se caracteriza por el síndrome de resistencia a la insulina y se acompaña de un incremento de los niveles plasmáticos de PAI-1 (Juhan-Vague I, 1991). Estudios recientes han puesto de manifiesto que el tejido adiposo humano y especialmente el de origen visceral producen PAI-1 (Alessi MC, 1997). Sin embargo los niveles de fibrinógeno están más relacionados con la cantidad de grasa total que con su distribución corporal (Juhan-Vague I, 1999).

La obesidad abdominal está asociada a una mayor aterogénesis o trombogénesis en individuos sanos (Fujimoto WY, 1991; Reeder BA, 1997).

**Diabetes:**

Induce una disfunción endotelial, modificación de lipoproteínas, dislipemia con aumento de VLDL y descenso de HDL, aumento de los factores de coagulación como son el fibrinógeno, el factor VII y vWF, incremento de parámetros fibrinolíticos como el PAI-1 y el t-PA (Ceriello A, 1995) y una hiperfunción plaquetar (Massi-Benedetti M, 1999). La hiperglicemia también provoca una vasoconstricción asociada a la proliferación de células musculares lisas y a un incremento del grosor de la íntima

(Fernandes-Alnemri T, 1994). Concentraciones elevadas de glucosa han mostrado un efecto potenciador de la muerte celular y un deterioro de la replicación celular en cultivos de células endoteliales (Ho FM, 2000).

Las complicaciones macrovasculares son la causa de mayor morbilidad, mortalidad y discapacidad en pacientes con diabetes mellitus tipo II.

En estos pacientes se observan elevados niveles de insulina y glucosa que son estimulantes de la proliferación de células musculares lisas (Avena R, 2000). La hiperglicemia en esta diabetes está asociada a un aumento del estrés oxidativo y un aumento de la glicación no enzimática además de anomalías en el metabolismo lipídico (Massi-Benedetti M, 1999).

### **Homocisteinemia:**

Recientemente se ha considerado que la homocisteinemia en plasma es un factor de riesgo (Nygard O, 1999). Sin embargo su capacidad aterogénica fue demostrada en los trabajos de Wall y Harker (Wall RT, 1980; Harker LA, 1983) y posteriormente fue redescubierta por Malinow (Malinow MR, 1989) y muy estudiada en los últimos años. Es un factor de riesgo causante de alteraciones prematuras en el sistema vascular, la suplementación con ácido fólico y vitaminas B12 y B6 es capaz de reducir sus niveles (Engman M, 1998). Está asociada con la arteriosclerosis en carótida (Malinow MR, 1993).

En el estudio British Regional los niveles de homocisteina estaban incrementados en pacientes con patología cerebrovascular. Se encuentran menos alteraciones de morbilidad y mortalidad en enfermedades coronarias en pacientes con los niveles bajos de homocisteina (Saw SM, 1999).

La homocisteina es tóxica para las células endoteliales, estimula la proliferación de las células musculares lisas y tiene una actividad protrombótica además de incrementar la síntesis de colágeno e inhibir la función del óxido nítrico (NO) (Cattaneo M, 1999). La homocisteinemia asociada con Lp(a) en mujeres incrementa mucho más el riesgo de padecer enfermedad arterio-coronaria, que si ambos factores de riesgo actuaran por separado, sin embargo esta asociación en hombres no se observa (Foody JM, 2000).

### **Hiperuricemia:**

La hiperuricemia se asocia con el riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y la muerte. Sin embargo el papel del ácido úrico como factor de riesgo independiente está

en controversia. Aunque se ha considerado como predictor de infarto de miocardio en el estudio de cohorte Framingham se vio que no era un predictor independiente sino que parecía ser un marcador de trastorno metabólico que predispone a enfermedad coronaria (Culleton BF, 1999).

**Vida sedentaria:**

El ejercicio físico es difícil de valorar como variable independiente. Sin embargo algunos estudios han demostrado que individuos sometidos a ejercicio físico intenso y regular, presentan menos riesgo de muerte súbita. En individuos que realizan ejercicio moderado se ha visto menor incidencia de infarto de miocardio que en aquellos con hábitos sedentarios (Evenson KR, 1999).

El efecto beneficioso del ejercicio podría venir mediado por una reducción de las VLDL, un incremento en las HDL, la reducción de peso corporal y una reducción de la presión sanguínea (Nakaya N, 1999).

**Fibrinógeno:**

Un considerable número de estudios epidemiológicos Framingham (Kannel WB, 1961), Northwich Park Heart (Meade TW, 1986), Monica (WHO Monica, 1988) etc., indican que las concentraciones elevadas de fibrinógeno plasmático son un marcador independiente de riesgo de padecer eventos cardiovasculares como infarto de miocardio o enfermedad cerebrovascular (Danesh J, 1998). Su valor predictor es variable según la localización: corazón, cerebral y arterias periféricas.

Otros estudios también confirman que los niveles elevados de fibrinógeno plasmático son un marcador de riesgo cardiovascular Edinburgh Artery Study (Lowe GD, 1997a) Scottish Heart Health Study (Lee AJ, 1993; Woodward M, 1998) y West of Scotland Coronary Prevention Study (WOSCOPS) (Rumley A, 1997).

Además de las aportaciones de estos estudios, que relacionan los niveles de fibrinógeno con el riesgo de padecer enfermedad cardiovascular, se conocen un gran número de mecanismos que implican al fibrinógeno en la arteriosclerosis y sus complicaciones: el fibrinógeno se correlaciona positivamente con otros factores de riesgo convencionales como son el hábito tabáquico, la dislipemia o la obesidad y sus efectos pueden venir mediados al menos en parte a través de la hiperfibrinogenemia.

El fibrinógeno afecta a la coagulación, a la reología sanguínea a la agregación de plaquetas y a la función endotelial. El fibrinógeno y sus productos de degradación

estimulan la proliferación y migración de células musculares lisas estando ambos procesos implicados en la aterogénesis (Ernst E, 1997).

### **Factores de coagulación:**

**Factor VII:** juega un papel importante en la activación de la vía extrínseca de la coagulación, e interactúa con factores tisulares. Los niveles plasmáticos de este factor se han asociado con la incidencia de isquemia en varios estudios como Northwick Park (Ruddock V, 1994) y Procarn (Junker R, 1997) aunque esta asociación parece restringida a los sucesos fatales y parece estar fuertemente relacionada con los niveles de triglicéridos. No se observa asociación en los estudios Caerphilly (Lowe GD, 1997b) o en el Edinburgh Artery (Smith FB, 1997).

En los trabajos de Meade (Meade TW, 1986) se observó que los niveles elevados de factor VII activo aumentaban en un 62% el riesgo de presentar enfermedad coronaria en un periodo de cinco años.

En estudios recientes (Kalaria VG, 2000) se ha visto que incrementos del factor VII activo, en pacientes que han sufrido infarto de miocardio, están asociados con el riesgo de sufrir eventos cardíacos recurrentes en mujeres pero no en hombres.

**Factor VIII/vWF:** El factor VIII que circula unido a vWF tiene un importante papel en la adhesión y agregación plaquetar. El factor VIII y vWF están asociados con la incidencia de isquemia en Northwick Park Study (Meade TW, 1994) y Caerphilly Study (Lowe GD, 1997b).

**Inhibidores y activadores de la coagulación:** Los incrementos de los factores VII, VIII y IX se asocian con incrementos de la generación de trombina (Lowe GD, 1997c). Los incrementos de los inhibidores de la coagulación como la antitrombina III, mostraron una asociación significativa con el riesgo de sufrir enfermedad coronaria en el estudio Northwick Park Heart Study (Meade TW, 1991), sin embargo en el estudio ARIC no se observa esta relación (Folsom AR, 1997).

Los incrementos en los niveles de proteína C-reactiva (PCR) se asocian fuertemente con los eventos coronarios, en pacientes con angina de pecho (Haverkate F, 1997) y en pacientes con eventos cerebrovasculares (Ridker PM, 1997). La PCR puede actuar como un potente agente procoagulante e inducir a los monocitos a expresar el factor tisular (TF) (Cermak J, 1993).

Muchos de los factores de riesgo convencionales llevan asociado incrementos en los factores de coagulación, tanto activadores como inhibidores, dando como resultado una

no-modificación de la actividad de la coagulación (Woodward M, 1997). Esto podría explicar porque no se pueden demostrar que estos marcadores estén asociados con incidentes de isquemia, por ejemplo, en el estudio Caerphilly (Lowe GD, 1997b).

***Plaquetas:***

No hay estudios clínicos que pongan de manifiesto de forma clara el valor de estas células como factores de riesgo. En estudios de cohorte en individuos que sobrevivieron a infarto de miocardio se observó que la agregación espontánea de las plaquetas estaba fuertemente ligada con procesos recurrentes fatales o no (Trip MD, 1990). El número de plaquetas y la agregabilidad plaquetar parecen estar asociados a un mayor riesgo de cardiopatía (Elwood PC, 1991).

**Factores fibrinolíticos:**

Los incrementos plasmáticos de t-PA antigénico y de PAI-1 se asocian con isquemia y accidente cerebral (Smith FB, 1997; Juhan-Vague I, 1997). Los niveles de t-PA antigénico además pueden ser un marcador del daño endotelial.

En el estudio PRIME (Scarabin PY, 1998) se observó que los niveles de PAI-1 se asociaban con alteraciones cardiovasculares en general.

El dímero-D (DD) es un marcador del incremento del “turn-over” de la fibrina (Lip GY, 1995a). En estudios epidemiológicos prospectivos se observó que los niveles de DD estaban incrementados en el plasma de pacientes con alteraciones en el ámbito arterial (Lee AJ, 1995) así como en los que sufrían fibrilación atrial (Lip GY, 1995b). En el estudio Edinburgh Artery (Lowe GD, 1998b) se observó que los valores de DD eran predictivos de padecer procesos trombóticos en la población en general, así como en pacientes con alteraciones vasculares periféricas (Smith FB, 1998). En el estudio de cohorte Caerphilly (Lowe GD, 1998a) el DD se mostraba como predictor independiente de eventos coronarios, sugiriendo estos datos que el DD puede tener un valor como predictor de procesos trombóticos arteriales (Lowe GD, 1999).

## ELEMENTOS DE LA PARED ARTERIAL QUE INTERVIENEN EN LA LESION ARTERIOSCLERÓTICA

### Células fijas

#### *Células endoteliales*

El endotelio está formado por una monocapa continua de células endoteliales unida a la membrana basal subyacente. Representa la superficie no trombogénica que los vasos sanguíneos exponen a la sangre. Las células endoteliales son células polarizadas, con un dominio apical en contacto con la sangre y uno distal basal en contacto con el subendotelio.

El endotelio sano es una monocapa quiescente, cuya mitosis celular está inhibida por contacto, reflejando la estabilidad e integridad de la pared vascular. Las células endoteliales forman complejas uniones intercelulares y sintetizan componentes de la matriz extracelular como fibronectina y componentes de la lamina basal entre los que se incluyen: proteoglicanos, heparán sulfato, laminina, nidógeno y colágeno tipos IV y V. Todos estos componentes interactúan a través de dominios de unión específicos formando una red tridimensional. Para mantener la integridad de la monocapa endotelial, las células deben formar uniones con la lámina subyacente y con las células adyacentes (Dejana E, 1995).

En condiciones normales, las células endoteliales tienen un índice de recambio muy bajo, que aumenta significativamente en las zonas más vulnerables a la aparición de la lesión (Dimmeler S, 1998). Un mecanismo en el que la proliferación y migración de células endoteliales tienen un papel fundamental es en la regeneración del endotelio dañado. La intensidad del daño infligido al vaso es un determinante crítico en la regeneración endotelial, de manera que, en ocasiones puede ser incompleta (DiCorleto PE, 1996).

El endotelio vascular se considera como el principal órgano de regulación de numerosas funciones vasculares a través de sus acciones endocrina, paracrina y autocrina. En respuesta a sus interacciones con las células sanguíneas (plaquetas, leucocitos y monocitos), con fuerzas físicas (presión, rozamiento) y con sustancias circulantes o liberadas por células cercanas (angiotensina, catecolaminas, cininas, prostaglandinas, etc.), las células endoteliales son capaces de liberar diversos factores vasodilatadores como el .NO, la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF); vasoconstrictores como las endotelinas (ET), la prostaglandina H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>), el

tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>); diversos factores promotores del crecimiento como el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF), factor-1 de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1) y endotelina-1 (ET-1); inhibidores del crecimiento como heparinoides (HPS), factor de crecimiento transformante (TGF), .NO y PGI<sub>2</sub>; moduladores de la inflamación como las moléculas de adhesión endotelial de leucocitos (ELAM), moléculas de adhesión intercelular (ICAM) y moléculas de adhesión vascular (VCAM) o vWF (Bosmans JM, 1997); y factores hemostáticos y trombolíticos como t-PA, u-PA, PAI-1, factor V, TF y trombomodulina (TM), ver tabla 1.

Todos estos factores modulan el tono y el crecimiento del músculo liso vascular, así como la coagulación, la fibrinólisis y la adhesión de células sanguíneas a la pared vascular. En condiciones normales existe un equilibrio entre las acciones de los diferentes factores endoteliales (Lahera V, 1997).

Sin embargo los equilibrios pueden alterarse en presencia de ciertos agentes que inducirían una disfunción. Entre ellos se encuentran citocinas, proteasa, agentes virales, variaciones de la fuerza de cizalladura, radicales libres, lípidos oxidados y homocisteína. Estos agentes están relacionados con la presencia de factores de riesgo tipo dislipemia, diabetes, hipertensión, homocisteinemia, fibrinógeno, factores de coagulación o fibrinolíticos, etc.

Todo ello induce que sean predominantes la contracción y el crecimiento del músculo liso vascular, la actividad trombótica y la adhesión de células sanguíneas. Esta situación de disfunción endotelial, no solo es consecuencia de la acción de los factores de riesgo cardiovascular, sino que participa activamente en el desarrollo de la arteriosclerosis (Ross R, 1993b; Lüscher TF, 1996).

**Tabla 1.**-Productos de secreción-expresión de las células endoteliales. Modificado de Sidawy AN, 1997.

PRODUCTOS DE SECRECIÓN – EXPRESIÓN DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES	
<i>Productos de la matriz</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fibronectina</li> <li>• Proteoglicanos</li> <li>• Heparán Sulfato y Dermatógeno Sulfato</li> <li>• Laminina</li> <li>• Nidógeno</li> <li>• Colágeno I,II, III, IV</li> </ul>
<i>Factores Vasomotores</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vasodilatadores <ul style="list-style-type: none"> <li>– NO</li> <li>– Prostaciclina, Prostaglandina E2(PGI2/E2)</li> <li>– EDHF</li> </ul> </li> <li>• Vasoconstrictores <ul style="list-style-type: none"> <li>– ET-1</li> <li>– PGH<sub>2</sub></li> <li>– TXA<sub>2</sub></li> </ul> </li> </ul>
<i>Factores de Crecimiento</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promotores <ul style="list-style-type: none"> <li>– PDGF</li> <li>– bFGF</li> <li>– IGF-1</li> <li>– ET-1</li> </ul> </li> <li>• Inhibidores <ul style="list-style-type: none"> <li>– HPS</li> <li>– TGF</li> <li>– .NO</li> <li>– PGI<sub>2</sub></li> </ul> </li> </ul>
<i>Moduladores de la Inflamación</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ELAM</li> <li>• ICAM</li> <li>• VCAM</li> <li>• vWF</li> </ul>
<i>Factores Hemostáticos y Trombolíticos</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• t-PA/u-PA</li> <li>• PAI-1</li> <li>• Factor V (F V)</li> <li>• TF</li> <li>• TM</li> </ul>

***Células musculares lisas***

En las arterias normales, las células musculares lisas son el componente celular mayoritario de la capa media, aunque también se pueden presentar en la íntima en algunos segmentos arteriales.

El núcleo de las células musculares lisas es alargado y se localiza centralmente, con la cromatina agrupada en la periferia y un material nucleolar moderadamente desarrollado. El citoplasma contiene regiones llenas de miofibrillas longitudinales asociadas a cuerpos densos.

Están compuestas por dos proteínas: la  $\alpha$ -actina específica del músculo liso y la miosina.

Las células musculares lisas forman uniones tipo Gap con otras células musculares lisas y con células endoteliales. Además, también forman uniones con las fibras elásticas (Mills CJ, 1997).

Se distinguen al menos dos fenotipos de células musculares lisas: el contráctil y el secretor (Babaev VR, 1993; Frid MG, 1997). El fenotipo contráctil se caracteriza por su capacidad de respuesta a agentes inductores de vasoconstricción o vasodilatación, manteniendo el tono vascular. En este estado, las células proliferan muy poco y producen solo cantidades pequeñas de matriz extracelular.

El fenotipo secretor, mayoritario en las lesiones arterioscleróticas, es capaz de sintetizar y secretar una gran variedad de citocinas y de factores de crecimiento (Nilsson J, 1993; Libby P, 1996a). Se caracteriza por una reducción en los miofilamentos y un aumento en los órganos celulares sintetizadores como el aparato de Golgi y el retículo endoplasmático. Cambios en la composición de la matriz extracelular son capaces de alterar el fenotipo de las células musculares lisas (Thyberg J, 1997). La presencia de factores de crecimiento y citocinas, lípidos y diferentes fuerzas hemodinámicas también promueven el cambio fenotípico.

El número de células musculares lisas viene determinado por el balance entre la migración desde la neointima, la proliferación y la muerte celular. Diversos factores quimiotácticos secretados por células endoteliales y macrófagos estimulan la migración, como son el PDGF, IP-10 (proteína 10) ( Jackson CL, 1993; Wang X, 1996), el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF).

La proliferación también se estimula por diversos mitógenos provenientes de plaquetas, macrófagos o células musculares lisas como son PDGF, angiotensina II y trombina, o componentes de la matriz extracelular como la trombospondina (Majack RA, 1988).

Además las propias lipoproteínas favorecen la proliferación de las células musculares lisas (Björkerud S, 1995).

Las células musculares lisas en la lesión arteriosclerótica también pueden acumular lípidos dando células vacuoladas o espumosas, los lípidos acumulados están en forma de ésteres de colesterol.

Las células musculares lisas también expresan u-PA (activador del plasminógeno tipo uroquinasa), uPAR (receptor del activador del plasminógeno tipo uroquinasa), t-PA y PAI-1 in vivo tanto en arterias coronarias humanas normales como patológicas (Raghunath PN, 1995).

Por último las células musculares lisas son la fuente de la matriz extracelular de la placa arteriosclerótica (Rekhter MD, 1993; Andreeva ER, 1997) cuyo componente básico es el colágeno tipo I y su síntesis está fundamentalmente promovida por TGF- $\beta$  segregado por los macrófagos y las células musculares lisas (Katsuda S, 1992; Bahadori L, 1995). La presencia de colágeno I confiere a la placa gran estabilidad estructural.

### **Células circulantes**

#### ***Monocitos-Macrófagos***

Los monocitos circulantes poseen un núcleo en forma de haba y un citoplasma finamente granular que contiene lisosomas, vacuolas fagocíticas y filamentos citoesqueléticos.

Los monocitos se adhieren a la pared arterial debido a la expresión de moléculas de adhesión en la superficie de las células endoteliales (ICAM-1 y 2, VCAM-1, ELAM-1 o E-selectina y P-selectina o GMP-140), que son reconocidas por las glicoproteínas existentes en la superficie del monocito (GP-90, GP-155, Gp-160) (Libby P, 1992; Bevilacqua MP, 1993; Collins T, 1993a; Dustin CP, 1995, Norman KE, 1995). Los monocitos expresan las tres integrinas  $\beta$ 2: LFA-1, Mac-1 y p150.95, estas proteínas median la adhesión a la matriz extracelular y también juegan un papel importante en la adhesión célula-célula. Las integrinas  $\beta$ 2 además actúan como receptor del fragmento iC3b del complemento, del fibrinógeno, del factor X y de microorganismos sin opsonizar (Patarroyo M, 1989). Los ligandos de  $\beta$ 2 son los ICAM-1 y 2. Otra proteína de adhesión es la L-selectina que se encuentra en los monocitos y linfocitos y tiene un papel decisivo en su adhesión a las células endoteliales (Spertini O, 1992).

La migración de monocitos al subendotelio se realiza a favor de un gradiente de diversas sustancias con capacidad quimiotáctica como la proteína quimiotáctica de los monocitos (MCP-1) secretada por células endoteliales (Torzewski J, 1997) o como IL-8 (interleucina 8) e IP-10 expresadas por células musculares lisas (Wang N, 1996).

En condiciones normales, este nivel basal de migración tiene una gran importancia por eliminar restos celulares que se acumulan en el interior de la pared, además de ser fuente de moléculas reguladoras del crecimiento y citocinas. La función normal de los macrófagos, es además de actuar como células basurero (“scavenger”), la de presentar el antígeno a los linfocitos T.

Una vez en el espacio subendotelial, los monocitos proliferan y se diferencian en macrófagos. El factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) desempeña un papel clave en esta diferenciación (Suzuki H, 1997). Esta diferenciación se acompaña de la expresión de receptores basurero (Geng YJ, 1995). A través de estos receptores los macrófagos fagocitan las lipoproteínas captadas.

La capacidad de los macrófagos para fagocitar las LDL nativas es muy limitada pero tienen una gran afinidad y receptores específicos para las LDL modificadas que además son quimiotácticas para los monocitos (Quinn MT, 1987) e inhiben su posterior migración. Los receptores basurero no son regulados a la baja por la presencia de altas concentraciones de colesterol intracelular, por lo que los macrófagos captan y acumulan grandes cantidades de lipoproteínas modificadas (oxidadas, acetiladas) formando células espumosas. Cuando el macrófago no es capaz de degradar todo el colesterol captado este queda en forma de colesterol libre. Esta forma de colesterol es tóxica para la célula que al morir libera al medio extracelular todo su contenido en colesterol libre, esterificado, radicales libres y enzimas proteolíticas y lisosomales. Todo ello contribuye a la lesión del endotelio y a la digestión de la matriz extracelular.

Los macrófagos y las células musculares lisas son la fuente principal de células espumosas en la lesión arteriosclerótica. Bajo la acción de MCP-1, M-CSF y otras citocinas, los macrófagos son activados y se incrementa su capacidad de oxidación de lipoproteínas y la secreción de factores de crecimiento y diversas citocinas. Entre ellas destacan de nuevo MCP-1 y M-CSF (favoreciendo un círculo vicioso de captación, proliferación y activación de monocitos/macrófagos) y otras citocinas inflamatorias potencialmente importantes en la evolución de la placa como la interleucina-1 (IL-1), el TNF e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) (Libby P, 1996b). Estas citocinas estimulan la expresión de moléculas de adhesión y quimocinas por parte de las células endoteliales y las

musculares lisas. Los factores de crecimiento de plaquetas (PDGF) estimulan la migración y proliferación de células musculares lisas (Wang X, 1996).

Los macrófagos también son la principal fuente de TGF- $\beta$  que es la citocina más importante en el estímulo de la síntesis de matriz extracelular (Amento EP, 1991).

Por otro lado los macrófagos sintetizan una gran variedad de proteasas (MMPs) que degradan la matriz extracelular. La degradación de la matriz favorece la migración de células musculares lisas pero también puede debilitar la estructura de la placa (Galis ZS, 1994a).

En las lesiones arterioscleróticas, los linfocitos T activados, que se encuentran en el interior de estas zonas expresan CD40L que puede unirse al CD40 presente en células musculares lisas o en macrófagos-células espumosas induciendo la expresión de moléculas implicadas en la arteriosclerosis como son moléculas de adhesión, citocinas, MMPs y TF (George SJ, 1998; Mach F, 1998).

### ***Linfocitos-T***

La unión de neutrófilos y células mononucleares al endotelio vascular es un requisito esencial para mantener una respuesta efectiva inmuno-inflamatoria. Este proceso es una cascada de adhesión que implica la expresión de múltiples receptores para integrinas, selectinas y la superfamilia de genes para inmunoglobulinas, en ambos tipos celulares (Carlos TM, 1994). Estas interacciones/adhesiones están moduladas por señales del entorno que comprenden desde citocinas inflamatorias y quimiotácticas hasta fuerzas de cizalladura en la pared del vaso.

Los linfocitos T son las células responsables del inicio de la reacción inmune al reconocer a un antígeno extraño en el organismo. Esto provoca su activación, tras la cual son capaces de matar la célula infectada (linfocitos CD8<sup>+</sup>), o activar la producción de anticuerpos en los linfocitos B y activar los macrófagos (linfocitos CD4<sup>+</sup>). Pero los linfocitos T no se activan por antígenos libres y en solución, sino que estos han de ser presentados por una "célula presentadora de antígenos" asociados con las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad CMH-antígeno mediante el receptor TCR asociado al complejo CD3, desencadenándose la activación de la respuesta inmune. Esta fase efectora de la respuesta inmune consiste en la generación de actividad citotóxica y actividad mediada por el complemento, así como la liberación de citocinas que controlan la respuesta inflamatoria de los vasos sanguíneos y otros tejidos.

La existencia de linfocitos T en el interior de las lesiones arterioscleróticas es conocida desde hace varias décadas (Duff GL, 1957; Schwartz CJ, 1962; Emeson EE, 1988). Estudios inmunohistoquímicos más recientes apoyan la idea de que estos linfocitos T están activados (Haraoka S, 1995; Sernerer GG, 1997). Está descrito que los linfocitos T entran en la lesión en estadios muy tempranos, y ya se encuentran junto con los macrófagos en la estría grasa aunque en menor cantidad (Stary HC, 1996).

Los linfocitos T producen IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$  que activan los monocitos y factores estimuladores de la formación de colonias como el M-CSF que estabiliza los macrófagos y estimula su proliferación (Ross R, 1993b).

### ***Granulocitos y Mastocitos***

Estos cuatro tipos celulares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos y mastocitos) tienen un papel fundamental en la inmunidad natural y la inflamación. Tienen un citoplasma rico en gránulos, cuyo contenido liberan al exterior cuando son activados. Son estimulados por citocinas segregadas por linfocitos T y antígenos opsonizados. Se ha detectado poca presencia de estos tipos celulares en las lesiones arterioscleróticas, a excepción de los mastocitos, cuya presencia en la arteria lesionada parece estar relacionada con los síndromes coronarios (Metzler B, 1997). En estudios histológicos en los que se compara la concentración de mastocitos en arterias coronarias infartadas con controles se observa que la concentración de estas células es mayor en la adventicia de las coronarias infartadas (Laine P, 1999). Los tres tipos de granulocitos no están presentes de una manera significativa, tal vez por que no expresan los receptores necesarios como la proteína VLA-4 para las moléculas de adhesión que presentan las células endoteliales relacionadas con la lesión arteriosclerótica (Greisler HP, 1997).

### ***Plaquetas***

Las plaquetas son células anucleares con capacidad adhesiva y secretora, y son esenciales para el mantenimiento de la hemostasia, sin embargo su papel también es decisivo en la trombogénesis.

Estos pequeños discos con unas dimensiones de 0,5  $\mu\text{m}$  x 3  $\mu\text{m}$ , proceden de los megacariocitos, son fragmentos de citoplasma envueltos en una membrana y carecen de núcleo.

Están formados, en estado de reposo, por un citoesqueleto constituido principalmente por actina y miosina. Estas proteínas le confieren la forma y se encargan de la motilidad

(Holmsen H, 1990). Se aprecian invaginaciones en la superficie de este citoesqueleto que permiten abrir el sistema tubular denso. Contienen gránulos secretores de dos tipos: gránulos densos y gránulos alfa. Los gránulos densos contienen ATP (adenosin trifosfato), ADP (adenosin difosfato), GTP (guanidil trifosfato), Ca (calcio) y serotonina. Los gránulos alfa contienen fibrinógeno, factor V, vWF, PDGF y FP4, entre otras proteínas. La proteína que se encuentra en mayor proporción en las plaquetas es el fibrinógeno, el cual procede de los megacariocitos (Schick PK, 1997). El PDGF es un potente mitógeno, estimula el crecimiento de fibroblastos y células musculares lisas de aorta además de ser quimiotáctico para estas células y para neutrófilos (Ross R, 1993b). En la composición de la membrana plaquetar intervienen los lípidos en forma de fosfolípidos y lípidos neutros. La relación entre ambos condiciona la viscosidad y su capacidad de respuesta. En la membrana también se encuentran las glicoproteínas cuya función sería la de receptores que median la adhesión a productos solubles y de la matriz extracelular, participando además en la regulación de muchas funciones celulares.

Entre estas integrinas podemos encontrar el complejo IIb-IIIa, que es el más abundante, cuyo ligando es el fibrinógeno pero también pueden serlo el vWF, la vitronectina, la trombospondina y el colágeno. El receptor GIIb-IIIa se enlaza al fibrinógeno plasmático y se produce el enlace plaqueta-plaqueta formándose un agregado (Mitchell M, 1998).

Otra glicoproteína de membrana es el receptor GPIb (Ezzell R, 1988) formado por las subunidades GPI $\alpha$  y GPI $\beta$  que están unidas a otras glicoproteínas la GPIX y la GPV formando el complejo GPIb-IX-V.

Este receptor es crucial en la interacción de las plaquetas con el vWF y también puede unir  $\alpha$ -trombina (Andrews RK, 1999).

La unión de los agonistas a los receptores de membrana expuestos en la superficie de la plaqueta activa a un conjunto de segundos mensajeros intracelulares que incluyen al inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y el diacilglicerol (DG). El IP3 produce la liberación de calcio del sistema tubular denso de las plaquetas aumentando la concentración de calcio libre en el citosol. El DG activa una serina/treonina quinasa, la proteína quinasa C, produciéndose su translocación a la membrana y la fosforilación de proteínas en residuos de serina y treonina. Esto desencadena la formación de pseudópodos (Price LS, 1998), la secreción granular y la exposición del receptor del fibrinógeno. Al mismo tiempo el aumento del calcio libre en el citosol facilita la liberación de araquidonato por la acción de la fosfolipasa A<sub>2</sub> sobre los fosfolípidos de membrana, proceso que puede

ocurrir tanto en la membrana plasmática como en la membrana del sistema tubular denso. El araquidonato es metabolizado a TXA<sub>2</sub>, el agente proagregante más potente conocido, que además posee un efecto vasoconstrictor, que sale de la célula, interacciona con los receptores de la superficie plaquetaria y refuerza la activación de la plaqueta (Badimon L, 1990). También se secretan ADP, serotonina y PAF entre otras sustancias.

La activación plaquetar implica una reorganización de la plaqueta que se adhiere a la zona lesionada del vaso y la extensión de ésta sobre la superficie expuesta. La activación también puede producirse en la plaqueta circulante por agonistas como la trombina o el ADP (Frenette PS, 1998).

La adherencia y agregación de las plaquetas a la superficie del vaso en la lesión arteriosclerótica ocurre en las primeras fases de su desarrollo.

Hay evidencias de que los receptores mayoritarios G<sub>Ib</sub> y G<sub>IIb-IIIa</sub>, se mueven en direcciones opuestas durante la activación plaquetar. Esto implicaría una maquinaria en el citoesqueleto de la submembrana plaquetar capaz de distinguir entre ellos y movilizarlos en diferentes direcciones. Parece que las plaquetas tienen mecanismos para poder modular sus funciones adhesivas y cohesivas y esto implicaría una movilización espacial de los receptores en las membranas plaquetares (Escolar G, 2000).

Las lesiones arterioscleróticas avanzadas son más susceptibles de desencadenar trombosis. La placa arteriosclerótica ulcerada puede presentar una capa fibrótica fisurada, abundante contenido lipídico, extensa matriz extracelular, y células inflamatorias. Este tipo de componentes tiene un potente efecto activador sobre las plaquetas y la coagulación. Estos componentes junto con la trombina generada por la activación de la cascada de la coagulación, así como la epinefrina circulante, son activadores de las plaquetas. Cada agonista estimula la descarga de calcio y promueve la contracción de la plaqueta, con la subsiguiente secreción del contenido granular. Todo este proceso da como resultado la formación de un trombo de plaquetas y fibrina estable y oclusivo.

## Matriz extracelular

### *Componentes:*

La matriz extracelular de la pared vascular está compuesta de fibras de colágeno, fibras elásticas, embebidas en un gel viscoelástico formado por proteoglicanos, hialuronano, glicoproteínas y agua. La clasificación de los componentes de la matriz extracelular se resume en la tabla 2. En la figura 5 se compara la estructura y tamaño de varias de estas macromoléculas.

*Tabla 2.-*Componentes de la matriz extracelular. (Wight TN, 1996).

<p><b>Fibras de colágeno</b></p> <p><i>Colágeno tipo I</i>  <i>Colágeno tipo III</i>  <i>Colágeno tipo V</i>  <i>Colágeno tipo VI</i></p> <p><b>Glicoproteínas</b></p> <p><i>Fibronectina</i>  <i>Trombospondina</i>  <i>Tenascina</i>  <i>Osteopontina</i></p> <p><b>Fibras Elásticas</b></p> <p><i>Elastina</i>  <i>Fibrilina</i>  <i>Emilina</i>  <i>Lisil-oxidasas</i></p>	<p><b>Membrana o lamina basal</b></p> <p><i>Colágeno tipo IV</i>  <i>Colágeno tipo VIII</i>  <i>Laminina</i>  <i>Entactina</i>  <i>Perlecán (HSPG)</i></p> <p><b>Proteoglicanos y moléculas asociadas</b></p> <p><i>Hialuronano</i>  <i>versicán (CSPG)</i>  <i>decorín (DSPG)</i>  <i>Biglicán (BSPG)</i>  <i>Lumican (KSPG)</i>  <i>Perlecán (HSPG)</i></p>
--	---

Todos estos componentes interactúan en una maraña y se entrecruzan conformando un polímero reticular activo biomecánicamente. Este retículo confiere la fuerza tensil, el retroceso elástico, la comprensibilidad y viscoelasticidad que posee la pared vascular.

Además este retículo interactúa con las células vasculares y participa de la regulación de la adhesión, migración y proliferación celular durante el desarrollo vascular así como en el proceso patológico.

Los componentes de la matriz extracelular también pueden unir proteínas plasmáticas, captar factores de crecimiento, citocinas y enzimas y pueden modular también el metabolismo de la pared arterial.

## ***Colágeno***

### ***Tipos y distribución:***

El colágeno es una proteína formada por una triple hélice de cadenas polipeptídicas. Cada cadena contiene al menos un intervalo de una secuencia de aminoácidos repetida Gli-X-Y. Según la composición de aminoácidos y la proporción de moléculas que conforman la triple hélice se clasifica al menos en 19 tipos genéticamente diferenciados (Mayne R, 1993).

Se han identificado seis tipos de colágeno en las arterias: I, III, IV, V, VI y VIII (Rauterburg J, 1993).

Los tipos de colágeno predominantes en las arterias son el I y el III.

En la pared arterial normal el colágeno tipo I y III, se organiza en distintos haces fibrilares, ambos se encuentran encajados entre las fibras elásticas en las arterias elásticas o bien formando nidos que rodean las células musculares lisas en las arterias musculares (Walker-Caprioglio HM, 1992).

En menor proporción también se encuentran el colágeno de tipo IV y VII en la membrana basal debajo de las células endoteliales y alrededor de las células musculares lisas (Yurchenco PD, 1990). Estas moléculas actúan como filtro macromolecular al interaccionar con otras, sirviendo de barrera a proteínas plasmáticas. También en cantidad menor se encuentra el colágeno de tipo V que se codistribuye con el tipo I y participa en la formación de heteropolímeros y su papel podría estar relacionado con la regulación del diámetro de las fibras de colágeno (Yurchenco PD, 1990).

El colágeno tipo VI es otro colágeno vascular minoritario que aparece en las arterias entre los colágenos I y III y parece que está asociado a proteoglicanos. Su función podría ser la de sustrato adherente a células vasculares (Bidanset DJ, 1992).

### ***Síntesis:***

La principal fuente de colágeno en la íntima y media de las arterias son las células musculares lisas. La modulación de esta síntesis viene acompañada por cambios en el fenotipo asociados a alteraciones celulares. El colágeno tipo IV en la lamina basal mantiene las células musculares lisas en su estado contráctil a través del receptor  $\alpha 1\beta 1$  de estas. El cambio de fenotipo puede producir la rotura de la lamina basal a través de las MMPs (Thyberg J, 1997).

Muchos factores regulan la síntesis de colágeno por células musculares lisas como son: factores de crecimiento, citocinas, la naturaleza del sustrato de la matriz extracelular, la fase de crecimiento celular (Amento EP, 1991; Thie M, 1993; Lawrence R, 1994).

Las células endoteliales también expresan genes que codifican para el colágeno tipo I, III, IV, y VIII (Tan E, 1991).

El colágeno también juega un papel en la formación de nuevos vasos (Vernon RB, 1995) y reacciona con las plaquetas induciendo su agregación.

### ***Patología:***

Defectos en la síntesis y deposición de colágeno vascular tipo I y III dan como resultado aneurismas y rotura de arterias musculares y elásticas (Löhler J, 1984).

La expresión de colágeno tipo I ocurre principalmente en la cubierta fibrosa y las regiones vascularizadas de las placas primarias y la proporción es menor en el centro de la placa donde la concentración de lípidos es mayor, aunque las LDL oxidadas o normales se pueden unir a los colágenos de tipo I y III (Jimi S, 1994).

El colágeno de tipo IV se incrementa en la membrana basal y alrededor de las células musculares lisas (Ross R, 1984) dando una membrana basal hipertrofiada que parece afectar a la permeabilidad y metabolismo de las células circundantes. También puede actuar reteniendo proteínas plasmáticas, lipoproteínas y factores de crecimiento y/o calcio.

El colágeno tipo V también se incrementa en las placas avanzadas y su papel puede ser el de estabilizar la malla de colágeno durante la fibrosis (Ooshima A, 1981).

La activación de las plaquetas por el colágeno es importante en la hemostasis pero también puede serlo en la trombosis, ya que al producirse la rotura de la placa se produce una exposición de colágeno que induce una activación de las plaquetas (Barnes MJ, 1998).

### **Fibras elásticas**

#### ***Distribución y propiedades***

La proteína fibrosa elastina es otro de los componentes mayoritarios de las arterias junto con el colágeno. Proveen a la arteria de la fuerza mecánica y la elasticidad necesarios para acomodarse a los cambios de presión y los cambios hemodinámicos.

Las fibras elásticas son estructuras complejas formadas por elastina asociada a glicoproteínas hidrofílicas y enzimas responsables del entrecruzamiento de los péptidos de elastina.

La composición de la elastina es poco usual, es pobre en aminoácidos ácidos y básicos, pero rica en aminoácidos hidrofóbicos como la valina. La síntesis de elastina se da principalmente durante la fase perinatal y en las primeras fases del crecimiento y decrece a niveles insignificantes en el adulto en ausencia de patología. Las fibras elásticas se organizan en hojas concéntricas fenestradas o lamelas que separan las diferentes capas vasculares. Una fina lamina de tejido elástico separa la íntima de la media (lamina elástica interna) y otra la media de la adventicia (lamina elástica externa). La concentración de elastina varía según las arterias siendo mayoritario en aorta torácica y decreciendo en vasos pequeños como son las arterias mesentéricas (Walker-Caprioglio HM, 1992).

#### ***Síntesis:***

La fuente principal de fibras elásticas son las células musculares lisas arteriales (Martin BM, 1992).

La elastina se sintetiza a partir de una molécula precursora llamada tropoelastina (Parks WC, 1990) junto con una proteína de 67 kDa asociada a la superficie celular a través de una proteína de membrana específica (Hinek A, 1992).

Esta proteína de 67 kDa tiene lugares de unión a lectina que interactúan con proteínas microfibrilares y un dominio hidrofóbico que une secuencias hidrofóbicas dentro del péptido de elastina.

#### ***Patología:***

Defectos en la formación de fibras elásticas o la fragmentación de estas producen una debilitación de la pared vascular, dilatación y aneurismas (Nakashima Y, 1992; Ravonovitch M, 1995).

La fragmentación o pérdida de fibras elásticas también se da durante la arteriosclerosis. La causa de esta rotura podría estar relacionada con la tensión producida por el flujo turbulento y por la liberación de MMPs por células, entre ellas células musculares lisas (Cohen JR, 1992).

Las fibras elásticas también pueden inducir la deposición de lípidos durante la formación de estrías grasas y potenciar la deposición de calcio. La unión de lípidos y

calcio a la elastina incrementa su susceptibilidad a los enzimas elastolíticos liberándose péptidos en esta degradación. Estos péptidos resultantes tienen actividad quimiotáctica para monocitos, fibroblastos y células musculares lisas, estimulan la adhesión de fibras elásticas a células musculares lisas y fibroblastos e inducen la liberación de enzimas líticos y radicales libres de los leucocitos. Todo ello contribuye a inducir y cronificar la progresión de la lesión (Jacob MP, 1998).

### **Proteoglicanos/Hialuronano**

Son moléculas hidrofóbicas y confieren viscoelasticidad y turgencia a la arteria. Participan en la regulación de la permeabilidad, el metabolismo lipídico, hemostasis y trombosis. Además interaccionan con células, factores de crecimiento y citocinas, modificando la adhesión celular la migración y la proliferación (Wight TN, 1992).

Su distribución en la pared arterial es variable siendo la íntima particularmente rica en proteoglicanos disminuyendo en la media y adventicia.

### ***Síntesis:***

El principal productor de estas moléculas son las células musculares lisas. Su síntesis viene regulada por factores de crecimiento y citocinas como PDGF, TGF- $\beta$  y IL-1 (Schönherr E, 1993). Se clasifican según los glicosaminglicanos que los componen: condroitin sulfato (CSA) presente en versicán y agrecán; dermatán sulfato (DS) en decorín y biglicán; heparan sulfato (HS) en perlecán y sendecan; queratan sulfato (KS) en lumican (Bihari-Varga M, 1998).

Las células endoteliales también sintetizan varios proteoglicanos e hialuronano y modulan su síntesis en diferentes estados fenotípicos (Banerjee SD, 1992).

Los mastocitos, linfocitos y monocitos también pueden sintetizar proteoglicanos (Edwards IJ, 1995).

El principal proteoglicano presente en tejido vascular es el condroitin sulfato que interactúa con el hialuronano para formar agregados multimoleculares dentro de la matriz.

### ***Patología:***

Se producen cambios en el contenido y la distribución de ambas moléculas en la hipertensión, la diabetes, la arteriosclerosis y la reestenosis. Decece su concentración cuando la lesión está en una fase avanzada y fibrótica (Guyton JR, 1993).

Cambios en estas moléculas afectan a la permeabilidad de la pared vascular.

Los proteoglicanos pueden formar complejos con lipoproteínas a través de proteínas como la apo-E (O'Brien KD, 1994) y estas lipoproteínas parece ser que son más fácilmente oxidables (Camejo G, 1993a).

### **Glicoproteínas**

Estas macromoléculas regulan la integridad de la matriz extracelular y abastecen de sustrato a las células vasculares. Son moléculas proteicas cuyo grupo prostético está formado por glúcidos.

**Fibronectina:** Presente en plasma y en la matriz extracelular de muchos tejidos. Está presente en todas las capas arteriales y su concentración se eleva en la neointima como respuesta a una lesión o a la hipertensión (Stenman S, 1978).

Es una de las principales proteínas de unión para las células vasculares y sirve como sustrajo para la migración de células en el desarrollo y en la remodelación vascular (Madre JA, 1992; Ravonovitch M, 1995).

La fibronectina se puede adherir a la membrana plasmática celular por medio de la integrina  $\alpha 5\beta 1$ .

**Laminina:** Se encuentra en la membrana de células endoteliales y células musculares lisas interactúa con colágeno tipo IV, nidogen y HS para dar lugar a la membrana basal durante la vasculogénesis y la maduración de la pared vascular. interactúa también con células musculares lisas y las mantiene en parte en un fenotipo no proliferativo o contráctil (Tryggvasson K, 1993).

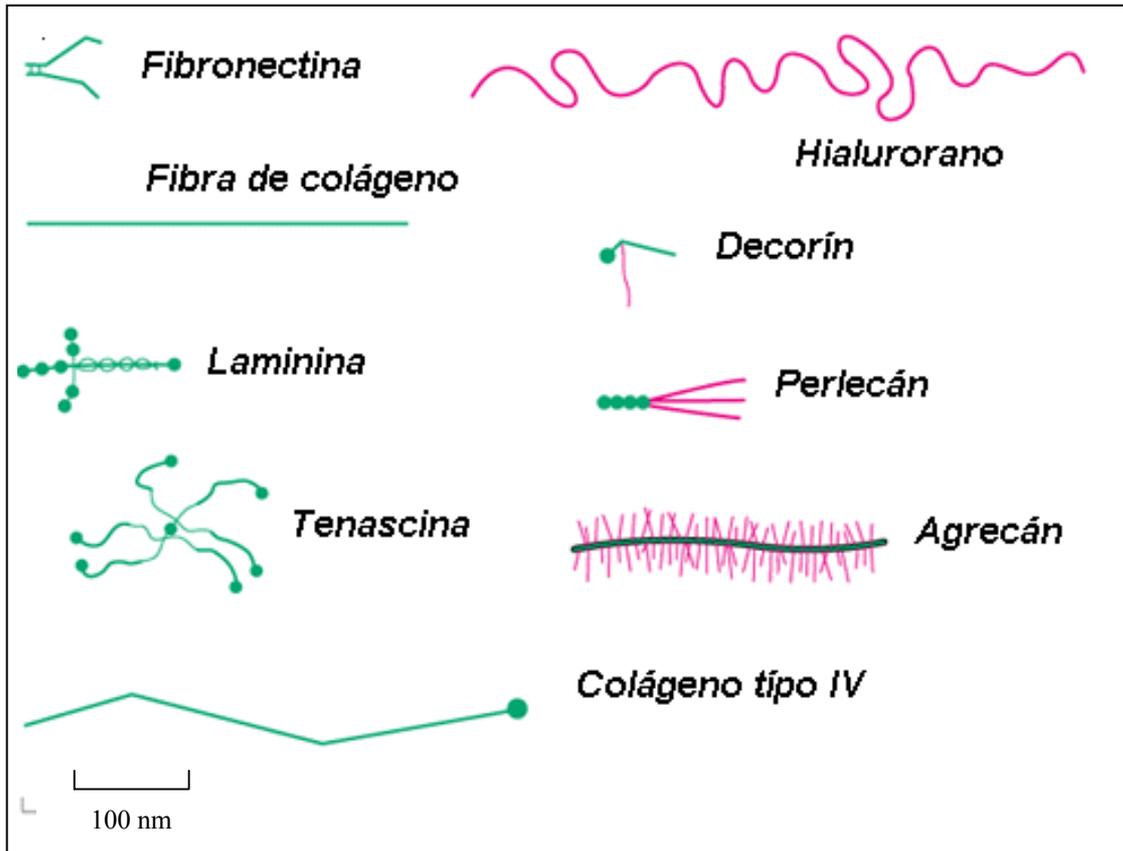
**Trombospondina:** Interacciona con proteínas plasmáticas como el fibrinógeno, plasminógeno, glicoproteínas ricas en histidina y copolimeriza con la fibrina en la formación del coagulo. Es sintetizada por varios tipos de células incluyendo las células musculares lisas (Majack RA, 1988).

Está presente en diferentes capas arteriales y su concentración se eleva cuando hay un engrosamiento de la íntima en patologías vasculares o después de angioplastia (Miano JM, 1993).

**Tenascina:** Es una glicoproteína que está presente en la vasculogénesis y después de angioplastia e hipertensión. Se sintetiza por células musculares lisas y células endoteliales y se regula por PDGF, TGF- $\beta 1$  y angiotensina II (Erikson HP, 1993).

**Osteopontina:** No está presente en la matriz extracelular de arterias sanas pero aparece en la íntima después de angioplastia y en placas arterioscleróticas.

Su síntesis por células musculares lisas se regula por bFGF, TGF- $\beta$  y angiotensina II. También puede ser sintetizada por macrófagos y puede ser quimiotáctica para células musculares lisas. Se localiza alrededor de zonas calcificadas en placas arterioscleróticas avanzadas (Denhardt DT, 1993).



**Figura 5.-** Comparación de formas y tamaños de algunas de las macromoléculas mayoritarias de la matriz extracelular. Proteínas en verde y glicosaminoglicanos en rojo. Modificada de Alberts (Alberts B, 1994). *nm*: nanómetros.

## **ORIGEN Y EVOLUCIÓN DEL ATEROMA**

La lesión arteriosclerótica es el resultado de un proceso inflamatorio excesivo de la pared arterial producido por una respuesta celular y molecular específica.

Aunque la mayor amenaza de la arteriosclerosis es para la circulación coronaria y cerebral, la morbilidad también proviene de eventos que tienen lugar en la circulación periférica. Estos eventos están estrechamente relacionados, en principio, con el desarrollo de placas arterioscleróticas, este proceso se puede dividir en tres fases: inicio, progresión y complicaciones, que se esquematizan en la figura 6.

Las causas iniciales responsables del comienzo de la lesión pueden ser un aumento de las LDL o una modificación de las mismas; radicales libres producidos por el tabaco, la hipertensión, o una diabetes mellitus; alteraciones genéticas; una concentración plasmática elevada de homocisteína; microorganismos infecciosos; y una combinación de varios de estos factores (Ross R, 1999).

El desencadenante inicial, por tanto no tiene por que ser una lesión, sino que cualquier disfunción inducida en uno o más de los procesos en los que interviene la célula endotelial es suficiente para activar el proceso aterogénico.

El depósito y salida de lipoproteínas del espacio subendotelial es un fenómeno fisiológico normal. El equilibrio entre la entrada y salida de este espacio endotelial estará en función del flujo de entrada de estas lipoproteínas y la capacidad de resistencia de las mismas a las modificaciones oxidativas o de otro tipo, que puedan sufrir por parte del endotelio.

En las zonas donde aparecerán las lesiones iniciales probablemente hay una relación de esta lesión con factores hemodinámicos, así como con una permeabilidad endotelial incrementada que inducirán un aumento del paso de macromoléculas a la íntima (Falk E, 1995).

La disfunción endotelial inducida tiene una respuesta compensatoria por parte del endotelio que alterará sus propiedades hemostáticas. Por lo tanto se producirá un incremento de la adhesión de leucocitos o plaquetas y de la permeabilidad. También se producirá un cambio en las propiedades anticoagulantes del endotelio que pasarán a ser coagulantes y se formarán moléculas vasoactivas, citocinas y factores de crecimiento. Si la respuesta inflamatoria inicial no es capaz de neutralizar el agente causante de la disfunción se perpetuará indefinidamente.

Las primeras lesiones arterioscleróticas macroscópicamente visibles son las estrías grasas, las cuales pueden aparecer en la aorta y en arterias coronarias durante las primeras décadas de la vida (Deupree RH, 1973).

El reclutamiento de leucocitos hacia la íntima es uno de los primeros sucesos que intervienen en la formación de la lesión arteriosclerótica (Libby P, 2000). Por tanto el papel de las moléculas de adhesión que se expresan en la superficie vascular es importante. Coexisten dos grupos básicos de moléculas de adhesión: las selectinas principalmente la selectina E y la selectina P (Vora DK, 1994) y las pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas (ICAM-1 y VCAM-1) (Cybulsky MI, 1991). Las selectinas intervienen en el movimiento y en el contacto transitorio de los leucocitos con el endotelio. Las células endoteliales del ateroma humano expresan una de estas selectinas la P-selectina (Vora DK, 1997). Experimentos realizados con ratones hiperlipémicos deficientes en esta selectina han puesto de manifiesto que se produce una aterogénesis muy lenta en estos ratones (Dong ZM, 1998).

La superfamilia de las inmunoglobulinas, mantienen la adhesión de los leucocitos al endotelio. A esta superfamilia pertenece VCAM-1 que se une al receptor VLA-4 expresado en monocitos y linfocitos, presentes en la íntima durante la aterogénesis (Cybulsky MI, 1991).

En experimentos con ratones y conejos deficientes en apo-e, sometidos a dieta rica en colesterol se observa una rápida expresión de VLA-1 en células endoteliales implicadas posteriormente en el inicio de la lesión. Sin embargo no se han podido llevar a cabo estudios con ratones deficientes en VCAM-1 ya que desarrollan múltiples anomalías (Gurtner GC, 1995).

La regulación de la expresión de las moléculas de adhesión ocurre por un control negativo y a nivel de la transcripción. Por ejemplo el .NO conocido como vasodilatador puede reducir la adhesión de leucocitos a la arteria (Lefter DJ, 1993) y contrarrestar la inducción de la expresión de VCAM-1 en las células endoteliales estimuladas con citocinas como la IL-1 o el TNF (De Caterina R, 1995). A nivel genético el .NO inhibe la expresión de VCAM-1 en las células endoteliales interfiriendo con NFκB (factor nuclear-kappa B)(Peng HB, 1995).

Las células endoteliales vasculares normales secretan .NO en respuesta a un estrés provocado por el flujo, pero las células endoteliales procedentes de placas arterioscleróticas producen menos .NO (Kouretas PC, 1999). Esto implicaría un

incremento de la expresión de citocinas por estas células y por tanto sería un estímulo para el reclutamiento de leucocitos en la lesión arterial.

Los leucocitos una vez se adhieren al endotelio penetran en la pared arterial. Ciertas citocinas quimioatrayentes, parecen dirigir la migración de las células blancas a la íntima durante la aterogénesis. Ratones deficientes en MCP-1 muestran una aterogénesis atenuada y un acumulo de fagocitos mononucleares en la arteria (Gu L, 1998). La delección del receptor de MCP-1 tiene unas consecuencias similares (Boring L, 1998).

En trabajos recientes se han determinado una tríada de quimioatrayentes, inducibles por interferón (IFN), de linfocitos en ateromas humanos. Estas tres citocinas IP-10 (proteína 10), Mig (monocina) y I-TAC (quimioatrayente de células T) se producen en las células vasculares cuando son expuestas a una molécula mediadora de la inflamación como es el IFN- $\gamma$  (Mach F, 1999a) y no se han detectado en vasos normales.

Otro factor que determinaría la formación de la estría grasa, es el transporte de lipoproteínas hacia la pared arterial. El aumento de los niveles de colesterol de las LDL es suficiente para inducir el proceso arteriosclerótico (Brown MS, 1986; Fuster V, 1994).

La LDL es rápidamente transportada a través del endotelio intacto y queda atrapada en la estructura tridimensional de fibras y fibrilas secretadas por las células de la pared (Nivelstein PFEM, 1994). Otro factor que afecta la perpetuación de la partícula de LDL en la íntima es la presencia de proteoglicanos. Estos forman complejos con las LDL y se consideran como una de las principales causas de acumulación de estas lipoproteínas en las placas arterioscleróticas (Camejo G, 1993a).

También se produce infiltración y depósitos de inmunoglobulinas (Ig) y factores del complemento. La IgG se deposita en los filamentos intracelulares y fibras de colágeno extracelular (Hansson GK, 1984).

Las células de la pared arterial secretan radicales libres que inician la oxidación de las LDL atrapadas (Fuster V, 1994) y forman las llamadas LDL mínimamente oxidadas (Witztum JL, 1991). Cuando las lipoproteínas se oxidan, se modifica su comportamiento biológico (Berliner JA, 1995). Este hecho motiva la activación de una respuesta inflamatoria. El colesterol puede al menos "in vitro", activar la cascada del complemento a través de la vía alternativa en una reacción que se amplifica por modificación oxidativa de la molécula de colesterol (Seifert PS, 1987). Fragmentos de péptidos como C3a y C5a, que se liberan durante la activación de la cascada del

complemento exhiben propiedades quimiotácticas y de activación leucocitaria y podrían atraer leucocitos a la lesión (Hansson GK, 1987).

Todo ello provoca la atracción de monocitos hacia la lesión, que se adhieren, penetran y se convierten en macrófagos, aportando a su vez una gran capacidad oxidativa.

También junto a los macrófagos se produce un acumulo de linfocitos T (Van der Wal AC, 1989), en proporción 10-50 macrófagos:1linfocito, en el subendotelio. Este acumulo de linfocitos T sugiere que se produce una presentación de antígeno y activación inmune. En lesiones precoces el fenotipo de las células T es CD8+, indicando que se está produciendo una respuesta inmune a antígenos HLA restringidos a la clase I, sintetizados en forma endógena. Sin embargo el antígeno o los antígenos que incitan la respuesta inmune celular no han sido identificados.

Las lipoproteínas modificadas son citotóxicas y lesivas para el endotelio, quimiotácticas para monocitos, e inhibitoras de la migración de los macrófagos (Schwartz CJ, 1986; Duplâa C, 1996). Las LDL oxidadas además inducen la producción, en las células endoteliales, de potentes atrayentes de monocitos, entre ellos MCP-1 (Cushing SD, 1990).

La expresión del gen MCP-1 se encuentra modulada por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Barnes PJ, 1997) y se ha demostrado que este factor de transcripción se activa en las lesiones arterioscleróticas (Collins T, 1993b). Las LDL son un regulador positivo de la expresión del receptor para MCP-1 (CCR2). La expresión de CCR-2 en monocitos se incrementa mucho en pacientes hipercolesterolémicos. Niveles elevados de LDL en plasma provocan la expresión de CCR-2 y la respuesta quimiotáctica y potencialmente contribuyen a incrementar el reclutamiento de monocitos en la pared arterial en la inflamación crónica y en la aterogénesis. (Han KH 1998; Han KH, 1999)

Las LDL también inducen la producción de moléculas de adhesión, que facilitan la adhesión de los monocitos al endotelio y del factor estimulante de colonias de monocitos (M-CSF) producido por células endoteliales y células musculares lisas (Clinton SK, 1992). Hay una expresión de moléculas de adhesión, tanto de selectinas como de inmunoglobulinas, como respuesta a la activación que provocan los distintos modificadores biológicos, como la IL-1 (Thorne SA, 1996), la trombina, el TNF y otros. El m-CSF, que también está controlado por el NF- $\kappa$ B, desempeña un papel clave en la diferenciación de los monocitos a macrófagos. Como resultado de esta diferenciación se expresan los receptores basurero (scavenger) que participan activamente en la formación de la estría grasa (Krieger M, 1993). Entre estos receptores basurero

encontramos a la familia de receptores A ó CD36 (Endemann G, 1993), los receptores macrosialina ó CD68 (Ramprasad MP, 1996) y la familia de receptores B clase I o SR-BI que parece estar implicada en la unión a HDL ( Gu X, 1998). La delección de receptores CD36 reduce la formación de lesiones en ratones hiperlipemicos (Sakaguchi H, 1998).

En el proceso de oxidación de la partícula LDL, se modifica en primer lugar la parte lipídica, pero al aumentar el proceso oxidativo se modifica también la parte proteica (apo B) por lo que la LDL deja de ser reconocida por su receptor natural y sí, en cambio, por el receptor basurero de los macrófagos (Brown MS, 1990).

Estos receptores no están regulados por el contenido de colesterol de la célula, por lo que el resultado es la acumulación masiva de colesterol en estas células. Estas células transformadas, ricas en lípidos, se denominan células espumosas y son la pieza fundamental de la estría grasa. En el curso más evolucionado del proceso, las células espumosas mueren y se lisan, vertiendo al espacio intercelular su contenido de cristales de colesterol, enzimas catalíticos, etc., que dan lugar al daño de las células y de las fibras circundantes, lo que desencadena el proceso inflamatorio local.

Inicialmente, los depósitos lipídicos extracelulares son escasos. En esta primera fase, la lesión se aprecia macroscópicamente en el endotelio como una zona con cierto relieve de color amarillento. Su presencia no indica siempre que evolucione a una ateromatosis ya que puede desaparecer y regresar de forma espontánea.

En cuanto al papel de otras lipoproteínas, se ha demostrado tanto en estudios “in vivo” como “in vitro” que las HDL tienen una función protectora en lo que respecta a las fases iniciales de la arteriosclerosis ya que disminuyen la oxidación de las LDL y la formación de estrías grasas. Además del papel antioxidante de las HDL, también hay que tener en cuenta su participación en el transporte reverso del colesterol y la síntesis de prostaciclina mediante la inducción de cox-2 en las células musculares lisas (Viñals M, 1999).

La estría grasa puede progresar hasta la formación de la placa fibrosa, que es una lesión típica de la edad media de la vida. Se caracteriza por una mayor riqueza celular y un mayor depósito lipídico. Debido a la persistencia de concentraciones elevadas de lipoproteínas se produce un incremento en el depósito de las mismas en el espacio subendotelial, y por tanto, seguirán auto perpetuándose los mecanismos quimiotácticos que atraen a monocitos y células musculares lisas. Las plaquetas junto con las células endoteliales y macrófagos liberan factores de crecimiento que estimulan la proliferación

de células musculares lisas, su migración y la síntesis de nueva matriz (Bahadori L, 1995). Todo ello dará lugar a una gran proliferación de células musculares lisas de la pared arterial y la acumulación extracelular de colesterol que ira formando el núcleo o “core” lipídico en el espacio subendotelial.

Debido al incremento de permeabilidad se encuentran componentes derivados de la sangre, incluyendo albúmina y fibrina(ógeno) tanto en las lesiones iniciales como avanzadas (Zhang Y, 1993a). Ver fibrinógeno fisiopatología pagina 48. Utilizando técnicas de inmunohistoquímica para detectar fibrina(ógeno) es frecuente observar este componente en áreas ricas en neovascularización y en los bordes de la placa junto con infiltración celular (Zhang Y, 1993b). Un patrón de tinción similar se observa para la albúmina, indicando que el incremento de la permeabilidad endotelial es responsable de la aparición de la fibrina(ógeno) en las placas (Zhang Y, 1993a).

La fase final de este proceso es la placa fibrosa característica, que presenta un color blanquecino y normalmente es protuberante hacia el lumen de la arteria.

Esta lesión se caracteriza por un gran acumulo de células musculares lisas en la íntima junto con gran cantidad de macrófagos y linfocitos T. En la lesión inicial la población de células T es predominantemente CD8+ sin embargo en la placa madura la población mayoritaria es de CD4+ (Jonasson L, 1986). Estas células responden a antígenos HLA exógenos restringidos a la clase II que son captados del medio ambiente por macrófagos, células endoteliales y otras células presentadoras de antígeno.

Las células musculares lisas estas rodeadas por colágeno y fibras elásticas y por grandes cantidades de proteoglicanos.

Se pueden apreciar a menudo depósitos de calcio. En trabajos recientes se han caracterizado en células musculares lisas vasculares, la expresión de proteínas implicadas en la formación y mineralización de huesos (Demer LL, 1995), como por ejemplo la osteopontina (Demer LL, 1999). El acúmulo de minerales en el ateroma depende tanto del proceso de síntesis como del de degradación. Los osteoclastos, que son las células implicadas en la reabsorción del hueso, son de hecho una forma especial de fagocitos mononucleares. Los macrófagos en el ateroma avanzado, probablemente actúen como los osteoclastos. Ratones con predisposición a sufrir arteriosclerosis, deficientes en M-CSF, muestran un incremento de calcio en el ateroma (Rajavashisth T, 1998).

La degeneración de la placa tiene lugar por el acúmulo de lípidos, preferentemente LDL, y la necrosis, debida al efecto citotóxico de los lípidos oxidados. El núcleo

lipídico es avascular y normalmente acelular, formado sobretodo por colesterol libre y ésteres de colesterol. El núcleo está separado de la luz arterial por un caparazón fibromuscular y una capa de células endoteliales.

La placa puede crecer hasta que llega a un tamaño umbral que reduce o obstruye completamente el paso de la sangre. Estas lesiones aunque representan la mayor proporción de los procesos arterioscleróticos, suponen una pequeña proporción de los episodios clínicos, lo cual indica que dichas lesiones son bastante estables.

La mayoría de episodios clínicos (muerte súbita, infarto de miocardio y angina inestable) están causados por placas arterioscleróticas que se fisuran o rompen e inducen la formación de un trombo plaquetar (Fuster V, 1992a; Falk E, 1995; Theroux P, 1998). Además  $\frac{3}{4}$  partes de los accidentes cerebrovasculares también tienen un origen trombótico.

La asociación entre placa y trombosis lleva a utilizar el termino de aterotrombosis que enfatiza la importancia de la placa en la formación del trombo y viceversa.

Las placas que tienden a romperse están compuestas comúnmente por una masa de lípidos separados de la luz vascular por una cubierta fibrosa delgada pobre en colágeno (Richardson PD, 1989). Son relativamente blandas y con una composición elevada de colesterol y ésteres de colesterol. El tamaño y consistencia del núcleo por tanto es un factor importante para la estabilidad de la placa. La mayoría de placas que experimentan trombosis tienen un núcleo lipídico que ocupa más de un 40% del área de la placa (Davies MJ, 1993). Las placas que se rompen contienen menos colágeno, más lípidos extracelulares, un número reducido de células musculares lisas y un incremento de la densidad de macrófagos (Falk E, 1995). La cantidad de colágeno de la cubierta fibrosa depende de su tasa de síntesis por las células musculares lisas. Varios factores liberados por las plaquetas, incluyendo TGF- $\beta$  o PDGF, estimulan la síntesis de colágeno por estas células (Amento EP, 1991). El IFN- $\gamma$  liberado por los leucocitos en determinados lugares de la placa también puede predisponer a la rotura de esta ya que actúa sobre las células musculares lisas y estas son incapaces de mantener y reparar el colágeno que está implicado en la integridad de la cubierta fibrosa de la placa (Libby P, 1995a). Además de los procesos de síntesis y degradación del colágeno varios enzimas especializados pueden degradar colágeno, elastina y otros componentes estructurales de la matriz extracelular arterial (Dollery CM, 1995).

Los macrófagos tienen una gran importancia ya que sintetizan una gran variedad de MMPs que degradan la matriz extracelular, y que pueden ser activadores del

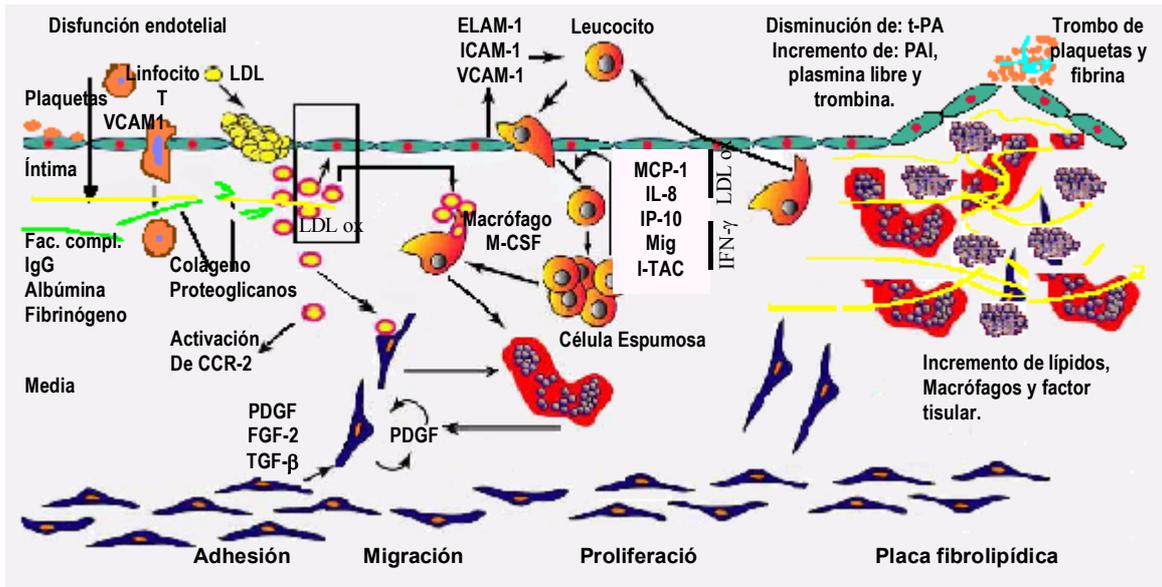
plasminógeno (Libby P, 1995b). La degradación de la matriz favorece la migración de células musculares lisas pero también debilita la estructura de la placa y favorece su rotura (Galis ZS, 1994b; Muller JE, 1994). Varios mediadores inflamatorios como las citocinas pueden aumentar la expresión de los genes para las MMPs (Mach F, 1999b). Ver MMPs y arteriosclerosis pagina 84.

La rotura de la placa supone la desendotelización de la pared vascular y la exposición de las capas interiores ricas en colágeno y otros factores que activan la agregación plaquetar (Fuster V, 1992b) y la formación de un trombo que puede ser oclusivo o impedir de forma súbita la circulación o contribuir al crecimiento de la lesión arteriosclerótica que produce una lesión silente. El núcleo graso o ateroma de las placas ricas en lípidos es el componente más trombogénico de la placa (Fernandez-Ortiz A, 1994) y el TF presente en la capa limítrofe de la lesión parece tener un papel clave al ser el desencadenante de la reacción trombótica en cascada (Toschi V, 1997; Badimon JJ, 1999).

Además de la composición de la placa hay otros factores que pueden determinar el tamaño, localización y composición de los trombos como son las fuerzas hemodinámicas del flujo (Muller JE, 1994), la trombogenicidad del sustrato luminal expuesto, las concentraciones y reactividad de los componentes de la fase fluida del plasma y componentes acelulares de la sangre como catecolaminas, factor VII o fibrinógeno (Meade TW, 1986) y los mecanismos fisiológicos de protección. Dentro de estos mecanismos podemos encontrar la generación de plasmina libre en la superficie del trombo que conduce a la lisis de la fibrina lo cual contribuye al mantenimiento de la permeabilidad vascular (Collen D, 1991). Diversas citocinas, como la IL-1 y el TNF, pueden modificar el potencial fibrinolítico del endotelio vascular e inducir una disminución del t-PA y un aumento de PAI-1. Además estas citocinas inducen la producción de uroquinasa en las células endoteliales (Loskutoff DJ, 1989). Es por tanto especialmente importante, el balance que existe entre los activadores e inhibidores de la actividad fibrinolítica plasmática.

Numerosas pruebas indican que el proceso inflamatorio se correlaciona y contribuye a la aterotrombosis. Por ejemplo las concentraciones plasmáticas de fibrinógeno, plasminógeno, DD y PCR se correlacionan con la severidad de la dolencia arterial coronaria (Heinrich J, 1995). Otros estudios muestran que ciertos mediadores solubles de la inflamación que incluyen IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , e interleucina-1-beta (IL-1 $\beta$ ) pueden incrementar "in vitro" la biosíntesis y los niveles de expresión en la superficie celular de

moléculas de señalización inmunoregulatoras, como el receptor pare CD40 (CD40 L), en cultivos de macrófagos, células endoteliales y células musculares lisas. En las lesiones arterioscleróticas humanas se ha observado una inmunoreactividad de CD40L en estas células pero no en las procedentes de vasos normales (Mach F, 1998).



**Figura 6.-** Esquema de la evolución de la arteriosclerosis.

### Clasificación de la lesión arteriosclerótica

**Tabla 3.**-Clasificación biológica de la lesión arteriosclerótica basada en su composición desde el inicio hasta los estadios finales con manifestación clínica (Stary HC, 1992).

		DESCRIPCION	Nomenclatura Convencional
Tipo I	Lesión inicial	Acumulo de lipoproteínas en íntima; lípidos y macrófagos; cambios microscópicos sin lesión en tejido.	
Tipo II	Estría Grasa	Acumulo de lipoproteínas en íntima; lípidos en macrófagos y células musculares lisas. Sin lesión tisular.	Estría Grasa
IIa	Engrosamiento		
IIb	Progresión-Resistencia		
Tipo III	Pre-ateroma	Depósitos de lípidos extracelulares, evidencia microscópica de desorden y lesión tisular.	Placa Fibrosa
Tipo IV	Ateroma	Núcleo lipídico con lesión masiva de la íntima.	
Tipo V	Fibroateroma	Incremento de colágeno y células musculares lisas rodeando el núcleo lipídico.	Placa Complicada
Tipo VI	Fibroateroma complicado	Depósitos trombóticos y/o hemorragia, y/o erosión o fisura.	
VIa	Trombo-hemorragia		
VIb	Trombosis		
VIc	Hemorragia		
Tipo VII	lesión con calcificación	Lesión avanzada compuesta predominantemente de calcio. Deformación estructural muy marcada.	Placa Calcificada
Tipo VIII	lesión fibrótica	Lesión avanzada compuesta predominantemente de colágeno, los lípidos pueden estar ausentes.	Placa Fibrosa

## FIBRINOGENO

El fibrinógeno es una proteína que circula en la sangre y es un precursor de la formación del coágulo de fibrina. Tanto fibrinógeno como fibrina juegan un papel crucial en la mediación de procesos biológicos en los cuales participan, incluyendo las interacciones celulares y con la matriz, fibrinolisis y cicatrización.

La molécula de fibrinógeno es una glicoproteína soluble con un peso molecular de 340 kDa (Dolittle RF, 1984), que circula en la sangre a una concentración media de 2,8-3 g/l. Con una vida media de 3 a 6 días (Dang CV, 1989).

### **Estructura:**

Se sintetiza básicamente en hígado, a una velocidad de 30 mg/Kg/día. La molécula del fibrinógeno está formada por dos dominios D, cada uno conectado por una espiral enrollada a un dominio central, llamado dominio E. Cada molécula está compuesta por dos partes simétricas formadas por un grupo de tres cadenas de polipéptidos diferentes llamados  $A\alpha$ ,  $B\beta$  y  $\gamma$  que están unidos al dominio amino terminal de E por cinco puentes disulfuro, ver figura 7.

El dominio D además tiene dos dominios  $\alpha C$  que contienen la región carboxiterminal de las cadenas  $A\alpha$ . Este segmento se origina en el dominio D y normalmente se extiende a lo largo del eje de la molécula en dirección al dominio E. La región amino terminal de cada cadena  $A\alpha$  en el dominio E contiene la secuencia FPA (fibrinopeptido A) ( $A\alpha 1$  a 16) y la región aminoterminal de cada cadena  $B\beta$  en el dominio E contiene la secuencia FPB (fibrinopeptido B) ( $B\beta 1$  a 14) (Mosesson MW, 1999).

Los tres genes que codifican para el fibrinógeno están situados en una región que comprende menos de 50 kD en el brazo largo del cromosoma 4, y cada cadena está sintetizada por mRNAs separados. En la línea celular de hepatocitos HepG2 el factor limitante de la producción de la molécula de fibrinógeno maduro es la síntesis del polipéptido de la cadena  $B\beta$  (Roy SN, 1990).

El fibrinógeno humano se puede separar cromatográficamente en dos componentes principales que difieren en la composición de la cadena  $\gamma$ . El pico 1 está compuesto por moléculas de fibrinógeno que contienen dos cadenas  $\gamma_A$  ( $\gamma 1$ -411V), y el pico 2 que representa un 15% del total de fibrinógeno tiene una  $\gamma_A$  y otra  $\gamma'$  ( $\gamma 1$ -427L). La cadena  $\gamma'$  difiere de la  $\gamma_A$  en que en la  $\gamma'$  los residuos terminales 408 a 411 de la  $\gamma_A$  están

sustituidos por una secuencia de 20 aminoácidos terminales aniónicos (Wolfenstein-Todel C, 1981). Ambas cadenas son funcionalmente equivalentes con respecto al factor XIIIa.

La trombina se une al fibrinógeno y produce la liberación de FPA y FPB, e induce una exposición de los lugares de polimerización  $E_A$  Y  $E_B$  (Plow EF, 1973). La liberación del FPB es menor que la del FPA (Higgins DL, 1983). La trombina tiene dos lugares de unión a la fibrina uno de alta afinidad y otro de baja, aunque se asume que ambos están en el dominio E. Aunque estudios detallados muestran que el de alta afinidad se encuentra en  $\gamma'$  (Meh DA, 1996). El lugar de unión de baja afinidad está en el dominio E de la fibrina y puede representar un aspecto residual del lugar de unión de la trombina al fibrinógeno.

Los estudios de Siebenlist muestran subunidades no catalíticas del factor XIIIIB unidas a cadenas  $\gamma'$  (Siebenlist KR, 1996).

En la molécula de fibrina hay dos lugares que están implicados en la intensificación de la activación del plasminógeno por t-PA ( $A\alpha$ 148-160;  $\gamma$ 312-324). Estos dos lugares son críticos en el fibrinógeno pero se exponen como consecuencia de la conversión del fibrinógeno a fibrina. El ensamblaje y entrecruzamiento de las moléculas de fibrina se lleva a cabo en una primera fase por interacciones no covalentes entre los lugares  $E_A$  y  $D_A$ , formándose así las fibrillas. Estas se asocian lateralmente dando las fibras.

Después de la liberación del FPB los dominios  $\alpha C$  se empiezan a asociar con otros dominios  $\alpha C$  promoviéndose de esta forma la asociación lateral y el ensamblaje de fibras. La activación del factor XIII a factor XIIIa por la trombina produce la introducción de un isopeptido de  $\epsilon$ -lisina entre los C-terminal  $\gamma_{xl}$ . Principalmente dentro de las fibras entre las hebras para formar rápidamente  $\gamma$  dímeros, trímeros y tetrámeros, incrementándose la resistencia de la malla a la fibrinolisis (Mosesson MW, 1997).



dobles y hasta 20 veces superiores a las normales, acompañadas de una subida paralela de los niveles de mRNA (Birch HE, 1986). Existen pruebas que parecen indicar que los incrementos de fibrinógeno de la fase aguda inflamatoria son el resultado de un incremento de la transcripción de mRNA y no de cambios de su estabilidad o de la síntesis proteica (Otto JM, 1987). Se ha comprobado que leucocitos procedentes de sangre periférica incubados con fragmentos de fibrinógeno o fibrina, producidos por la plasmina, secretan un factor que induce en los hepatocitos un incremento de la producción de las proteínas de la fase aguda, que dan lugar a unos niveles de fibrinógeno 4-6 veces superiores a lo normal (Ritchie DG, 1982).

También se ha visto que los macrófagos y otras células, algunas de estirpe cancerosa, segregan estos factores estimulantes hepáticos. Fuller (Fuller GM, 1985) y otros autores (Mirshahi SS, 1993; Vasse M, 1996) purificando el factor estimulante hepático encuentran que es la interleucina 6 la que es capaz de estimular la síntesis proteica del fibrinógeno y del mRNA.

Hay pruebas importantes de que el fragmento D y el DD prolongan el tiempo de formación del coagulo de fibrina interfiriendo en el ensamblaje para la formación de monómeros de fibrina (Williams JE, 1981). Los productos de degradación de la fibrina se ha visto que tienen un efecto estimulador de la angiogénesis e inducen una proliferación de todos los tipos celulares de la membrana colliandrica del pollo (Thompson WD, 1986), sin embargo no se observa actividad cuando los productos son el resultado de la degradación del fibrinógeno (Smith EB, 1982). Extractos de lesiones gelatinosas estimulan la síntesis de DNA en esta membrana (Thompson WD, 1987).

Estos resultados sugieren que los productos de degradación de la fibrina en la lesión pueden ser un factor que estimula la proliferación de células musculares lisas (Smith EB, 1990). Sin embargo se han descrito resultados contrarios con los fragmentos D y E procedentes del fibrinógeno, los cuales inhiben el crecimiento de células musculares lisas en cultivo (Ishida T, 1982). La digestión del fibrinógeno por plasmina estimula la liberación de factores de crecimiento en células endoteliales en cultivo (Ishida T, 1982). La quimiotaxis de leucocitos también está asociada con fragmentos derivados del fibrinógeno o la fibrina. En el desencadenamiento de la aterogénesis, uno de los puntos que parece tener mayor importancia es la atracción de monocitos macrófagos y Richardson y otros autores (Richardson DL, 1976; Skogen WF, 1988) han descrito que FPB y los fragmentos D y E derivados del fibrinógeno son quimiotácticos para monocitos de sangre periférica.

El papel patológico del fibrinógeno en los tejidos se conoce menos que su papel en el mantenimiento de la hemostasia. Sin embargo, diversos estudios “in vitro” demuestran la participación de la fibrina en la migración de macrófagos (Lanir N, 1988), leucocitos (Languino LR, 1995), fibroblastos (Brown LF, 1993), células endoteliales (Henke CA, 1996) y células musculares lisas (Naito M, 1996). Es particularmente interesante destacar que los leucocitos utilizan fibrina como puente molecular para la migración transendotelial (Languino LR, 1995).

Varios grupos también han demostrado que las células endoteliales incubadas con fibrina forman brotes similares a los tubos capilares formados durante la angiogénesis (Chalupowicz DG, 1995; Nehls V, 1996).

El fibrinógeno es un componente habitual de la pared vascular, se ha observado su presencia en íntima de pared arterial sin signos de trombosis (Shekhonin BV, 1990). La retención del fibrinógeno en la pared depende del entrecruzamiento con las transglutaminasas del tejido más que de su transformación a fibrina (Valenzuela R, 1992).

La fibrina se encuentra en la pared arterial, normalmente confinada en la placa arteriosclerótica. Hay pruebas de que esta fibrina se forma “in situ” por factores tisulares atrapados en la placa (Smith EB, 1994a). La fibrina puede contribuir de varias maneras en la progresión de la placa. Por ejemplo a través de los productos de degradación que son mitogénicos (Smith EB, 1995).

El fibrinógeno y la fibrina también pueden servir como reservorios de muchas proteínas como Lp(a) y fibronectina que está demostrado que pueden unirse a la fibrina y ambas se encuentran en la placa arteriosclerótica (Romanic AM, 1998). Se ha demostrado bioquímicamente que el FGF también se une a la fibrina (Sahni A, 1998).

Para determinar el papel del fibrinógeno en la arteriosclerosis se han generado ratones transgénicos deficientes en apoE y fibrinógeno y no se han encontrado diferencias con ratones solo deficientes para apoE, sugiriendo que la fibrina no juega un papel destacado en la progresión de la arteriosclerosis (Xiao Q, 1998).

Aproximadamente el 10-25% del fibrinógeno del cuerpo es extravascular y del circulante en la sangre cerca de un 3% está localizado en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas (Chung DW, 1984). No se sabe si es debido a una biosíntesis en los megacariocitos/plaquetas o si bien, es captado de la sangre. A favor de este último supuesto, está el hecho de que las plaquetas no contienen la variante del fibrinógeno y-leu427 generada durante el proceso de transcripción primaria de la cadena y que en el

fibrinógeno humano constituye un 12% del fibrinógeno en sangre. Esta variante tiene un reducido afinidad por las glicoproteínas IIb/IIIa del receptor en la captación del fibrinógeno de la sangre (Kunicki TJ, 1985).

Las funciones fisiológicas fundamentales del fibrinógeno comprenden: el mantenimiento de la viscosidad sanguínea, mediar en la formación de agregados plaquetares y participa en la cascada de la coagulación como sustrato coagulable, así como en la reparación continua del endotelio vascular o en las roturas traumáticas puntuales.

### **Influencia de los genes y el medio ambiente en los niveles de fibrinógeno.**

Los niveles de fibrinógeno están sujetos a variaciones considerables. Se han descrito variaciones estacionales, observándose niveles mayores durante el invierno posiblemente debido a la mayor frecuencia de infecciones respiratorias (Woodhouse PR, 1994). También se observan incrementos del fibrinógeno con la edad y la menopausia (Lee AJ, 1990; Folsom AR, 2000). Los niveles de fibrinógeno se incrementan alrededor de 0,1 a 0,2 g/l por década en la edad adulta (Folsom AR, 1999). En ciudades industrializadas los niveles de fibrinógeno también son mayores (Iso H, 1993).

Los niveles elevados de fibrinógeno también pueden estar determinados genéticamente de forma parcial con un coeficiente estimado de heredabilidad de 0,3-0,5 (Woodhouse PR, 1994). Algunos polimorfismos en el gen que codifica para el fibrinógeno en el cromosoma 4, están asociados con variaciones de su concentración plasmática de este, tanto en condiciones basales como con estímulos (Humphries SE, 1999).

Se ha demostrado que el alelo A-455 está asociado con el incremento de los niveles de fibrinógeno. La magnitud del efecto indica que podría tener especial importancia en el riesgo de trombosis (Meade TW, 1986). Los hombres con alelo A tendrían un 40% más de riesgo de sufrir accidentes trombóticos. La magnitud del efecto se modula por muchos factores ambientales por lo que en unos individuos este alelo según su estilo de vida tendrá mucha importancia y en otros no (Humphries SE, 1999).

**FIBRINOGENO Y HEMOSTASIA:**

La hemostasia, presenta dos aspectos bien diferenciados, la producción de fibrina o fase coagulativa y la disolución de la fibrina, fibrinolisis.

**Coagulación:**

La estimulación del sistema extrínseco (pared vascular), del sistema plaquetario o del intrínseco (sangre) son los que desencadenan este proceso.

***Sistema extrínseco:***

Los eventos iniciales que desencadenan este sistema implican al colágeno y TF. El TF actúa como receptor celular y como cofactor para la activación del factor VII a factor VIIa (Camerer E 1996). El TF es liberado por las células endoteliales dañadas y por los macrófagos. El enzima responsable de la activación inicial del factor VII no se conoce aunque estudios recientes parecen indicar que los fosfolípidos estarían implicados en esta activación (Kjalke M, 2000). La activación del factor VII puede darse a través del factor VIIa (auto activación), por el factor IX, X, XII, trombina o hepsina (Camerer E, 1996). En la sangre, después de un lesión, el TF se expone a las proteínas plasmáticas y se une al factor VII activado (VIIa) (Camerer E, 1996), intensificando en sobremanera su actividad procoagulante. Este complejo activa al factor X, bien directamente o bien vía indirecta a través de la activación del factor IX. Trabajos recientes (Camerer E, 2000) asignan a este complejo un papel activo en la reparación temprana de heridas.

La activación del factor X produce la transformación de protrombina a trombina.

La progresión de la coagulación dependería de un “feed back” positivo promovido por trombina y factor Xa que activarían a los factores XI, VIII, V (Broze GJ, 1995). La inhibición vendría dada además de por la antitrombina, por la interacción de la trombina con la trombomodulina que activaría a la proteína C (PC) dando la proteína C activada (PCa). La PCa inhibe al factor Va y al VIIIa en un feed back negativo (Esmon CT, 1992). Otro inhibidor específico del sistema extrínseco es el inhibidor del factor tisular (TFPI), este inhibidor forma un complejo cuaternario TF-VIIa-Xa-TFPI1 en la superficie celular, regulando así la acción del TF (Ott I, 2000). Su función sería la de regular la duración de la fase inicial y tendría poca influencia en la propagación de la coagulación, a diferencia de la antitrombina III que sería más importante en esta fase. La PC que no puede actuar en ausencia de trombina influiría en la duración de la propagación de la coagulación inactivando al factor Va (Mann KG, 1998). Ver figura 8.

La trombina formada ataca al fibrinógeno, liberándose los fibrinopeptidos A (de la cadena  $\alpha$ ) y B (de la cadena  $\beta$ ) (Blomback B, 1972), que pueden ser detectados en sangre, y lo convierte en fibrina. Seguidamente se forman los polímeros de fibrina soluble. La trombina también activa al factor XIII el cual cataliza la reacción de polimerización de la fibrina dando lugar a enlaces cruzados entre los polímeros y que tiene como resultado la formación de fibrina insoluble o estabilizada (Folk JE, 1977), como se comentó con más detalle al hablar del fibrinógeno.

### ***Sistema plaquetar:***

En las zonas con una lesión vascular, la exposición al flujo sanguíneo del colágeno y la trombina generada por la activación de la cascada de la coagulación, así como la epinefrina circulante, actúan como potentes activadores plaquetarios. Otra vía de activación de la agregación plaquetaria está mediada por ADP, que es liberado por hemólisis de eritrocitos en áreas de lesión vascular. Estos agonistas de la plaqueta estimulan la descarga de calcio y la consiguiente liberación de su contenido granular. La liberación de ADP y serotonina por parte de las plaquetas produce la estimulación de las plaquetas adyacentes, desencadenándose la agregación plaquetaria y la consiguiente formación de un trombo.

Cualquiera de los mecanismos de activación de las plaquetas inducen un cambio en su conformación y la subsiguiente exposición de los receptores plaquetarios. Esto permite a las proteínas de la cascada de la coagulación unirse a la superficie de las plaquetas acelerando la reacción de la coagulación. El factor vWF juega un papel importante en la adhesión de las plaquetas a través de la unión a la glicoproteína Ib (Hickey MJ, 1989). El fibrinógeno forma puentes entre las plaquetas activadas uniéndose al receptor GIIb/IIIa (Bennett JS, 1982), la unión del fibrinógeno plasmático a este receptor activado provoca cambios de conformación en ambos. Las plaquetas no activadas se unen al fibrinógeno inmovilizándolo por el mismo receptor pero con una afinidad baja (Bennett JS, 1999).

El factor Xa, el factor Va, iones de calcio y la protrombina se unen a los fosfolípidos de la superficie plaquetar formando el complejo protrombina que cataliza la formación de trombina de forma más rápida que si solo actuara el factor X (Hassouna HI, 1993)

La trombina también activa a las plaquetas incrementando la agregación y al factor V y VIII (Broze GJ, 1995). El factor XIIIa se une también a otras proteínas plasmáticas

como la fibronectina y la  $\alpha$ 2-antitripsina incorporándolas a las cadenas  $\alpha$  de la fibrina y por tanto al coagulo (Davie EW, 1991). Ver figura 9.

### ***Sistema intrínseco:***

El sistema intrínseco de la coagulación se inicia con la fase de contacto. En ella intervienen cuatro componentes: los factores de la coagulación XII y XI, la precalicreína y el quiminogeno de alto peso molecular (HMWK). La fase de contacto se inicia con la adsorción del factor XII sobre determinadas superficies con carga eléctrica negativa. No se requieren iones calcio. Como consecuencia de esta interacción, se generan pequeñas cantidades de factor XIIa, que favorecen la activación de la precalicreína en calicreína.

La calicreína generada activa a nuevas moléculas de factor XII, con lo que el proceso se autoalimenta. El factor XIIa convierte al factor XI en factor XIa, en presencia de HMWK. Con la formación del factor XIa, termina la fase de contacto.

El factor XIa actúa de forma autocatalítica activando al XI (Naito K; 1991) y en presencia de calcio cataliza la conversión del factor IX a IXa (Walsh PN, 1984). El factor IXa, X, iones calcio y la trombina activan al factor VIIIa que se une a la superficie de las plaquetas para catalizar la activación del factor X a Xa (Hassouna HI, 1993). El factor Xa entra a formar parte del complejo protrombinasa para inducir una amplificación de la formación de trombina, activando a los factores XI, VIII y V (Broze GJ, 1995). Ver figura 8.

### ***Inhibidores de la coagulación***

Esencialmente son tres las vías que regulan la hipercoagulabilidad plasmática: la de los inhibidores de trombina (antitrombina III y cofactor II de la heparina), los inhibidores de los factores Va y VIIIa (sistema de la PC) y el TFPI.

La antitrombina III es una proteína natural con gran poder anticoagulante. Es una glicoproteína sintetizada en hígado, con un peso molecular de 58 kD. Se une a la trombina y evita la liberación de los FPA y FPB del fibrinógeno (Bauer KA, 1991), evita la activación de los factores V y VIII e inhibe la activación y agregación de las plaquetas. Además también inhibe a los factores IX, Xa y XIa (Holmer E, 1981).

Otra proteína con efecto anticoagulante es la PCa, que inactiva a los factores Va (Marlar RA, 1982) y VIIIa (Radcliffe R, 1976). Esta inactivación reduce la capacidad del complejo protrombinasa en la formación de trombina. La activación de la PC circulante

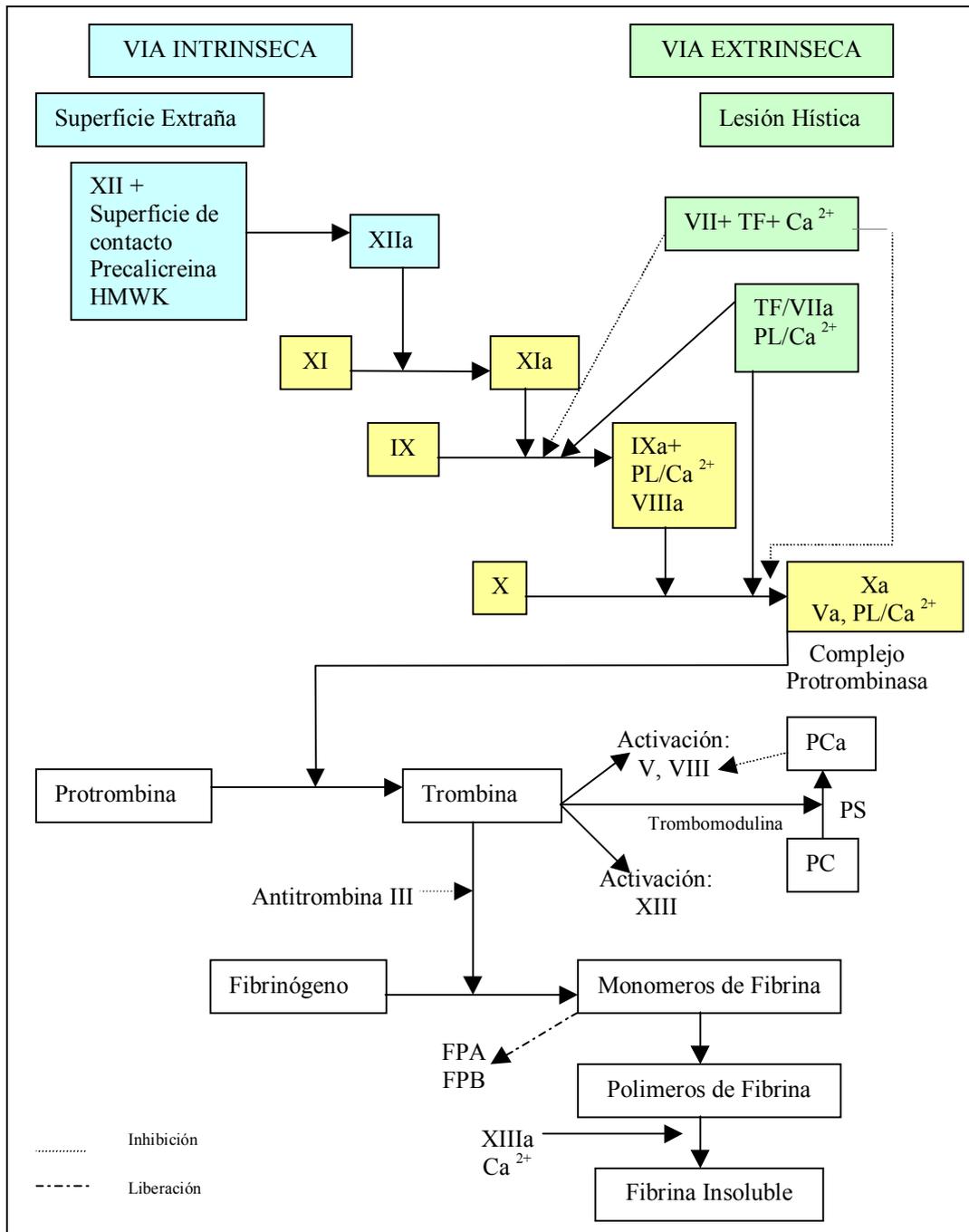
---

se produce en la superficie de las células endoteliales por el complejo trombina y uno de sus receptores la trombomodulina (Esmon CT, 1982). La PCa también degrada al PAI-1 convirtiéndolo en PAI-1 inactivado.

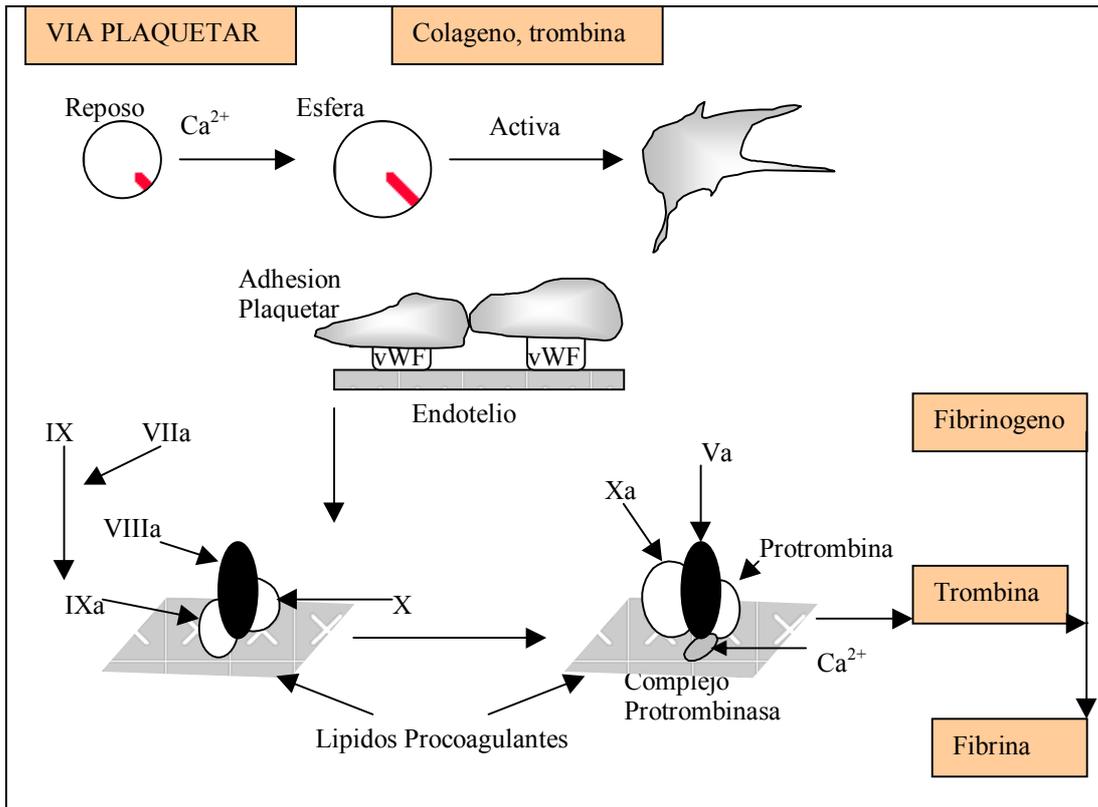
La proteína S es un cofactor de la PCa (Walker FJ, 1980).

La trombina que está unida a la trombomodulina pierde su capacidad de activar las plaquetas (Esmon NL, 1983) y su actividad enzimática sobre el fibrinógeno y el factor V (Esmon CT, 1982). La acción inhibidora de la coagulación del sistema de la PC se desarrolla fundamentalmente a nivel endotelial.

Otro anticoagulante fisiológico aunque en concentraciones mucho menores que la antitrombina III es el cofactor II de la heparina (Tollefsen DM, 1982). Su acción implica la regulación de la formación de trombina en tejidos extravasculares. Es un inhibidor de la trombina, su actividad se incrementa sustancialmente cuando forma complejo con el dermatán sulfato o con la heparina. El TFPI actúa inhibiendo al TF unido al factor VIIa. Su mecanismo de acción no está totalmente establecido pero parece ser que en una primera fase se une al factor Xa. Este complejo se uniría al formado por TF –VIIa y lo inactivaría. La heparina favorece la liberación de TFPI (Aznar J, 2000).



**Figura 8.-** Diagrama representativo del sistema de coagulación : **vía intrínseca**, **vía extrínseca**.



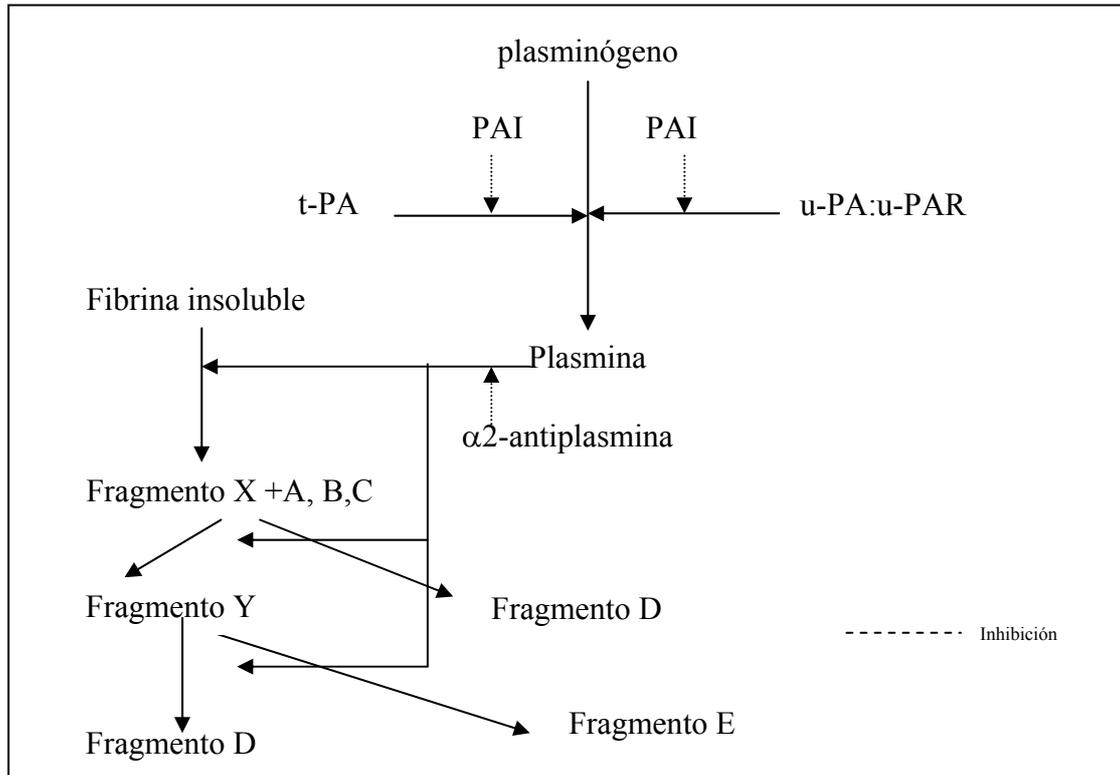
**Figura 9.-** Coagulación: vía plaquetar, modificado de Wakefield (Wakefield TW, 1997).

### Sistema fibrinolítico

El sistema fibrinolítico es el encargado de disolver la fibrina por acción enzimática. Simultáneamente al proceso de formación del trombo se produce la lisis del mismo, esto previene de la formación de coágulos que induzcan una trombosis intravascular masiva. El plasminógeno, el t-PA y la  $\alpha 2$ -antiplasmina se incorporan al interior del coagulo mientras se forma (Wakefield TW, 1997). De hecho la trombina promueve la liberación de t-PA desde las células endoteliales así como induce la producción de PAI-1 desde estas mismas células (Gelehrter TD, 1986).

La reacción central del sistema fibrinolítico es la activación del plasminógeno a plasmina por los activadores (PAs) t-PA y u-PA (Collen D, 1991) y su regulación por los inhibidores entre ellos el PAI-I.

La plasmina que es un enzima proteolítico, actúa sobre la fibrina, degradándola en una secuencia de fragmentos denominados globalmente PDF (productos de degradación de la fibrina) y fibrinopeptidos terminales entre los que destaca el DD por su importante valor analítico. Todo este proceso está mediado por una serie de activadores, inhibidores, receptores y por el plasminógeno. Ver figura 10.



**Figura 10.-** Sistema Fibrinolítico.

### **Plasminógeno:**

Es una serin proteasa sintetizada en hígado, formada por 791 aminoácidos (Sadler JE, 1985). Se organiza en 7 dominios estructurales que comprenden un péptido de preactivación (1-77), cinco dominios kringle con secuencias homologas y un dominio proteico (562-791).

Los kringles contienen lugares de unión a lisina y amino hexil que juegan un papel crucial en el reconocimiento de la fibrina, la superficie celular y de la  $\alpha_2$ -antiplasmina.

El gen humano para el plasminógeno se localiza en el brazo largo del cromosoma 6, en las bandas q26 o q27 y la longitud del gen de 52,5kb. Cada uno de los 5 kringles está formado por 2 exones separados por un único intron en el medio de cada estructura. El gen está estrechamente relacionado con el de la apo(a).

El plasminógeno se convierte en plasmina por la rotura de una unión peptídica entre los aminoácidos Arg561-Val562.

El peso molecular del plasminógeno es de 92 kD y el de la plasmina de 85 kD. La concentración plasmática de plasminógeno es de 200 mg/l (Collen D, 1999).

La función principal de la plasmina es degradar la fibrina, sin embargo también actúa sobre otros substratos constituyentes de la matriz extracelular como son el colágeno IV y V, proteoglicanos, laminina, fibronectina y vitronectina. También puede activar “in vitro” MMPs latentes como la 1, 3, 9, 10, 13 (Knauper P, 1997; Okada Y, 1992; Suzuki K, 1990); elastasas, factores de crecimiento del tipo TGF- $\beta$  (Rifkin DB, 1999) o el bFGF (Falcone DJ, 1993) liberándolo de la matriz a la que está unido en forma latente. bFGF es pro-angiogénico y “up”-regulador de u-PA, PAI-1 y de la expresión de gelatinasas (Pepper MS, 1990) e inhibe la expresión de TIMP-2 (inhibidor endógeno de MMPs, tipo 2) (Murphy AN, 1993).

El plasminógeno se convierte en plasmina por la acción de los activadores t-PA ó u-PA pero esto solo ocurre de forma eficiente en la superficie de la fibrina donde los activadores y el plasminógeno están juntos.

La plasmina libre en sangre es inactivada rápidamente por  $\alpha$ 2-antiplasmina, su vida media es de 0,1 segundos. La plasmina generada en la superficie de la fibrina está parcialmente protegida de esta inactivación. Los lugares de unión a lisina son importantes en esta interacción entre la plasmina (plasminógeno) y la fibrina y entre la plasmina y la  $\alpha$ 2-antiplasmina.

Los receptores celulares para la plasmina y sus activadores dirigen su acción a zonas de la superficie celular donde su actividad es requerida o bien intervienen en la eliminación de los activadores. Se han descrito lugares con alta afinidad para unir el plasminógeno en varios tipos celulares incluyendo células endoteliales (Hajjar KA, 1995). Esta unión está mediada por los lugares lisina de los kringles 1-3 de la molécula de la plasmina (plasminógeno), protegiéndola también de la inhibición por la  $\alpha$ 2-antiplasmina.

Si los lugares de unión lisina de la plasmina están ocupados, la acción de la  $\alpha$ 2-antiplasmina es 50 veces menor. Por tanto está protegida de una inactivación rápida.

Se han descrito al menos ocho proteínas implicadas en la unión al plasminógeno. Entre ellas hay miembros de la familia de los receptores de las lipoproteínas de baja densidad como gp330 y LRP, anexina II, GbIIb/IIIa y  $\alpha$ -enolasa. En las células neuronales también se ha visto una unión a amfoterina.

La Lp(a) con una homología estructural con la molécula de plasminógeno puede competir con ésta por los lugares de unión a células endoteliales (Nachman RL, 1992). Sin embargo el debate de la interferencia de la Lp(a) con el sistema fibrinolítico sigue abierto.

Se han identificado dos activadores fisiológicos del plasminógeno que son t-PA y u-PA. Estos activadores representan el papel dual del sistema fibrinolítico: el mecanismo que media el t-PA está envuelto inicialmente en la hemostasis de la fibrina y el de la u-PA parece implicar además fenómenos como la migración o la remodelación de tejidos. Como consecuencia de este papel dual tal vez el nombre que expresaría mejor el sistema fibrinolítico, sería el de sistema del plasminógeno.

### ***Activadores del plasminógeno (PAs)***

#### ***Activador tisular del plasminógeno (t-PA):***

Al igual que la plasmina, el t-PA es una serin proteasa que se sintetiza como una única cadena polipeptídica que contiene 530 aminoácidos (sc-t-PA) (Pennica D, 1983). Después de una actividad proteolítica sobre ella se convierte en una molécula con dos cadenas polipeptídicas conectadas por puentes de sulfuro (tct-PA o t-PA). La molécula contiene 35 residuos de cisteína y tres aminoácidos con capacidad de ser glicosilados (Asn118, 186, 148). Esta está compuesta por varios dominios con homología con otras proteínas: un dominio dedo (residuos 4-50), un dominio similar al factor de crecimiento celular (residuos 50-87), dos "kringles" (residuos 87-176, 176-262) y el dominio proteico (residuos 276-527), ver figura 10 .

La cadena carboxiterminal contiene la actividad proteolítica y la parte amino terminal, los dominios que determinan su interacción con las proteasas, proteínas de la matriz y receptores celulares.

La unión del t-PA a la fibrina está mediada por el finger y el segundo kringle.

El gen humano está localizado en el cromosoma 8 (8p12-q11.2), la longitud del gen es de 36,6 kb. El peso molecular es de 68 kD y la concentración plasmática de 0,005 mg/l.

La actividad del t-PA se ve incrementada por su interacción con la fibrina. Una vez unido a este sustrato tanto la forma monocatenaria como la bicatenaria son más activas.

El t-PA se sintetiza en las células endoteliales (Banyai L, 1983), después de su liberación a la sangre, la vida media es muy corta de 5-10 minutos, a menos que encuentre un lugar de unión específico, en particular la fibrina. La eliminación del t-PA se produce en el hígado. Las células endoteliales contienen un pool de t-PA que puede

ser liberado rápidamente sí son expuestas a sustancias activas como la bradiquinina, factor activador de plaquetas o trombina (van den Eijnden-Schrauwen Y, 1995; Emeis JJ, 1997). Las vesículas en las que se almacena el t-PA son diferentes de las que almacenan al vWF y la P-selectina (Emeis JJ, 1997).

El tamaño de este pool depende de la tasa de síntesis del t-PA. Esta síntesis puede estar influenciada por activadores de la proteína quinasa C, retinoides y ciertas triazolobenzodiazepinas (Kooistra T, 1994). Los mediadores de la inflamación como TNF- $\alpha$ , IL-1 y LPS incrementan también la síntesis de t-PA.

La regulación de la expresión del gen que codifica para el t-PA parece estar inducida en parte por la trombina.

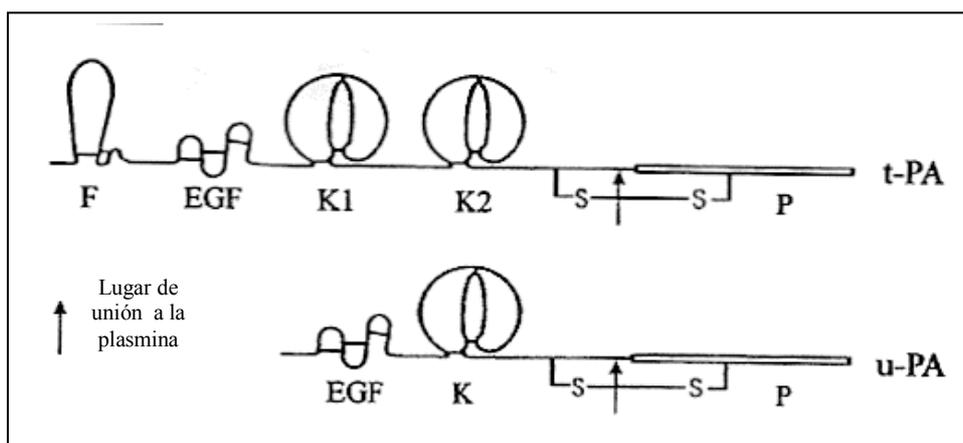
Se han descrito receptores específicos para el t-PA en células endoteliales (Barnathan ES, 1988).

El t-PA también puede unirse a la anexina II en células endoteliales en cultivo, (Hajjar KA, 1994) sugiriendo, que la anexina II al igual que la fibrina formaría un complejo ternario con t-PA y plasminógeno en la superficie de la célula endoteliales (Hajjar 1995).

#### ***Activador del plasminógeno tipo uroquinasa (u-PA):***

Es una serin proteasa sintetizada en forma monocatenaria (prouroquinasa o “single chain urokinase” scu-PA) compuesta por 411 aminoácidos y con un peso molecular de 54 kD. Consta de un dominio de factor de crecimiento epidérmico, un dominio kringle y un dominio proteico que contiene la zona catalítica responsable de la activación del plasminógeno (Bachmann F, 1984), ver figura 11. El dominio factor de crecimiento epitelial, es responsable de la unión de scu-PA al receptor uPAR, que está presente en la superficie de una gran variedad de células. scu-PA se une a uPAR y se convierte en la forma activa bicatenaria (“two chain urokinase” u-PA o tcu-PA) por una acción catalítica en el péptido Lys 158.

El gen humano de la u-PA se localiza en el cromosoma 10 (Collen D, 1999). La forma scu-PA tiene una vida media de 7 minutos en humanos (Stump DC, 1987). Es sintetizada y secretada por una gran variedad de células (endoteliales, musculares lisas, fibroblastos, etc) y es eliminada principalmente por el hígado. Su concentración plasmática es de 0,008 mg/l. La vida media en plasma de la u-PA es de 15 minutos (Weitz JI, 1999).



**Figura 11.-** Estructura de los dominios del t-PA y la u-PA (Weitz JI, 1999)

### **Receptor del activador tipo uroquinasa (uPAR, CD87):**

Es un receptor específico en la superficie celular, sintetizado como una cadena polipeptídica compuesta por 313 aminoácidos. Después de sufrir un procesamiento post-translacional en el extremo carboxiterminal, pasa a tener 283 aminoácidos que se anclan a la membrana plasmática por una cola glicosil fosfatidil inositol (Ploug M, 1991; Dano K, 1994). Este receptor pertenece a la familia de proteínas de superficie ricas en cisteína y está fuertemente glicosilado. Su peso molecular es de 55 kD.

Su estructura consta de tres dominios homólogos y dos regiones que los conectan entre sí. La unión con scu-PA se realiza en la región amino terminal en el dominio de factor de crecimiento (a través del residuo 84) (Appella E, 1987).

La unión de u-PA a la superficie celular, a través del receptor uPAR, permite que u-PA actúe como un ectoenzima asociado a la membrana, focalizando la proteólisis en el entorno pericelular inmediato (Estriecher A, 1990; Dano K, 1985). Por tanto limita la activación del plasminógeno a áreas focales como pueden ser las protusiones celulares producidas en la migración celular y la invasión. La interacción de u-PA con la célula a través del receptor induce una transducción de señales y una fosforilación específica de proteínas (Rao NK, 1995; Dumler I, 1993). En células musculares lisas vasculares, esta transducción de señales parece seguir dos vías: una directa a través de la cascada desencadenada por Jak/Stat y que estaría implicada en la regulación de la migración celular, y una segunda vía Src-like cuya función aun no ha sido bien establecida (Dumler I, 1998).

Este receptor está presente en muchos tipos celulares incluyendo células musculares lisas, macrófagos, fibroblastos, monocitos y células endoteliales (Barnathan ES, 1992). Su función es doble ya que por una parte focaliza la proteólisis a través de su unión con u-PA facilitando la migración de células musculares lisas vasculares y leucocitos activados entre otras y por otra elimina el complejo u-PA:PAI-1 por internalización. En células no migratorias los uPAR se distribuye uniformemente por toda la superficie celular, mientras que en las células que pueden migrar se polarizan en la zona en la dirección en que migrara la célula (monocitos (Estriecher A, 1990; Gyetko MR, 1994), células endoteliales (Pepper MS, 1993), o células musculares lisas vasculares (Okada SS, 1996)). uPAR no solo liga a u-PA, también puede unirse a la vitronectina (VN) (Waltz DA, 1994). La unión de uPAR a u-PA y vitronectina no es exclusiva mutuamente, sino que además u-PA estimula que se produzca (Wei Y, 1994) favoreciendo la expresión de epitopos para vitronectina, integrinas y caveolina (Koshelnick Y, 1999) y por lo tanto modificando la especificidad del sustrato. De esta forma u-PA transforma a uPAR en un receptor pleiotropico para ligandos de otras moléculas de superficie (Blasi F, 1999).

Todos estos procesos están regulados por el inhibidor de u-PA, el PAI-1, que puede unirse a la u-PA libre o a la u-PA asociada a su receptor. La unión de PAI a u-PA-uPAR produce cambios en las propiedades de uPAR, ya que el complejo u-PA-PAI-1 manifiesta un lugar de unión para el receptor transmembrana afín a LDL (LRP) (Blasi F, 1999). A través de la acción combinada de uPAR y LRP, se induce la internalización del complejo u-PA-PAI-1 (Nykjaer A, 1992; Olson D, 1992), la degradación de u-PA y el reciclado de uPAR que vuelve a la superficie celular (Blasi F, 1999). PAI controla así la actividad proteolítica en la superficie celular y la localización física de uPAR en la membrana plasmática.

Los factores de crecimiento bFGF, aFGF y VEGF inducen un incremento en el número de receptores de u-PA (Koolwijk P, 1996).

El sistema u-PA-uPAR-PAI-1 tiene un papel primordial en la migración. La alta afinidad de la interacción uPAR-VN permite una fuerte adhesión y la interacción de uPAR con las integrinas condiciona una selectividad del sustrato. Por otra parte la actividad quimiotáctica de uPAR puede inducir una alta y eficiente migración celular, y la interacción uPAR/factores de crecimiento/integrinas modulan su expresión y función (Bianchi E, 1996).

### ***Inhibidores de la fibrinólisis***

#### ***Inhibidores de los activadores de plasminógeno (PAIs):***

Pertencen a la familia de las serin proteasas (serpinas). Hay varios inhibidores de este tipo, los más conocidos son el PAI-1 y el PAI-2. De ellos el más importante es el PAI-1. El PAI-1 es una glicoproteína de 52 kD, localizada en el cromosoma 7. Se sintetiza en células endoteliales, células musculares lisas, hepatocitos y otros tipos celulares en cultivo (Loskutoff DJ, 1991). Su concentración plasmática es de 0,05 mg/l. PAI-2 se presenta en dos formas distintas una intracelular no glicosilada de 47 kD y otra forma glicosilada secretada de 60 kD. El gen se localiza en el cromosoma 18 (Wohlwend A, 1987). La actividad de los PAIs en plasma humano, normalmente se debe casi exclusivamente al PAI-1. Su actividad reguladora se ejerce sobre la actividad del t-PA y la u-PA. El PAI-1 reacciona con el t-PA monocatenario, el t-PA bicatenario y la t-PA pero no con la scu-PA.

Cargas positivas en determinadas regiones del t-PA (296-304) y en la u-PA (179-184) están implicadas en esta rápida interacción con el PAI.

La eliminación del PAI es muy rápida y se realiza en el hígado (Kruithof EKO, 1988). La síntesis del t-PA y del PAI-1 por células endoteliales está altamente regulada (Collen D, 1982) pero pocos agonistas estimulan la síntesis del t-PA sin afectar la síntesis del PAI-1. La síntesis y secreción de PAI-1 puede ser modulada por varios agonistas (Loskutoff DJ, 1991) como TNF- $\alpha$ , IL-1, endotoxinas (LPS), TGF- $\beta$ , lipoproteínas oxidadas y trombina.

El PAI-1 no se encuentra almacenado en el interior de casi ningún tipo celular sino que es rápidamente secretado después de la síntesis, excepto en las plaquetas que contienen el PAI-1 inactivo y el funcional.

La célula endotelial, por lo tanto, es capaz de liberar t-PA del pool que tiene almacenado y a través de una regulación de la expresión diferencial del t-PA y el PAI-1 modular la fibrinólisis en la sangre.

#### ***Inhibidores de la plasmina***

##### ***$\alpha$ 2-antiplasmina:***

Es una glicoproteína que contiene 464 aminoácidos, su peso molecular es de 67 kD. Es la única serpina con un extremo carboxiterminal de 51 aminoácidos que contiene un lugar de unión secundario que reacciona con los lugares de unión lisina de los kringles 1-3, tanto del plasminógeno como de la plasmina. La región amino terminal puede

unirse a la cadena A $\alpha$  de la fibrina en un proceso que requiere Ca<sup>2+</sup> y que es catalizado por el factor XIIIa. Su concentración plasmática es de 70 mg/l.

La  $\alpha_2$ -antiplasmina inhibe inmediatamente a la plasmina que no está unida a la fibrina (Holmes WE, 1987), pero esta reacción se ve atenuada 50 veces cuando hay una unión de la plasmina con la fibrina.

Las proteínas hepáticas LRP y LRP-like son las encargadas de eliminar los complejos plasmina- $\alpha_2$ -antiplasmina (Orth K, 1992; Bu G, 1994).

## **FISIOPATOLOGÍA DE LA FIBRINOLÍISIS**

Niveles elevados de PAI-1 se han asociado con alteraciones vasculares como la trombosis y la arteriosclerosis (Paramo JA, 1985; Hamsten A, 1987; Aznar J, 1988; Olofsson BO, 1989). Las concentraciones excesivas de PAI-1 inducen una disminución de los niveles de actividad del t-PA y de la u-PA. Este descenso puede alterar la remodelación de los tejidos e inducir un acumulo de la matriz extracelular. Por técnicas inmunohistoquímicas se ha localizado al PAI-1 en arterias normales en la íntima, media y en los vasa vasorum de la media. En arterias con lesión arteriosclerótica también se detecta rodeando la lesión en las células espumosas y adyacente a la lamina elástica interna en la matriz extracelular (Lupu F, 1993), sugiriendo que la acumulación extracelular de PAI-1 podría contribuir a las complicaciones trombóticas asociadas a la rotura de la placa.

En los trabajos de Schneiderman (Schneiderman J, 1992) se demuestra que hay un incremento muy marcado de los niveles de mRNA para PAI-1 en aortas arterioscleróticas comparadas con arterias normales. Estos datos también se confirman en los del estudio de Shireman (Shireman PK, 1996) que observa PAI-1 intracelular en células endoteliales y células musculares lisas así como en la matriz extracelular colocalizando con vitronectina (Lupu F, 1993).

En el estudio realizado por Raghunath (Raghunath PN, 1995), con arterias coronarias con diferentes grados de patología, observa que la expresión de PAI-1 es predominante sobre la de los PAs en el endotelio, la íntima y la media en estas arterias y podría predisponer a una trombosis coronaria.

Varios factores asociados con los procesos inflamatorios y arterioscleróticos inducen incrementos de la expresión de PAI-1 en células endoteliales en cultivo (Loskutoff DJ, 1991). Los más importantes en el contexto de enfermedades vasculares son los

mediadores de la inflamación: TNF- $\alpha$ , IL-1, TGF- $\beta$ , liberados por las plaquetas y los macrófagos (Klagsbrun M, 1989). La síntesis de PAI-1 por las células musculares lisas se puede incrementar en respuesta a factores de crecimiento asociados a plaquetas o derivados de ellas, así como por TGF- $\beta$  (Fuji S, 1990; Reilly CF, 1991).

En el estudio realizado por Robbie (Robbie L, 1996) sobre arterias humanas normales y arterioscleróticas con técnicas de inmunohistoquímica y por inmunoensayo se observa que el PAI-1 se distribuye en íntima y media de vasos normales. En arterias con placas arterioscleróticas las concentraciones de PAI-1 se encuentran elevadas significativamente sobre todo en el núcleo lipídico de estas placas y en la íntima alrededor de ella y al igual que en las arterias normales asociado con áreas de células musculares lisas en la media. El incremento de PAI-1 podría ser debido a los macrófagos y células musculares lisas que pueden expresar mRNA para PAI-1 (Lupu F, 1993) en arterias lesionadas.

La presencia de estos niveles elevados de PAI-1 en la pared de arterias lesionadas podría promover la persistencia de fibrina intravascular adhiacente o reducir la rotura de la matriz extracelular (Laiho M, 1989). Sin embargo no se ha demostrado que este incremento de la concentración de PAI-1 en la íntima de arterias lesionadas este relacionada con los niveles plasmáticos de PAI y por tanto poder utilizarlo como marcador de la progresión de la arteriosclerosis. Aunque sí está determinado que las concentraciones plasmáticas de PAI-1 se encuentran incrementadas en varias patologías como obesidad, sepsis, diabetes y enfermedades coronarias.

Estudios realizados con ratones transgénicos deficientes en PAI, a los que se induce un trombo experimentalmente en carótida, mostraban un tiempo de lisis del coagulo prolongado (Matsuno H, 1999). La disrupción de este gen en ratones induce un ligero estado hiperfibrinolítico, resistencia a la trombosis venosa pero no perjudica a la hemostasia (Lijnen HR, 1996). Sin embargo esta deficiencia en humanos se manifiesta en un estado hemorrágico recurrente y prolongado en el tiempo.

Ljungner y Bergqvist (Gross JL, 1982; Ljungner H, 1984; Levin EG, 1994) fueron los primeros en demostrar que existe una disminución de la actividad de los PAs en arterias arterioscleróticas comparadas con arterias normales. Estudios clínicos posteriores, han puesto de manifiesto que en individuos con riesgo alto de sufrir infarto de miocardio o accidente cerebrovascular o pacientes con alteraciones en arterias coronarias, los niveles plasmáticos de PAI-1 y t-PA antigénico estaban elevados (Ridker PM, 1994; Juhan-Vague I, 1993; Ridker PM, 1993). Estos hallazgos dan fuerza a la hipótesis de que las

concentraciones plasmáticas de estas proteínas se incrementan como consecuencia de la progresión de la arteriosclerosis, o que la reducida capacidad fibrinolítica del plasma favorece la deposición de fibrina localmente y su acumulo en la matriz extracelular.

Estudios realizados en aortas con lesión arteriosclerótica (Padró T, 1995) muestran un incremento de t-PA activo en adventicia. El t-PA antigénico también se detecta en endotelio luminal y asociado con células de la miointima en lesiones tempranas. Se observan concentraciones elevadas de t-PA en el núcleo lipídico y en la media colocalizando con células musculares lisas.

La expresión de t-PA por células musculares lisas arteriales parece un fenómeno local relacionado con la lesión y la remodelación de la pared arterial.

El trabajo de Herbert (Herbert JM, 1994) muestra que el t-PA es un mitógeno directo y selectivo de las células musculares lisas aórticas humanas y puede actuar como un factor de crecimiento autocrino. También se observa un acumulo de t-PA en la zona que rodea al núcleo neurótico de las placas avanzadas. Sin embargo no se detecta t-PA libre en la íntima de las arterias lesionadas.

No está clara sin embargo sí la expresión de t-PA al igual que la de PAI-1 en la íntima se relaciona con sus concentraciones plasmáticas. Se han descrito incrementos de t-PA antigénico pero no de la actividad de t-PA en pacientes con lesiones arterioscleróticas avanzadas (Thompson SG, 1993) aunque parece que no existe una relación gradual con la extensión de la lesión.

En estudios recientes (Steins MB, 1999) realizados en arterias coronarias con diferentes grados de lesión se detecta el t-PA en las regiones laterales al núcleo fibroso y asociado con células musculares lisas que migran así como cerca de las áreas del núcleo. Por tanto la expresión y contenido de t-PA está incrementado en relación con la severidad de la lesión arterial en estas arterias. Esto podría contribuir a la desestabilización y rotura de la placa. Estudios en ratones deficientes en t-PA muestran una reducción del potencial trombolítico (Lijnen HR, 1996) no observándose depósitos espontáneos de fibrina.

Experimentos realizados en conejos sometidos a una dieta rica en colesterol muestran una regulación al alza de los niveles de uPAR en lesiones tempranas (Noda-Heiny H, 1995).

Estudios en arterias coronarias con lesión arteriosclerótica (Raghunath PN, 1995) ponen de manifiesto que la expresión de uPAR está incrementada significativamente en arterias arterioscleróticas, encontrándose resultados similares para u-PA.

En estudios inmunohistoquímicos se observa que la u-PA en arterias lesionadas está localizada en la placa arteriosclerótica (Robbie LA, 1996).

En estudios con arterias coronarias que muestran lesión arteriosclerótica (Kienast J, 1998) se detecta mRNA para u-PA y uPAR y en el endotelio luminal de arterias coronarias. También se aprecia la expresión de u-PA asociada a células musculares lisas en el borde de la región entre íntima y media en lesiones iniciales. La expresión de u-PA es un suceso normal durante la proliferación en los estadios iniciales de la aterogénesis. La u-PA además es un mitógeno selectivo para células musculares lisas (Kanse SM , 1997). En lesiones avanzadas la expresión de u-PA es particularmente predominante en áreas ricas en macrófagos adyacente a los extremos del núcleo neurótico de la placa. En extractos de tejidos, u-PA se detecta en forma de pro u-PA, el complejo u-PA/PAI o como u-PA inactiva, pero no en la forma activa de dos cadenas. Esto sugiere que la actividad de la u-PA estaría confinada localmente y sería neutralizada rápidamente al formar complejo con el PAI-1.

Carmeliet (Carmeliet P, 1997a) demuestra que la u-PA asociada a monocitos está implicada en la rotura de la placa arteriosclerótica. La u-PA genera plasmina y está puede tener un papel importante en la activación de MMPs como las colagenasas y también debilitar la matriz extracelular (Blasi F, 1993). La plasmina es generada en la superficie de los monocitos por la activación que ejerce la u-PA. Los monocitos en presencia de LDL y Lp(a) incrementan la expresión de u-PA y uPAR en forma dosis dependiente y esto podría contribuir a la activación de las MMPs y a la rotura de la cubierta fibrosa (Ganne F, 1999). El incremento de expresión de uPAR también podría estar implicado en un incremento de la adhesión de los monocitos y por tanto en el acumulo de células espumosas en la placa ateromatosa.

En un modelo en rata con infarto crónico de miocardio se han realizado estudios para evaluar el papel del sistema fibrinolítico en el infarto de miocardio, revelando estos estudios iniciales que el sistema fibrinolítico está implicado en el proceso (Carmeliet P, 1998). Los datos muestran que la proteólisis de la plasmina generada por la u-PA es necesaria para la reparación pero es necesario un balance preciso para evitar la destrucción y la rotura de la pared ventricular. En el proceso podrían estar implicadas varias MMPs.

Ratones deficientes para u-PA muestran depósitos de fibrina espontáneos, pero llegan a adultos y se reproducen (Carmeliet P, 1994).

Ratones deficientes para uPAR no desarrollan nunca depósitos espontáneos de fibrina o úlceras rectales como ocurre con los u-PA deficientes.

Estudios realizados en ratones deficientes para u-PA o t-PA, a los que se induce una lesión arterial ponen de manifiesto que la u-PA actuaría de mediador en la remodelación del tejido vascular y promueve la migración de células musculares lisas hacia la lesión.

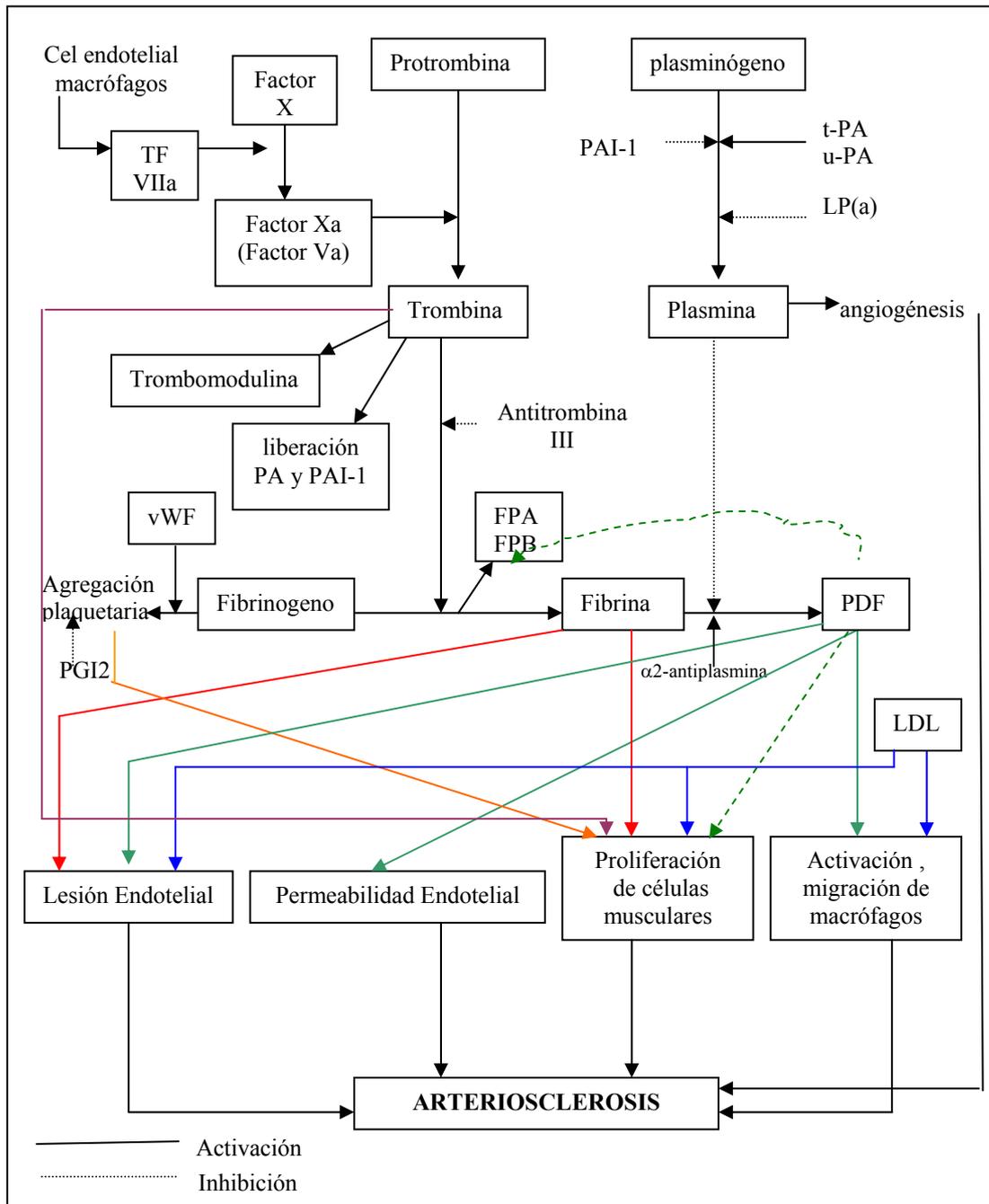
La trombosis puede promover la formación de neointima actuando como matriz para la migración de las células musculares lisas. Sin embargo en arterias de ratones deficientes en u-PA a los que se les induce una trombosis arterial se observa que la trombosis es más persistente y la formación de neointima muy baja, sugiriendo que la presencia de un trombo mural no es suficiente e incluso puede impedir la formación de neointima en estos ratones (Carmeliet P, 1997b).

Ratones deficientes para uPAR y t-PA muestran acumulos de fibrina en hígado, sin embargo las consecuencias trombóticas son mínimas si se comparan con las de los ratones deficientes en u-PA/t-PA que presentan grandes depósitos de fibrina, muchos órganos dañados y no cicatrización de heridas (Romer J, 1996).

La interacción entre la sangre y la pared arterial lesionada es un mecanismo que refuerza la progresión de la enfermedad cardiovascular. La rotura de la placa arterial con una exposición súbita de los componentes subendoteliales de la pared es seguida de una deposición de plaquetas y una activación de la coagulación, llevando todo ello a una trombosis mural oclusiva o subclínica (Fuster V, 1992a). Diversos estudios han sugerido que en la pared arterial hay una continua deposición y lisis de fibrina (Bini A, 1989; Smith EB, 1990). En trabajos simultáneos se han buscado marcadores plasmáticos que determinen la activación de la coagulación y la fibrinólisis subsiguiente durante la trombosis (Takano K, 1992; Szczeklik A, 1992, Gulba DC, 1990) o la coagulación intravascular diseminada (Boisclair MD, 1990). Todos estos datos indican que en procesos trombóticos hay una modificación de estos parámetros. Lassila (Lassila R, 1993a) observa que en la arteriosclerosis estable hay una asociación entre severidad de la lesión y las concentraciones plasmáticas de fibrinógeno y de este con las de DD. Esta relación podría depender de los efectos estimulantes sobre el hígado de los productos de degradación del fibrinógeno (Cook NS, 1990). Los niveles elevados de DD circulante pueden ser originados en la superficie de la placa arteriosclerótica o por la pared arterial. Smith (Smith EB, 1990) ha descrito que en el interior de la íntima arteriosclerótica hay una continua formación de fibrina y una fibrinólisis continua, que generaría fragmentos con propiedades aterogénicas.

Bini (Bini A, 1989) y Lassila (Lassila R, 1993a) observan productos de degradación del fibrinógeno solo en placas fibrosas y placas avanzadas junto con fibrinógeno y fibrina (I y II).

## SISTEMA HEMOSTÁTICO Y ARTERIOSCLEROSIS



**Figura 12.-** Posible participación de los sistemas de coagulación y de la plasmina en la arteriosclerosis (Tanaka K, 1993).

## METALOPROTEASAS

### Introducción

La remodelación de la matriz extracelular tiene lugar durante todas las fases de la arteriosclerosis humana.

En el desarrollo de la lesión arteriosclerótica, que puede durar décadas, están implicados la infiltración de células inflamatorias, la migración de células musculares lisas, el grosor de la íntima, un acumulo de componentes de la matriz extracelular, la formación de una cubierta fibrosa y la angiogénesis (Ross R, 1993b).

La inestabilidad de la placa se pone de manifiesto por la ulceración de la cubierta fibrosa, la rotura de la placa o una hemorragia intraplaca y es la responsable de los síntomas clínicos de una angina inestable, un infarto de miocardio y accidente cerebrovascular (Davies MJ, 1985).

La evolución de la placa requiere una modificación de la matriz extracelular, este es un proceso regulado por la síntesis y la degradación de los componentes que la constituyen. Diversos estudios “in vitro” descubrieron que las células vasculares producían enzimas de la familia de las MMPs, estudios posteriores han puesto de manifiesto que estos enzimas juegan un papel crucial en la remodelación vascular durante el desarrollo, el crecimiento y en los procesos patológicos (Matrisian LM, 1992; Galis ZS, 1994a).

Las metaloproteasas pueden degradar la mayoría de componentes de la matriz extracelular además de tener un papel importante en la activación y procesamiento de citocinas o factores de crecimiento (Suzuki M, 1997), en la exposición de receptores de membrana (Preece G, 1996), en la liberación del ligando Fas (Kayagaki N, 1996) o en la inactivación del TNF- $\alpha$  (Black RA, 1997).

La degradación de la matriz extracelular es por lo tanto un proceso necesario para permitir la migración celular y la remodelación de los tejidos. Todo ello juega un papel crucial en muchos procesos tanto fisiológicos como patológicos

La acción de las MMPs está regulada a tres niveles: *inducción de la expresión, activación de las formas latentes y regulación por los TIMPs (inhibidores endógenos)*.

El sistema de las MMPs está formado por más de 20 metalo endopeptidasas zinc<sup>2+</sup>-calcio dependientes que poseen una actividad catalítica sobre componentes de la matriz extracelular (Nelson AR, 2000). En conjunto tienen la capacidad de degradar todos los componentes de la pared arterial y además juegan un papel importante en los sucesos fisiológicos y patológicos que dan lugar a la degradación de la matriz extracelular.

Con excepción de la MMP-11, todas las demás MMPs solubles son secretadas como zimógenos.

En tejidos no lesionados se detecta una actividad muy baja de MMPs. Su expresión está regulada transcripcionalmente por citoquinas inflamatorias, transformación celular, hormonas y factores de crecimiento.

### **Estructura**

La familia de enzimas MMPs también llamadas matrixinas, comparten una estructura similar en sus dominios.

Todos los enzimas de esta familia poseen en común los siguientes:

- 1- ***Péptido señal:*** es la secuencia “leader”, responsable de la secreción de la molécula, no está presente en la forma inactiva del enzima.
- 2- ***Dominio proteolítico o catalítico:*** contiene 2 iones de zinc y al menos un ion de calcio. Uno de los iones de zinc está presente en el centro activo e implicado en el proceso catalítico de las MMPs. El segundo ion de zinc, también denominado zinc estructural, y el ion de calcio están presentes en el dominio catalítico a unos 12 Å del zinc catalítico. El ion de zinc catalítico es esencial para la actividad proteolítica de las MMPs, los tres residuos de histidina y el zinc catalítico están conservados en todas las MMPs. Menos conocido es el papel del segundo ion de zinc y el del ion de calcio.
- 3- ***Dominio propéptido:*** este dominio consiste en 80-90 aminoácidos que contienen un residuo de cisteína el cual interactúa con el átomo de zinc del dominio catalítico a través de un grupo tiol. En este dominio hay una secuencia altamente conservada (.. PRCGXPD..). La proteólisis de este propéptido da como resultado la activación del zimógeno. La activación puede darse por la acción de enzimas proteolíticos, agentes mercuriales o el calor (Okada Y, 1989; Nagase H, 1990; Koklitis PA, 1991).
- 4- ***Dominio hemopexina/vitronectina:*** está altamente conservado y muestra una secuencia similar a la proteína plasmática hemopexina. Se ha demostrado que este dominio juega un papel funcional en la unión al sustrato y/o en las interacciones con los TIMPs.

Además de estos dominios básicos la familia de las MMPs, se despliega en diferentes subgrupos por la incorporación y/o delección de dominios estructurales y funcionales (ver figuras 13 y 14):

---

Las MMP-2 y MMP-9 contienen uno o dos dominios adicionales con secuencias similares a las de la fibronectina para la unión del colágeno y de la “ $\alpha 2$  collagen like” (Wilhelm SM, 1989).

El miembro más simple de la familia es la MMP-7, con un peso molecular de 28 kD, contiene solo el dominio propeptídico y el dominio catalítico.

Los otros miembros de la familia mantienen la unidad básica y además tienen un número de dominios estructurales añadidos.

Aunque la mayoría de MMPs son secretadas como proteínas solubles una familia descrita recientemente como MMPs de tipo membrana ( “membrane-type MMPs”, MT-MMPs) está anclada a la membrana celular por un dominio transmembrana y uno intracitoplasmático (Massova I, 1998).

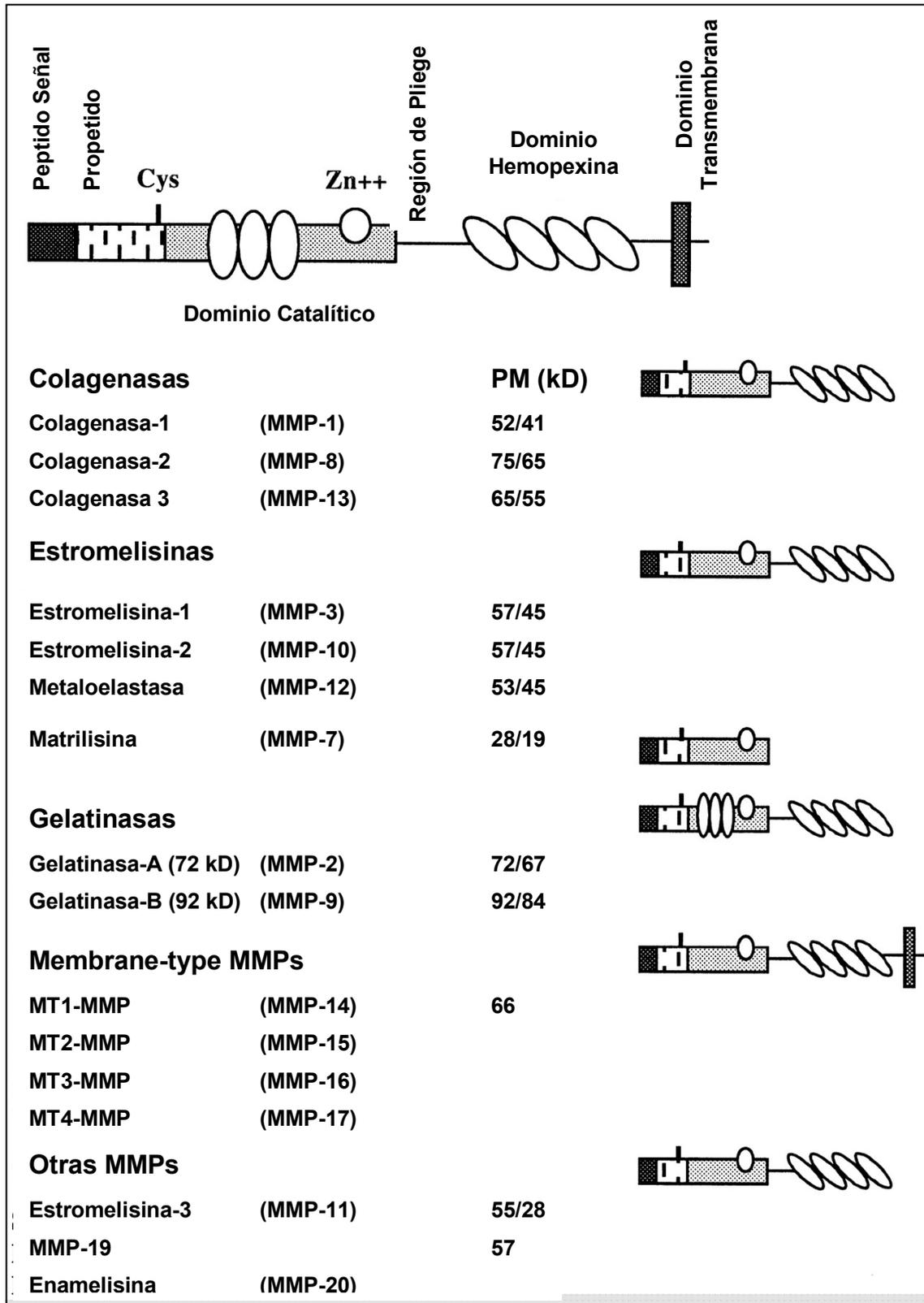
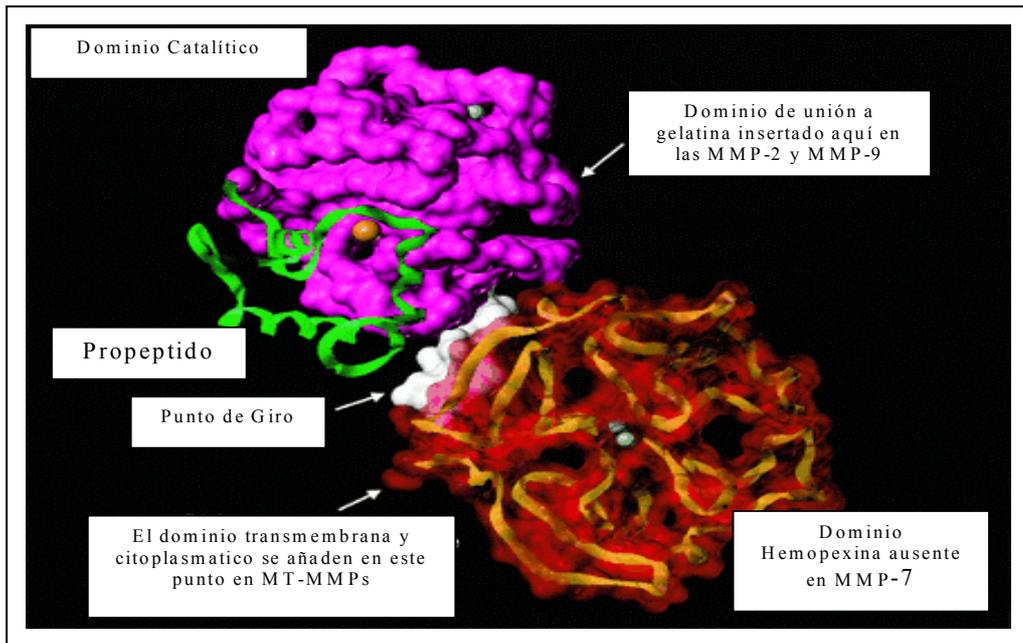


Figura 13.- Estructura de las MMPs (Westermarck J, 1999).



**Figura 14.-** Estructura tridimensional de las MMPs (Massova I, 1998)

### Substratos y nomenclatura

Dependiendo de la especificidad del sustrato, la similitud de aminoácidos y los módulos de secuenciación identificables, la familia de las MMPs se puede clasificar en cuatro subclases (Murphy G, 1990) (ver tabla 4):

- 1-Colagenasas
- 2-Estromelisininas
- 3-Gelatinasas
- 4-Metaloproteasas de tipo membrana MT- MMPs.

### **Colagenasas:**

Fueron las primeras MMPs que se describieron (Gross J, 1974). Forman parte de esta familia: MMP-1 (colagenasa 1), MMP-8 (colagenasa 2) y MMP-13 (colagenasa 3). Son las principales proteinasas secretadas capaces de degradar colágeno nativo de los tipos I, II, III, y V, y parecen jugar un papel crucial en la degradación de colágeno de la matriz extracelular (MEC) en varias situaciones fisiológicas y patológicas (Kähäri VM, 1997; Shapiro SD, 1998).

**MMP-1:** La expresión de MMP-1 “in vivo” se ha observado en áreas con una remodelación rápida de la MEC tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

La MMP-1 la producen varios tipos celulares como fibroblastos, queratinocitos, condriocitos, monocitos y macrófagos, células musculares lisas, células endoteliales, polimorfonucleares, hepatocitos y células tumorales. Tienen como substrato: colágeno I, II, III, VII, VIII, X, gelatina, agregán, serpinas, tenascina y  $\alpha$ 2-macroglobulina (Woessner JF, 1998). En la arteriosclerosis de carótida en humanos (Nikkari ST, 1995) se ha demostrado la existencia de mRNA y proteína de MMP-1, mientras que no se ha encontrado en carótidas normales. La expresión de esta MMP se localiza preferentemente en los bordes del centro lipídico adyacente a la cápsula fibrosa y en la parte dorsal de está. Su contenido se correlaciona positivamente con la incidencia de hemorragias en el interior de la placa. Puede ser activada por plasmina, calicreína y MMP-3.

**MMP-8:** La sintetizan los leucocitos polimorfonucleares que la liberan de los gránulos secretores bajo diversos estímulos, condriocitos, fibroblastos sinoviales y células endoteliales (Hanemaaijer R, 1997; Kainulainen T, 1997). Degrada los colágenos tipo I, II, III, VII, VIII y X; también puede actuar sobre agregán, elastina, fibronectina, gelatina,  $\alpha$ 2-antiplasmina y  $\alpha$ 1-antitrombina ( $\alpha$ 1-AT). Puede ser activada por plasmina y MMP-3 y 10.

**MMP-13:** Fue clonada originalmente de tejido de carcinomas de mama, comparada con otras colagenasa su especificidad del sustrato es excepcionalmente amplia incluyendo fibras de colágeno de los tipos I, II, III y XI, membrana basal y colágeno de cartílago de los tipos IV y X, colágeno tipo IX, gelatina, laminina, tenascina, agregán, fibronectina y PAI-2 (Knäuper V, 1997). La expresión de esta MMP está limitada sin embargo a situaciones en las que se requiere una remodelación rápida y efectiva del colágeno de la MEC, por ejemplo en el desarrollo de medula fetal y en la remodelación post natal de esta (Johansson N, 1997). También se expresa en lugares con una excesiva degradación del colágeno de la MEC como en el cartílago osteoartrítico, en úlceras crónicas cutáneas, úlceras intestinales, en liquido sinovial en reumatoides y en periodontitis (Uitto VJ, 1998) así como en tumores malignos como los carcinomas de mama (Uría JA, 1997). Puede ser activada por plasmina, MMP-2, 3 y 14.

***Estromelisinias:***

Dentro de este grupo de MMP encontramos la MMP-3 (estromelisina 1), la MMP-10 (estromelisina 2) y la MMP-11 (estromelisina 3).

Tanto la MMP-3 como la MMP-10 son expresadas por fibroblastos y por células escamosas de la piel normales y transformadas (Saarialho-Kere UK, 1998). Pueden ser activadas por plasmina, calicreína, triptasa, elastasa y catepsina G.

***MMP-10:*** Degrada agregán, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, MMP-1 y MMP-8.

***MMP-3:*** Se expresa en células endoteliales, condriocitos, células tumorales, queratinocitos, macrófagos, fibroblastos y células musculares lisas. Degrada colágeno tipo II, III, IV, IX, X y XI y además agregán, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, MMP-7, MMP-2 y MMP-9.

***MMP-11:*** Se clono inicialmente a partir de tejido de carcinoma de mama, se libera en forma tanto activa como inactiva. Su substrato son serpinas, degrada  $\alpha$ -1-antitripsina, gelatina, fibronectina y proteoglicanos (Holtz B, 1999). Se ha visto que está implicada en la progresión de tumores malignos y su expresión se ha detectado también en lesiones arterioscleróticas humanas. En su regulación parece estar implicado CD40-CD40L (Schonbeck U, 1999). Puede ser activada por convertasas parecidas a la furina.

***Gelatinasas:***

A este grupo pertenecen la MMP-2 (gelatinasa A) y la MMP-9 (gelatinasa B).

***MMP-2:*** Se expresa en células endoteliales, condriocitos, polimorfonucleares, células tumorales, monocitos y macrófagos, fibroblastos, mastocitos y células musculares lisas (Okada Y, 1993; Heppner KJ, 1996). Los substratos de la MMP-2 son colágeno de los tipos I, II, III, IV, V, VII, X, XI y XIV, gelatina, elastina, fibronectina, laminina-1, laminina-5, galectina-3, agregán, decorín, hialuridasa-versicán, proteínas unidas a proteoglicanos, osteonectina, GST-TNF/TNF péptido, IL-1 $\beta$ ,  $\alpha$ 1-AT, MMP-1, MMP-9 y MMP-13 (Murphy G, 1997). Puede ser activada por MMP-1, 7, 14, 15, 16, 24, 25 y trombina.

***MMP-9:*** Se produce en queratinocitos, monocitos, macrófagos alveolares, leucocitos polimorfonucleares, células musculares lisas, macrófagos, fibroblastos y una gran variedad de células tumorales (Murphy G, 1999).

La MMP-9 actúa sobre colágeno tipo IV, V, VII, X y XIV, gelatina, elastina, gectina-3, agregán, hialuronidasa-versicán, proteoglicanos unidos a proteínas, fibronectina,

entactina, osteonectina,  $\alpha$ 1-AT, MBP, IL-1 $\beta$  y plasminógeno. Puede ser activada por plasmina, elastasa, MMP-2, 3 y 13.

***Metaloproteasas de membrana (Membrane Type Metalloproteinases (MT-MMPS)):***

El primer miembro de esta familia fue clonado a partir de células de cáncer de pulmón (Sato H, 1994). Los miembros descritos son: MMP-14 (MT1-MMP), MMP-15 (MT2-MMP), MMP-16 (MT3-MMP), MMP-17 (MT4-MMP), MMP-24 (MT5-MMP) y MMP-25 (MT6-MMP).

***MMP-14, MMP-15, MMP-16:*** La forma activa de la MMP-14 actúa como receptor de membrana para el complejo formado por la forma latente de la MMP-2 y TIMP-2. MMP-14 y MMP-15 pueden activar a la pro-MMP-2 en la superficie celular (Murphy G, 1997), además ambas pueden degradar colágeno de tipo I, II y III, gelatina, fibronectina, laminina, vitronectina y agregán. La MMP-14 in vivo se expresa en fibroblastos del estroma adyacentes al tumor y en células epiteliales malignas (Gilles C, 1997). Se ha demostrado la expresión de la MMP-14 por células musculares lisas y macrófagos en placas arterioscleróticas, además de estar “up” regulada su expresión por moléculas inflamatorias en ambos tipos celulares (Rajavashisth TB, 1999).

El papel funcional de MT-1, 2, 3 Y 5 es común y parece ser la activación de la pro-MMP-2 (Yamanaka H, 2000). Puede ser activada por convertasas.

***MMP-17:*** Ha sido clonada de una librería de cDNA procedentes de células de carcinoma de mama (Puente XS, 1996) además de encontrarse en estas células se ha visto que se expresa en pulmón, colon, ovario y tejido testicular así como en leucocitos (Grant GM, 1999). Su sustrato parece ser gelatina (Wang Y, 1999). Es capaz de activar a la pro-MMP-2 a su forma intermedia de 68 kDa. Se inhibe con TIMP-1 y TIMP-2 (Llano E, 1999).

Es la única proteinasa que se ancla a la membrana por una cola de glicosil fosfatidil inositol por tanto la parte hidrofóbica se ancla en el lumen del retículo endoplasmático al igual que el receptor de la uroquinasa (uPAR) (Itoh Y, 1999). Puede ser activada por convertasas.

***MMP-24:*** Activa la pro-MMP-2. En contraste con las demás MT-MMP puede solubilizarse o presentarse unida a la pared celular, dándole versatilidad y jugando un papel importante en la remodelación a nivel cerebral y durante el desarrollo embrionario (Pei D, 1999a). Puede ser activada por convertasas.

**MMP-25:** La MT6-MMP se ha identificado específicamente en leucocitos de sangre periférica. También llamada leucolisina. Su papel parece estar en la respuesta inflamatoria y su activación parece ser intracelular (Pei D, 1999b). Puede ser activada por convertasas (Murphy G, 2000).

Hay un grupo de MMPs que no pueden incluirse en la clasificación anterior y que en el cuadro que se representa en la tabla 4, se incluyen dentro de otras. En este grupo se incluyen las siguientes MMPs: MMP-7 (matrilisina), MMP-12 (metaloelastasa de macrófagos), MMP-19 (RASI-1), MMP-20 (enamelisina), MMP-23 y MMP-26 (endometasa humana). Destacamos las más conocidas:

**MMP-7:** Esta MMP tiene como sustratos al colágeno tipo IV, X, agregán, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, MMP-1, MMP-2, MMP-9, caseína,  $\alpha$ 1-AT, plasminógeno y MMP-9/TIM-1. Juega un papel importante en la invasión de los carcinomas y la metástasis (Yamashita K, 2000) y parece además estar implicada en apoptosis de células epiteliales (Powell WC, 1999). Esta MMP tiene una gran afinidad por los proteoglicanos heparan sulfato que están alrededor de las células epiteliales y en la membrana basal. La unión de esta metaloproteinasa, además de otras, a estos heparan sulfatos del espacio extracelular puede prevenir la pérdida de enzimas y servir como reservorio y facilitar la regulación de sus niveles (Yu WH, 2000). Puede ser activada por plasmina y MMP-3.

**MMP-12:** Se ha demostrado la presencia de mRNA de esta metaloproteasa en la media de aneurismas y en enfermedad aortica oclusiva, mientras que su presencia en aortas normales solo se observa con una baja incidencia (Curci JA, 1998). Por otra parte se ha observado un incremento de la expresión de MMP-12 en lesiones arteriales a nivel de aorta en conejo, concomitante con la generación de células espumosas (Matsumoto S, 1998). Degrada elastina, fibronectina, gelatina, laminina y colágeno tipo IV. Puede activarse con plasmina.

Tabla 4.- Clasificación de las MMPs.

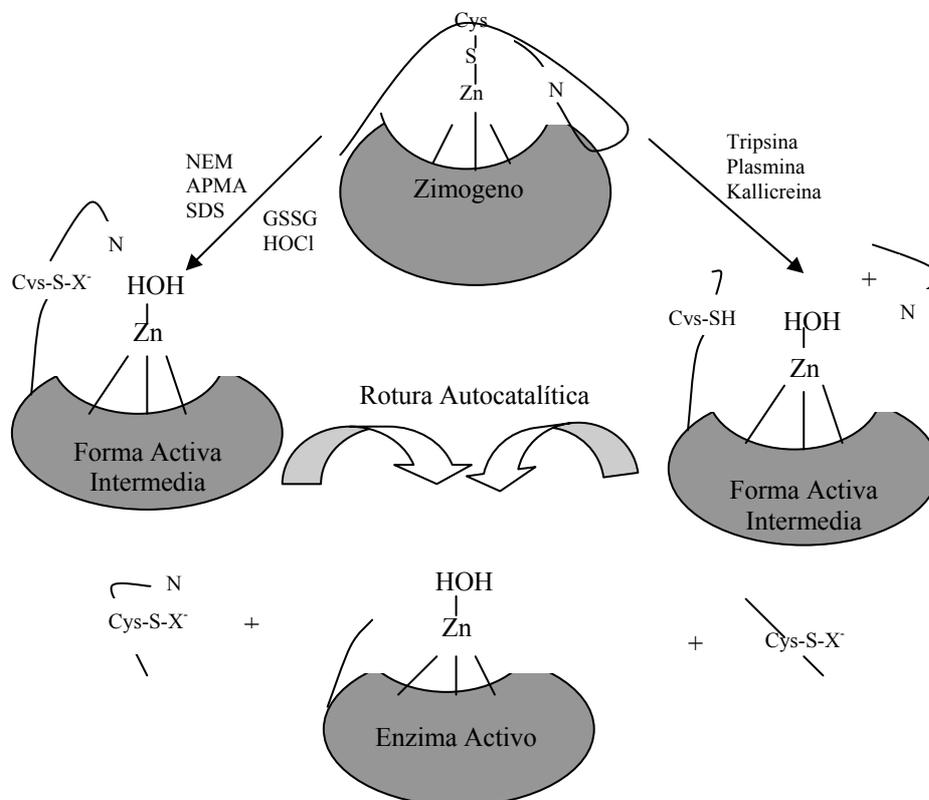
Subgrupo	Nombre Alternativo	Nº de MMP	Peso Molecular		Colágeno y Otros Sustratos	Cromosoma
			Latente	Activa		
<b>Colagenasas</b>	-Colagenasa Intersticial.	1	55	45	-I, II, III, VII, VIII, X. Agrecán, gelatina, proteoglicanos unidos a proteínas, $\alpha$ 2-macroglobulina ( $\alpha$ 2-M), MMP-2, MMP9.	11q22-q23
	-Colagenasa de neutro filos	8	75	58	-I, II, III, V, VII, VIII, X. Agrecán, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, $\alpha$ 2-antiplasmina, $\alpha$ 1-AT.	11q21-q22
	-Colagenasa 3	13	60	48	-I, II, III, IV, IX, X, XIV. Agrecán, gelatina, PAI-2, perlecán, fibronectina, MMP-9.	11q22.3
<b>Gelatinasas</b>	-Gelatinasa A	2	72	66	-I, II, III, IV, V, VII, X, XI, XIV. Gelatina, agrecán, elastina, fibronectina, laminina, decorín, proteoglicanos unidos a proteína, laminina, osteonectina, decorín hialurodasaversicán, $\alpha$ 1-AT, MMP-1, 9 y 13.	16q13
	-Gelatinasa B	9	92	86	-IV, V, VII, X, XIV. Gelatina, agrecán elastina, fibronectina, proteoglicanos unidos a proteína, osteonectina, $\alpha$ 1-AT, plasminógeno.	20q11.2-q13.1
<b>Estromelisinina</b>	-Estromelisinina 1	3	57	45	-II, III, IV, V, IX, X, XI. Agrecán, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, antirombina, MMP-7, 8, 9 y 13.	11q23
	-Estromelisinina 2	10	57	44	-III, IV, V. Agrecán, elastina, fibronectina, gelatina, caseína, laminina, MMP-1, MMP-8.	11q22.3-q23
	-Estromelisinina 3	11	51	44	- $\alpha$ 1-AT, $\alpha$ 2-M, caseína, agrecán, fibronectina, laminina.	22q11.2
<b>MMPs de tipo membrana</b>	-MT1-MMP	14	66	56	-I, II, III, IV. Agrecán, elastina, fibronectina, gelatina, laminina, vitronectina, $\alpha$ 1-AT, $\alpha$ 2-M, MMP-2, 13.	14q11-q12
	-MT2-MMP	15	72	60	-I, III, IV. Fibronectina, gelatina, laminina, agrecán, perlecán, tenascina, MMP-2.	16q12.2-q21
	-MT3-MMP	16	64	52	-I, III, IV. Gelatina, caseína, fibronectina, MMP-2.	8q21
	-MT4-MMP	17	57	53	-IV. Gelatina.	12q24
	-MT5-MMP	24	63	28	-Proteoglicanos.	20q11.2
	-MT6-MMP, Leucolisina	25	34	28	-Gelatina, MMP-2	12q14
<b>Otras</b>	-Matrilisinina	7	28	19	-IV, X. Agrecán, elastina, fibronectina, IV, gelatina, laminina, decorín, $\alpha$ 1-AT MMP-1, 2, 9; MMP-9/TIMP-1.	11q21-q22
	-Metaloelastasa de macrófagos	12	54	45	-Gelatina, laminina, fibronectina, elastina, caseína, fibrina(ogeno), plasminógeno.	11q22.2-q22.3
	-RASI-1	19	54	45	-Gelatina	12q14
	-Enamelisinina	20	54	22	-Amelogenina	11q22
	-Endometasa humana	23	ND	ND	-ND	1p36
		26	28	19	-Gelatina tipo I.	ND

ND: No determinado

Las MMPs 4, 5, 6 y 21 no se incluyen por no haberse determinado el gen específico, ni la 18 y la 22 por no haberse caracterizado en humanos.

### Activación

Las MMPs solubles son secretadas al espacio pericelular como enzimas inactivos y su activación representa un importante nivel de regulación. En las formas zimógenas secretadas el pro-dominio (N-terminal) se pliega de forma que la cisteína interactúa con el zinc catalítico y actúa como escudo del centro catalítico. Esta conformación se mantiene gracias a las interacciones tiol entre los residuos de cisteína del prodominio y el átomo de zinc presente en el centro catalítico de todas las MMPs. La activación de los proenzimas se produce de forma secuencial como se muestra en la figura 15:

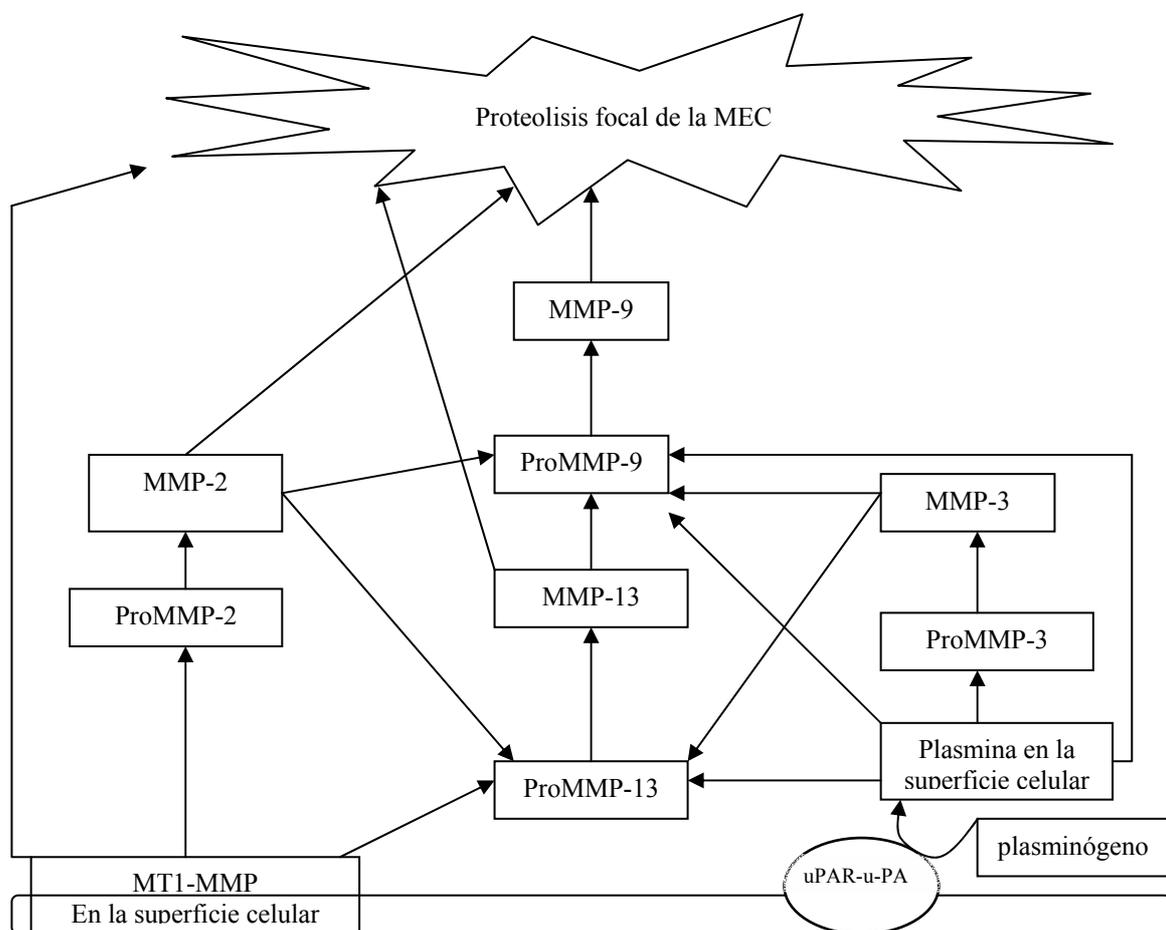


**Figura 15.-** Mecanismo proteolítico de activación de las MMPs (Nagase H, 1997).

Una activación parcial puede ocurrir cuando el prodominio es atrapado por otras proteasas como la plasmina, tripsina, callicreina, triptasa, quimasa y algunas MMPs (Nagase H, 1997), o cuando la unión entre la cisteína y el zinc es interrumpida por componentes no proteolíticos como agentes reactivos del tiol y desnaturizantes o por tratamiento con calor (van Wart HE, 1990). Esta activación parcial induce cambios

conformacionales que inducen la susceptibilidad del enzima para la rotura autocatalítica (Murphy G, 2000).

También se han visto nuevos mecanismos de activación (ver figura 16): MT1-MMP (Sato H, 1994) tiene la capacidad de activar la pro gelatinasa A en la superficie celular. MT3 también puede activar la pro MMP-2 (Takino T, 1995). Por otra parte el descubrimiento de asociaciones progelatinasa-TIMP-MT-MMP añade complejidad al proceso de activación, a bajas concentraciones de TIMP en el complejo parece potenciarse la activación de la pro-MMP2 y a concentraciones altas podría inhibirse la actividad de MMP-2 (Strongin AY, 1995).



**Figura 16.-** Cascada de activación de las metaloproteasas modificado de Murphy (Murphy G, 2000).

## **Inhibición**

La actividad de las MMP se regula por su unión a TIMPs. Se han caracterizado 4 miembros de la familia llamados: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 y TIMP-4. Su estructura consta de dos dominios de pequeño tamaño. El dominio N-terminal consta de 125 aminoácidos y el C-terminal de 65 aminoácidos (Brew K, 2000). Cada uno de ellos se estabiliza por tres puentes disulfuro. El dominio N-terminal es capaz una vez aislado, de formar una molécula estable con capacidad para inhibir las MMPs (Huang W, 1996).

La expresión de los TIMPs en los tejidos también se controla durante la remodelación y en condiciones fisiológicas para mantener el balance en el metabolismo de la matriz extracelular. La rotura de este equilibrio induce un descontrol en el “turn over” de la matriz (artritis, cáncer, enfermedad cardiovascular, nefritis, desordenes neurológicos, ulceración y fibrosis de tejidos) (Woessner JF, 1998).

El TIMP-1 y el TIMP-2 son capaces de inhibir la actividad de todas las MMPs conocidas en una unión estequiométrica de 1:1 y por tanto juegan un papel importante en mantener el balance entre la deposición y la degradación de la matriz extracelular.

El TIMP-3 es el único miembro de la familia que se secreta de forma insoluble y se localiza exclusivamente en la matriz extracelular (Pavloff N, 1992).

El TIMP-4 parece actuar en el mantenimiento de la homeostasis de la matriz extracelular (Greene J, 1996).

Los TIMPs-2 y 3 son inhibidores efectivos de las MT-MMPs.

Otro inhibidor de las MMPs es la  $\alpha$ 2-macroglobulina, su acción es lenta y no es específica, es un inhibidor irreversible de proteasas activas incluyendo las MMPs. Se cree que el control que ejercen los TIMPs sobre la actividad de las MMPs es alrededor de las células, mientras que la de la  $\alpha$ 2-macroglobulina tendría una función en los fluidos especialmente en los lugares con inflamación (Nagase H, 1994).

## Regulación de la producción de MMPs

*Tabla 4.- Regulación de la producción de MMPs.*

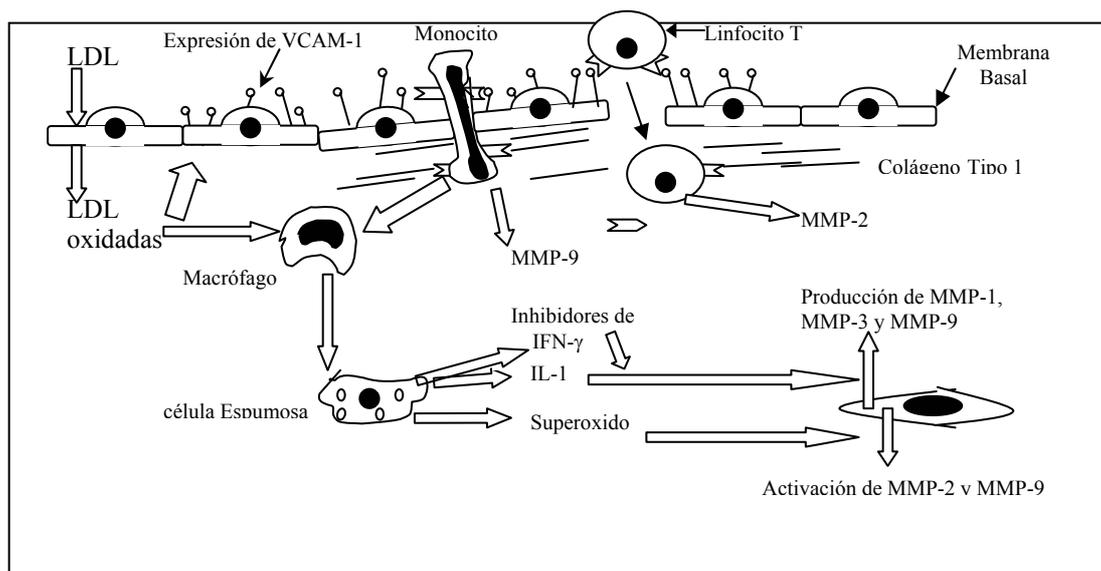
<i>Factores activadores de la producción:</i>	
<p><i>Factores que actúan en la superficie de la célula:</i>            Ionoforo del calcio A23187            Fusión celular            Tipos de colágeno en el sustrato            Concavalina A            Cristales de: urato                              Hidroxiapatita                              Fosfato cálcico            Hierro            Fagocitosis            Polihidroxietilmetacrilato</p> <p><i>Agentes químicos:</i>            AMP            Colchicina            Citochalasina B, D            Lipopolisacaridos            Mitomicina C            Diesteres de Forbol            Prostaglandina E</p>	<p><i>Agentes físicos que actúan en la célula:</i>            Shok térmico            Radiación UV</p> <p><i>Citocinas/Factores de crecimiento:</i>            Factor de crecimiento de la epidermis            Factor de crecimiento de fibroblastos b            Interferón <math>\alpha, \beta, \gamma</math>            Interleucina <math>1\alpha, \beta</math>            Factor de crecimiento derivado de plaquetas            Factor de necrosis tumoral <math>\alpha</math></p> <p><i>Otros:</i>            Transformación vírica, oncogenes            Agentes autocrinos            Envejecimiento de los fibroblastos</p>
<i>Factores represores de la producción:</i>	
<p>Ácido retinoico            Glucocorticoides            Adenovirus-5            Estrógenos            Progesterona</p>	

Las MMPs no se pueden almacenar en muchos tipos celulares (los neutrófilos y macrófagos son excepciones) y tampoco sintetizarse y secretarse sin que haya una señal clara de que son necesarias. En la tabla se presentan los factores que pueden afectar la producción de colagenasas y/o estromelinas. Muchos de estos factores están implicados en procesos patológicos que van acompañados por la rotura de la matriz.

### Papel de las MMPs en la arteriosclerosis

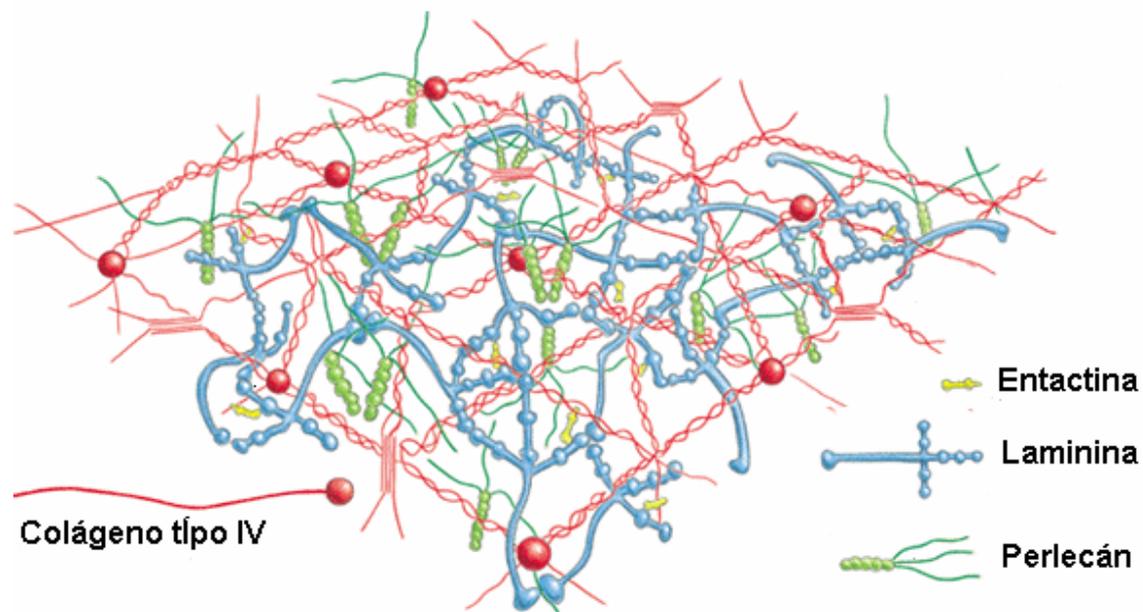
Las células endoteliales activadas expresan moléculas de adhesión como VCAM-1 que promueven la infiltración de monocitos circulantes y de linfocitos T (O'Brien KD,

1993). La adhesión de linfocitos T a las células endoteliales a través del receptor VCAM-1 induce la producción de MMP-2. Esta metaloproteasa facilita la degradación de la matriz extracelular. Degradación que es necesaria para la migración a través de la capa endotelial y la membrana basal de los linfocitos T y de los monocitos aunque en este último caso no está demostrado (Madri JA, 1996). Durante la migración de los monocitos su interacción con los componentes de la matriz extracelular especialmente con el colágeno tipo I, predominante en la pared arterial normal (Stary HC, 1995), también estimula la degradación de esta matriz. El contacto con colágeno tipo I (Wesley RB, 1998) y la laminina incrementa la expresión de MMP-9 por estas células. La interacción de los monocitos con el colágeno tipo I también induce la proteólisis favoreciendo la producción de superóxido (Gudewicz PW, 1994) y la secreción de IL-1 que puede activar a la pro-MMP-2 y 9 producidas por las células musculares (Fabunmi RP, 1996) e incrementar la producción de MMP-9, 1 y 3 por células musculares lisas. Aunque no se conoce claramente como la composición de la matriz induce la producción de MMP sí se sabe que es necesaria la presencia de MMPs para que se produzca la infiltración de monocitos y linfocitos T a través de la matriz durante el desarrollo de la placa arteriosclerótica (ver figura 17). Los macrófagos y las plaquetas en la superficie liberan múltiples factores entre los que se encuentran IL-1, factor de necrosis tumoral y factor de crecimiento derivado de plaquetas y pueden inducir la migración de células musculares lisas de la media a la íntima que proliferarán y producirán matriz extracelular.



**Figura 17.-** Implicación de las MMPs en la infiltración de monocitos y linfocitos T en la pared arterial. (George S, 1998).

La capa muscular media está separada de la íntima por una membrana basal compuesta principalmente por colágeno tipo IV, laminina y otras proteínas sintetizadas por las células musculares lisas, ver figura 18. Esta membrana actúa como barrera, influyendo en el metabolismo y en el fenotipo, y por lo tanto afectando a la migración y proliferación de las células musculares lisas que producirán el engrosamiento de la íntima (Campbell GR, 1990).



**Figura 18.-** Estructura de la lámina basal, modificada de Alberts (Alberts B, 1994).

El papel de las MMPs en la migración desde la media a la íntima de las células musculares lisas y su proliferación es importante ya que estas degradan la matriz extracelular que rodea a las células y la membrana basal que separa la media de la íntima. La interrelación de estos dos procesos se ha estudiado tanto “in vitro” como “in vivo”.

En estudios “in vitro” llevados a cabo con cultivos de células musculares lisas estimuladas con IL-1 o TNF- $\alpha$  (Pauly RR, 1994), se observa que hay un incremento de la secreción y de la actividad de la MMP-1, 3 y 9. La MMP-3 además de otras acciones activa a la procólagenasa y a la progelatinasa B. La MMP-1 actúa rompiendo las fibras de colágeno I de la media. Estas fibrillas pueden luego ser degradadas por la MMP-2 y/o la MMP-9.

La MMP-2, el TIMP-1 y el TIMP-2 también pueden ser producidos por estas células musculares lisas, tanto antes como después de ser estimuladas y su concentración no se ve alterada por el estímulo. La gelatinasa-A degrada el colágeno de la membrana basal. Estos estudios “in vitro” demostraron que la invasión de las células musculares lisas a

través de la membrana basal depende de la producción de gelatinasa A y puede ser inhibida por los inhibidores de la gelatinasa A. En otros estudios se observó, que aunque la concentración de gelatinasa A no se incrementa después del estímulo con IL-1 o TNF- $\alpha$ , aparece una forma con un peso molecular menor y más activa después del estímulo (Galis ZS, 1994).

Así el ratio de actividad de las MMPs con respecto a los inhibidores se incrementa después de un estímulo, favoreciendo la rotura necesaria del tejido conectivo y la membrana basal para que se produzca la migración de células musculares lisas desde la media a la íntima.

Estudios “in vivo” también ponen de manifiesto la conexión entre el sistema MMPs y el proceso arteriosclerótico. Se han utilizado principalmente modelos en ratas a las que se les producía lesión en carótida con un balón (Aoyagi M, 1998). En algunos de estos trabajos, se estudia el papel que juegan el sistema plasminógeno/plasmina y el sistema de MMP en la formación de neointima, después de inducir una lesión vascular que degrada la MEC y permite la migración de células musculares lisas (Reidy MA, 1996). En estos modelos se pone de manifiesto un incremento de la actividad de MMP-9,2 y 3 durante el periodo de migración y proliferación de células musculares lisas (Webb KE, 1997).

El efecto de la lesión sobre los TIMPs es menos claro. Se aprecian incrementos de TIMP-2 por algunos autores (Hasenstab D, 1997) y otros sin embargo no aprecian cambios en TIMP-1, 2 o 3 (Webb KE, 1997).

La expresión de mRNA para MT1-MMP, tanto en modelos de rata como de conejo se ha visto que coincide con la activación de MMP-2 en neointima (Jenkins GM, 1998) sugiriendo el papel activador que ejerce MT1-MMP sobre MMP-2 en la fase de engrosamiento de la íntima. Concentraciones elevadas de trombina a nivel local, como las que se producen por la adhesión plaquetar y la activación de la cascada de la coagulación después de la lesión vascular, pueden provocar una activación de la proMMP-2 (Galis ZS, 1997).

En modelos en rata a la que se le induce una lesión en carótida con un balón, los incrementos de los niveles de PAI-1 y TIMP-2 sugieren cambios en el balance proteolítico que puede jugar un papel importante en la migración de las células musculares lisas, después del daño arterial (Hasenstab D, 1997). Esto vendría reforzado por la observación de que la migración de las células musculares lisas, en rata “in vivo”,

estaría inhibida por la administración de un inhibidor de la plasmina como es el ácido traxenámico (Forough R, 1996).

Para la migración de las células musculares lisas, en este modelo se necesita la presencia de: activadores del plasminógeno, MMP-2, MMP-9, bFGF y PDGF. La migración inducida por PDGF se ha demostrado que depende de la presencia de MMP-2, y la inducida por bFGF de MMP-2 y MMP-9 (Kenagy RD, 1997). Otros estudios con el mismo modelo en rata sugieren que la MMP-2 facilitaría la migración de células musculares lisas de la media a la íntima pero no la proliferación (Aoyagi M, 1998).

En ratones “knock out” se ha visto que la u-PA, a través de la activación del plasminógeno, podría tener un papel relevante en la cicatrización vascular después de inducir una lesión. La deficiencia de u-PA o plasminógeno dan como resultado una disminución de la migración de células musculares lisas sin afectar a la proliferación de las mismas (Carmeliet P, 1997c).

Por tanto la u-PA a través de la proteólisis de la plasmina parece jugar un papel central en la degradación proteolítica de la matriz extracelular, permitiendo la migración celular. Por otra parte, se ha observado que un polimorfismo en la región promotora del gen para estromelisina-1, está asociado con una progresión más rápida de la arteriosclerosis coronaria (de Maat MP, 1999).

Otros estudios realizados con aortas humanas con lesión arteriosclerótica ponen de manifiesto que la reacción inflamatoria del vaso, determinada por la expresión de Cox-2 (ciclooxigenasa-2), puede influenciar la remodelación de la matriz extracelular coactivando las MMPs y facilitando el desarrollo y la progresión de la arteriosclerosis (Hong BK, 2000).

### **MMP y angiogénesis**

La formación de neovasos también puede jugar un papel importante en el desarrollo de la placa arteriosclerótica, tanto por la provisión de componentes sanguíneos que favorecerán el crecimiento de la placa, como causando hemorragias repetidas a nivel de la íntima que podrán desencadenar una trombosis arterial (Zhang Y, 1993b).

Para que haya angiogénesis debe haber una degradación de la membrana basal vascular que permita la migración y proliferación de las células endoteliales, por lo que las MMPs son esenciales en este proceso.

Esta descrito que TIMP-1 y TIMP-2 así como Ab anti-MMP-2, y anti-MMP-9 inhiben la formación de tubulos por células endoteliales “in vitro” (Johnson MD, 1994) y que la

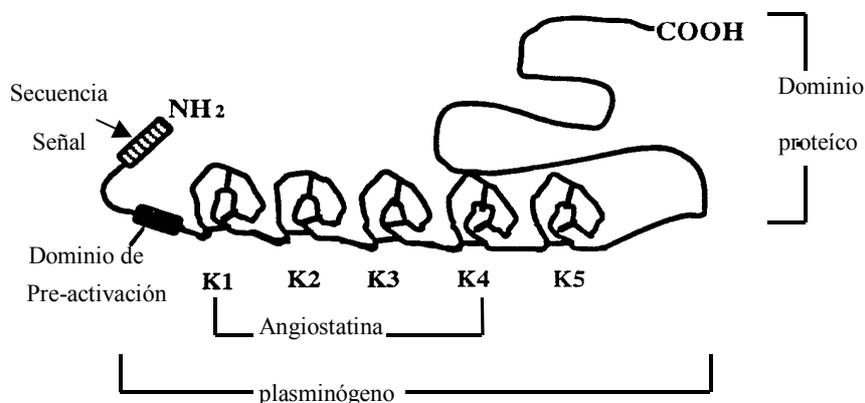
inhibición de MMP reduce “in vivo” la angiogénesis en cornea (Skotnicki JS, 1999). De los trabajos de Brooks (Brooks PC, 1996; Brooks PC, 1994) se desprende que la angiogénesis dependería de una cooperación entre la adhesión y los mecanismos proteolíticos, ya que la MMP-2 se une a la integrina  $\alpha v \beta 3$  en los neovasos. La localización de macrófagos que expresan MMPs (incluyendo MMP-9) en áreas con “vasa vasorum” en adventicia sugiere que además de la implicación de la MMP-9, derivada de macrófagos, en las alteraciones de la matriz que están asociadas con neovascularización en aterogénesis, los macrófagos pueden liberar citoquinas que estimularían la secreción de MMP por células endoteliales (Folkman J, 1995).

El papel de la trombina también es importante en la angiogénesis debido a la activación de la pro-MMP-2 en células endoteliales o libre en el espacio extracelular (Galis Z, 1997) así como incrementando la expresión de MMP-1 y MMP-3 (Duhamel-Clerin E, 1997).

### MMPs y plasminógeno

Las MMP-3, 7, 9, y 12 (Ugwu F, 2001; Patterson BC, 1997; Dong Z, 1997) pueden convertir el plasminógeno por hidrólisis de los cuatro kringles del extremo aminoterminal en angiostatina, un potente inhibidor de la angiogénesis (ver figura 19).

La angiostatina también puede producirse por una autodigestión de la plasmina. Estudios “in vitro” demuestran que la angiostatina induciría la apoptosis en células endoteliales pudiendo ser este el mecanismo de su efecto antiangiogénico (Lucas R, 1998). Es posible por lo tanto que todo ello este implicado en la regulación de la angiogénesis en las placas arterioscleróticas.



**Figura 19.-** Estructura molecular del plasminógeno y la angiostatina (Dong Z, 1997).

**MMPs y rotura de la placa**

Estudios histológicos han puesto de manifiesto que la composición de las placas arterioscleróticas van desde estructuras sólidas fibrosas, hasta otras con un centro substancialmente necrótico rico en lípidos recubierto por una capa fibrosa de células musculares lisas (Stary HC, 1995).

El balance entre la síntesis de la matriz extracelular y su degradación por MMPs podría determinar que la placa permaneciera estable o bien que se rompiera.

Las placas fibrosas son estables pero las ricas en lípidos tienen una tendencia a la rotura (Shah PK, 1996). La rotura o fisura de las placas ocurre principalmente en los márgenes de la cubierta fibrosa y en las regiones protuberantes produciendo una hemorragia dentro de la placa, trombosis y una rápida oclusión de la arteria (Nagase H, 1997). Las áreas protuberantes o extremas contienen numerosos macrófagos (van der Wal AC, 1994) que incrementan la liberación local de MMPs. Además estas zonas son lugares de un máximo estrés en la circunferencia (Cheng GC, 1993) que predisponen a la fisura o rotura (Richardson PD, 1989).

El mayor número de macrófagos en estas áreas, podría ser la causa de la degradación de la matriz extracelular, que promoverá la debilitación fisura o rotura de la placa (Lendon CL, 1991). En conejos con arteriosclerosis experimental se pone de manifiesto que una reducción de lípidos induce una reducción del número de macrófagos, una disminución en la expresión de MMP-1 e incrementa el contenido de colágeno intersticial en la placa reforzándola (Libby P, 1998).

Estudios inmunohistoquímicos también demuestran una elevada prevalencia de MMP-9 en lesiones de coronarias arterioscleróticas y demuestran la síntesis de esta MMP en forma activa por macrófagos y células musculares lisas y su fuerte asociación con síndromes de angina inestables (Brown DL, 1995).

Los macrófagos también influyen en la degradación de la matriz extracelular indirectamente secretando citoquinas y factores de crecimiento que pueden estimular a las células musculares lisas vecinas a producir MMPs. Estudios “in vitro” demuestran que las células musculares lisas en cultivo estimuladas con IL-1 o TNF- $\alpha$  inducen un incremento de la producción de MMP-2, MMP-3, MMP-1, en cambio células no expuestas a estos mediadores de la inflamación expresan constitutivamente pro-MMP-2 y TIMPs (Galis ZS, 1995).

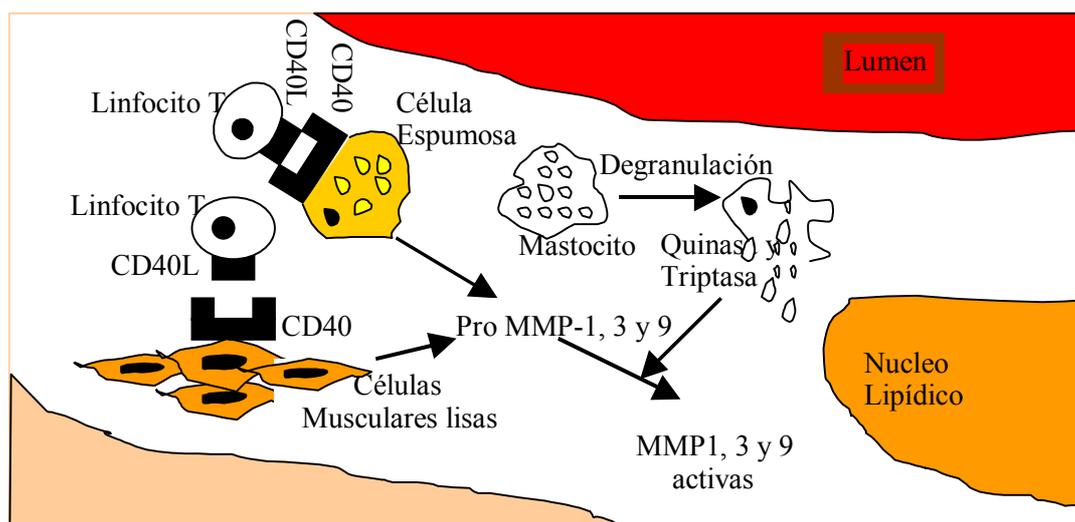
Estos trabajos “in vitro”, se han visto confirmados con los trabajos de Li (Li Z, 1996) que ponen de manifiesto que en estrías grasas y en placas arterioscleróticas hay un

incremento de cuatro veces los niveles de MMP-2 con respecto a arterias no lesionadas, en áreas ricas en macrófagos, particularmente en las regiones de los extremos de placas arterioscleróticas (Li Z, 1996).

Aunque la expresión de MMPs se localiza esencialmente en áreas ricas en macrófagos, también puede encontrarse en células musculares lisas (Brown DL, 1995; Pickering JG, 1997), monocitos (Amorino GP, 1998), linfocitos (Schonbeck U, 1997) y células endoteliales (Huang Y, 1999).

Los mecanismos de activación de las MMPs en las placas arterioscleróticas todavía no están bien conocidos aunque en estudios relativamente recientes (Huang Y, 1999) se ha visto que las LDL oxidadas estimulan la transcripción y secreción de MMP-1 por células endoteliales, así como otras moléculas proinflamatorias regulan la expresión de MT1-MMP (Rajavashisth TB, 1999). Es posible que los radicales libres y las LDL oxidadas que generan las células espumosas, estimulen la secreción de MMPs.

Estudios “in vitro” demuestran que la triptasa y la quinasa liberadas por mastocitos activan las MMPs (Johnson JL, 1998). Experiencias recientes, ponen de manifiesto que la cooperación entre las células inflamatorias y las células musculares lisas endógenas es un punto crucial en la activación y sobreexpresión de las MMPs a través de CD40-L (receptor de CD40), en las regiones extremas de la placa (Schonbeck U, 1999; Lee Y, 1999; Mach F, 1999b)(ver figura 20).



**Figura 20.-** Estimulación de la producción y activación de MMPs en las regiones limítrofes de la placa arteriosclerótica, modificado de George (George S, 1998).

**Interrelación de las MMPs y el sistema fibrinolítico**

Interacciones específicas entre el sistema fibrinolítico y el sistema MMP sugieren que ambos sistemas pueden cooperar en la degradación de la matriz extracelular (Carmeliet P, 1998).

La plasmina puede degradar directamente la fibrina y otros componentes de la membrana como la laminina, vitronectina, fibronectina y proteoglicanos, y puede activar varias pro-MMPs como la pro-MMP-1, la pro-MMP-3 y la pro-MMP-9. Estas MMPs degradan el colágeno, la elastina y otros proteoglicanos asociados a la matriz. Las MMPs activadas pueden activar a otra MMPs (Parsons SL, 1997).

De esta forma los sistemas plasminógeno/plasmina y MMPs podrían cooperar en la degradación de la matriz. El papel fisiológico de la activación que ejerce la plasmina sobre las MMPs todavía no está claro.

“In vitro” la plasmina a través de su activación por u-PA es capaz de activar directamente a la pro-MMP-1, pro-MMP-3, pro-MMP-9, pro-MMP-10 y pro-MMP-13 (Okada Y, 1992; Suzuki K, 1990; He CS, 1989).

Estudios “in vivo”, en ratones con arteriosclerosis inducida, indican que la u-PA a través de la plasmina contribuiría a la destrucción de la media y a la formación de aneurismas vía activación de las MMP-3, 9, 12 y 13 (Carmeliet P, 1997a).

Lijnen et al (Lijnen HR, 1998d) proponen un modelo en aorta de ratones transgénicos deficientes en t-PA, u-PA, PAI-1 o plasminógeno para elucidar el papel fisiológico del sistema plasminógeno-plasmina en la activación de las MMPs, indicando los resultados que obtienen, que la activación de pro-MMP-2 ocurre independientemente de la plasmina-plasminógeno. Por otra parte los resultados obtenidos en el estudio de la MMP-9 en ratones t-PA, u-PA y PAI-1<sup>-/-</sup> muestran que su activación requiere la presencia de estos activadores, sin embargo los resultados con ratones plasminógeno<sup>-/-</sup> indican que la activación de MMP-9 es dependiente de plasminógeno (plasmina) (Lijnen HR, 1998a). Sin embargo en cultivos celulares se observa que la plasmina puede activar la pro-MMP-9. Los resultados obtenidos en ratones deficientes en MMP-3 (activador de la MMP-9) indican que la MMP-9 también puede activarse mientras este presente el plasminógeno/plasmina (Lijnen HR, 1998c).

Lijnen (Lijnen HR, 1998a) observa que la activación “in vivo” de la pro-MMP-2 es independiente del plasminógeno-plasmina, mientras que la activación de pro-MMP-9 puede ser dependiente o independiente de la plasmina.

Sin embargo otros estudios sugieren que la activación de la pro-MMP-2 podría ser vía plasmina en presencia de células (Mazziere R, 1997). Baranova (Baramova EN, 1997) observa que la MT1-MMP convierte la pro-MMP-2 de 72 kDa en una especie intermedia de 64 kDa que tras ser activada por plasmina daría una molécula de 62 kDa. Por otra parte se ha visto que la pro-MMP-2 es hidrolizada por u-PA (Keski-Oja J, 1992).

La activación de pro-MMP-9 por la plasmina, también se halla en controversia (Okada Y, 1992; Murphy G, 1992; Moll UM, 1990), aunque su activación por esta vía ha sido propuesta durante la metástasis (Reich R, 1988).

De todo ello se deduce que la plasmina puede jugar un papel importante en la activación de las MMPs “in vivo” pero la relevancia fisiológica no está establecida de una forma clara.

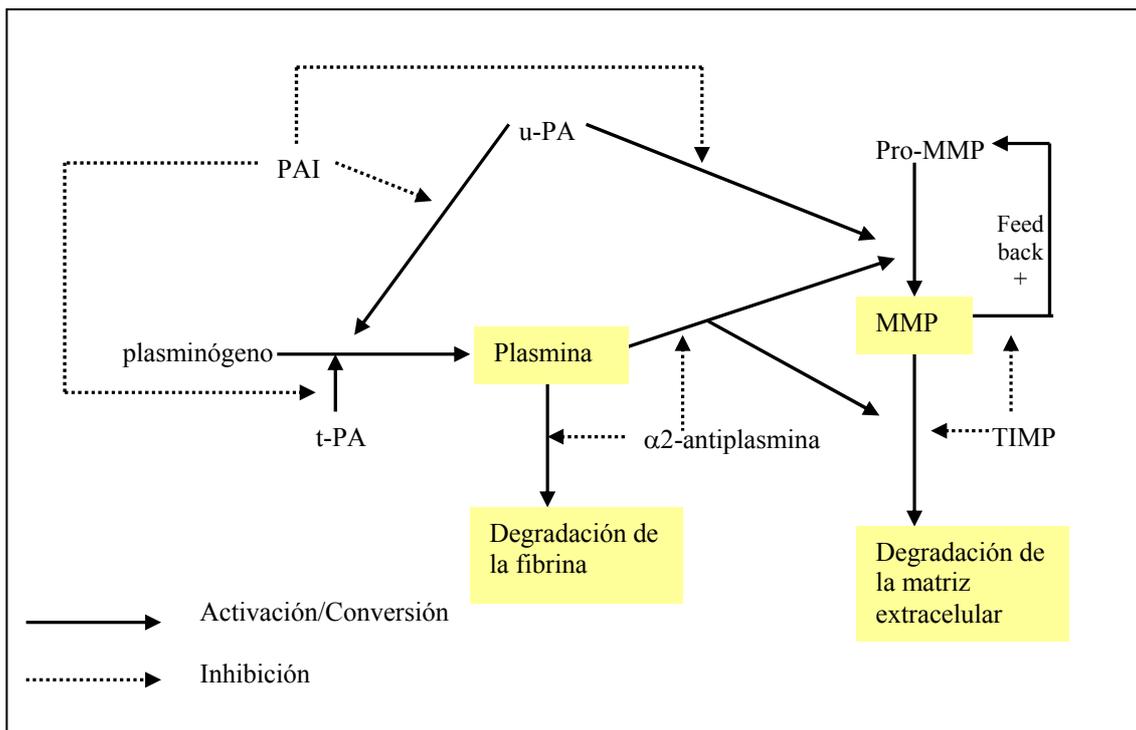
La MMP-3 puede también degradar fibrinógeno directamente o fibrina polimerizada (Bini A, 1996). La MMP-7 convierte la scu-PA en un derivado de peso molecular menor (Marcotte PA, 1992). La MMP-3 también hidroliza específicamente el péptido Gly143-Leu144 unido a u-PA produciéndose un fragmento amino terminal de 17 kDa que contiene la secuencia de unión al receptor uPAR y un fragmento carboxiterminal de 32 kDa que contiene el dominio serin proteinasa (Ugwu F, 1998). El fragmento de 17 kDa se une específicamente al receptor uPAR de las células THP-1. El fragmento de 32 kDa derivado de scu-PA tiene intactas sus propiedades funcionales.

Por tanto la u-PA por una parte puede tener un papel en la activación de la pro-MMP-3 por la vía de la generación de plasmina y por la otra la MMP-3 activa puede evitar la unión al receptor de la u-PA. Esta interacción puede tener un papel en la regulación de las células con una actividad asociada a u-PA y puede representar el mecanismo por el cual son controladas las funciones de uPAR dependientes e independiente de u-PA (Ugwu F, 1998).

La MMP-3 también puede generar a partir del plasminógeno angiostatina (ver procesamiento de proteínas y MMPs) y así ejercer un papel regulador de la angiogénesis. La MMP7 y MMP-9 también pueden generar este fragmento a partir de plasminógeno.

Estudios del sistema fibrinolítico en ratones deficientes en MMP-3 y 11 o TIMP-1 revelan que este no se modifica significativamente (Lijnen HR, 1998c; Lijnen HR, 1998b; Lijnen HR, 1999b).

Por otra parte, en estudios realizados en arterias humanas sin o con lesión arteriosclerótica (Wijnberg MJ, 1999), ponen de manifiesto que hay una expresión constitutiva de todas las MMPs y TIMPs estudiados (MMPs 1, 2, 3, y 9; TIMP-1 y 2) y que solo la expresión de la MMP-9 está incrementada en la placa arteriosclerótica y por tanto esta MMP podría tener un papel importante en el desarrollo y desestabilización de la placa arteriosclerótica (Carmeliet P, 1998). En el mismo estudio de Wijnberg se observa que las arterias lesionadas tienen el PAI-1 muy incrementado y niveles menores de t-PA y uPAR con respecto a las normales. Este estudio concluye con la siguiente especulación de la interacción entre el sistema del plasminógeno y el de las MMPs en el proceso arteriosclerótico: El sistema de la plasmina parecería tener una mayor importancia en las fases iniciales del proceso como el engrosamiento de la íntima y la formación de depósitos de fibrina. En las fases más tardías del proceso, las MMPs podrían estar implicadas en la reestructuración de la matriz extracelular y eventualmente en la desestabilización de la placa arteriosclerótica (ver figura 21).



**Figura 21.-** Representación esquemática de las posibles interacciones entre el sistema fibrinolítico y el sistema metaloproteasas, modificado de Lijnen (Lijnen HR, 2001).