

ESTUDIO CON INHIBIDORES DE LA CICLOOXIGENASA

La inhibición de la trombosis secundaria, es decir trombosis desencadenada por un trombo pre-existente, se evaluó sobre la hipótesis que en dicho fenómeno a pesar de ser dependiente de la trombina podría también depender de la activación de la vía del ácido araquidónico (AA) en las plaquetas. Se estudiaron por tanto, dos fármacos antiagregantes que bloquean de la ciclooxigenasa (Cox) plaquetaria (aspirina, triflusal y su metabolito activo, el HTB). Este tipo de superficie desencadenante del trombo intenta simular las situaciones clínicas donde existe un trombo residual, que es altamente trombogénico, en la zona donde se ha producido una lesión vascular. Para llevar a cabo este estudio se utilizó el conejo como modelo experimental. Los experimentos se dividieron en dos partes, según la duración del tratamiento: *tratamiento agudo*, en la que se administró una sola dosis del fármaco por vía i.v. el mismo día del procedimiento experimental; y *tratamiento crónico*, en la que se realizó una administración diaria del fármaco por vía oral (p.o.) durante una semana. En el grupo de animales sometidos al *tratamiento crónico* también se estudiaron los efectos del tratamiento sobre la expresión de Cox vascular.

TRATAMIENTO AGUDO

En esta sección se describen los resultados obtenidos en el grupo de conejos que recibieron aspirina, triflusal y HTB por vía i.v. A los animales se les administró un único bolo i.v. de aspirina (5 mg/kg), triflusal (10 mg/kg), HTB (10 mg/kg), o suero fisiológico (placebo).

Trombo Formado sobre un Trombo Preformado sobre Pared Vascular Lesionada: Trombosis Secundaria

El experimento de trombosis secundaria se realizó a los 30 minutos de administrar aspirina (ASA, n=3), triflusal (TFS, n=4), HTB (HTB, n=2) o placebo (Control, n=12). Se utilizaron animales sanos con plaquetas sin marcar, para formar el trombo primario (Inductor, n=21). En el grupo tratado con placebo también se determinó la trombosis primaria para realizar el análisis comparativo respecto la secundaria.

Marcaje de las Plaquetas. Parámetros Hematológicos y de Coagulación

El marcaje de las plaquetas se realizó el día anterior al experimento de trombosis. En la Tabla 12 se resumen los datos del marcaje y en la Tabla 13 los valores medios hematológicos durante el experimento. No hubo diferencias entre los cuatro grupos experimentales para dichos parámetros. El valor medio del aPTT a lo largo del experimento en todos los grupos fue de 180% (ratio respecto al valor basal).

PARÁMETRO	CONTROL	ASPIRINA	TRIFLUSAL	HTB
Lisis de plaquetas(%)	10,2 ± 0,1	11,3 ± 0,1	13,1 ± 0,3	7,4 ± 0,3
Eficiencia (%)	80 ± 3	88 ± 3	81 ± 5	85 ± 5
Dosis inyectada (µCi)	49 ± 1	48 ± 1	45 ± 2	48 ± 2

Tabla 12. Resumen del marcaje de plaquetas en los cuatro grupos de tratamiento, el grupo inductor no aparece en la tabla ya que no se realizó el marcaje de sus plaquetas.

PARÁMETRO	CONTROL	ASPIRINA	TRIFLUSAL	HTB
RBC (x10⁶/µl)	4,5 ± 0,6	4,7 ± 0,2	4,7 ± 0,2	4,5 ± 0,5
HCT (%)	28 ± 1	29 ± 1	29 ± 2	28 ± 3
PLT (x10⁶/µl)	322 ± 79	321 ± 48	366 ± 62	263 ± 49

Tabla 13. Principales valores medios hematológicos obtenidos durante el experimento de deposición plaquetar.

Deposición Plaquetaria

Los experimentos de deposición plaquetar se realizaron a una velocidad de cizalladura de 212 s^{-1} y se utilizaron dos tipos de sustratos: subendotelio de conejo (lesión ligera) y túnica media de cerdo (lesión severa). El trombo primario se indujo perfundiendo durante 5 minutos sangre de conejos sanos no tratados (inductor), cuyas plaquetas no estaban marcadas radioactivamente. El trombo secundario se formó al perfundir durante 5 minutos más sangre del animal tratado (aspirina, triflusal, HTB o placebo), las plaquetas del cual sí estaban marcadas radioactivamente. Se evaluó la cantidad de plaquetas (trombo secundario) depositadas sobre el trombo primario.

Además, para estandarizar el modelo de trombosis secundaria o trombo residual, en el grupo control también se analizó la deposición plaquetaria sobre pared vascular (trombo primario) en los dos tipos de sustratos (perfusiones de 5 minutos utilizando sangre con plaquetas marcadas). Los resultados obtenidos aparecen en la Figura 21, donde se muestra que los valores de deposición plaquetaria del trombo secundario fueron significativamente mayores a los del trombo primario (subendotelio de conejo, $p < 0,05$; túnica media de cerdo, $p < 0,05$). Como también se describe en el estudio con FFR-rFVIIa (trombo primario), al comparar los dos tipos de lesiones se aprecia que la deposición sobre lesión severa es mucho mayor que sobre lesión ligera, tanto en el trombo primario como en el secundario.

En la Figura 22 se muestra la deposición plaquetaria (trombo secundario) obtenida en los cuatro grupos de tratamiento. Al perfundir sangre de conejos tratados con aspirina, triflusal y HTB sobre un trombo preformado sobre subendotelio ($p < 0,001$) (Figura 22A) y sobre túnica media ($p < 0,001$) (Figura 22B) la deposición disminuyó significativamente respecto al grupo control.

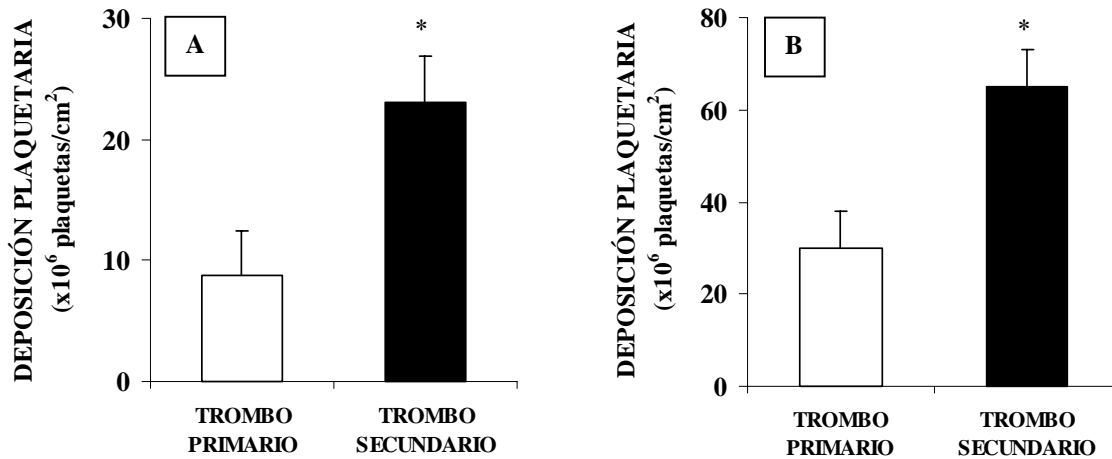


Figura 21. Deposición plaquetar total en el grupo control (placebo) sobre lesión ligera (subendotelio de conejo, n=8) (A) y severa (B) (túnica media de cerdo, n=7) (trombo primario), y sobre un trombo preformado sobre lesión ligera (A) (n=11) y severa (B) (n=8) (trombo secundario), al perfundir durante 5 minutos a baja velocidad de cizalladura (212 s^{-1}). * $p < 0,05$ vs. trombo primario.

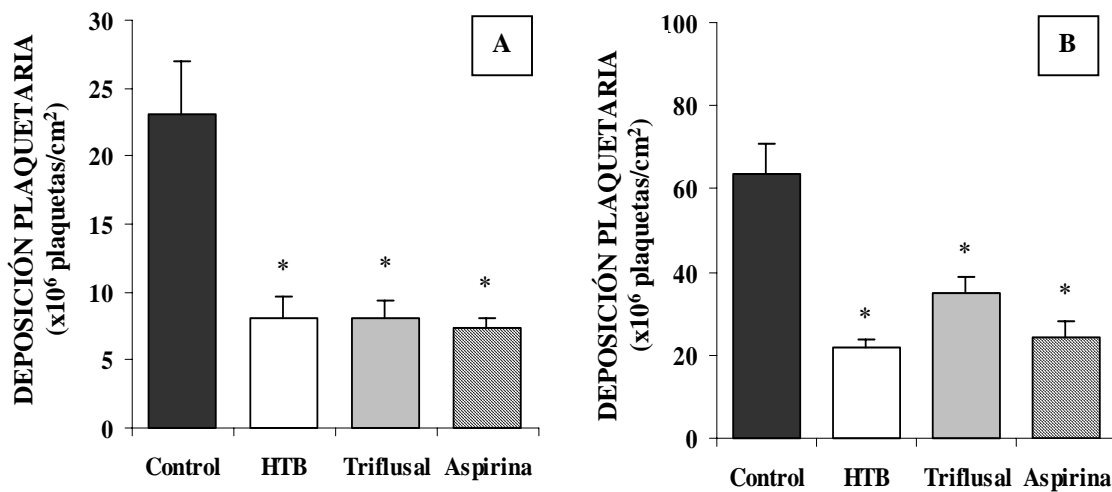


Figura 22. Deposición plaquetar total al perfundir en un trombo preformado sobre pared vascular con lesión ligera (subendotelio de conejo) (A) y severa (túnica media de cerdo) (B) a baja velocidad de cizalladura (212 s^{-1}), en los cuatro grupos de tratamiento (lesión ligera, C, n=11; ASA, n=6; TFS, n=4; HTB, n=5; lesión severa, C, n=8; ASA, n=6; TF, n=7; HTB, n=3). * $p < 0,05$ vs. grupo control.

TRATAMIENTO CRÓNICO

En este apartado se describe la parte del estudio en la cual el tratamiento se aplicó de manera crónica. A los conejos se les administró oralmente aspirina (30 mg/kg/día), triflusal (40 mg/kg/día) o placebo durante 8 días, y al final de este periodo se evaluó la trombosis secundaria. Se realizó un estudio preliminar con varias dosis (aspirina: 10, 20 y 30 mg/kg/día; triflusal: 15, 30 y 40 mg/kg/día) para determinar la dosis efectiva en cada caso (los resultados no se muestran). Las dosis mínimas con las que se obtuvo una inhibición de la trombosis secundaria fueron las que se eligieron para realizar el estudio, 30 mg/kg/día de aspirina y 40 mg/kg/día de triflusal.

Seguimiento de los Parámetros Hematológicos y Bioquímicos

Los parámetros hematológicos y bioquímicos se determinaron en todos los grupos de animales (Control: Placebo n=8; Aspirina: Aspirina 30 mg/kg/día n=7; Triflusal: Triflusal 40 mg/kg/día n=5) antes de empezar el tratamiento (basal) y al finalizarlo (experimento), ya que la modificación de alguno de estos parámetros podría indicar un efecto de los fármacos utilizados.

Los datos referentes a los parámetros hematológicos que se resumen en la Tabla 14 muestran que no se encontraron diferencias significativas en ningún caso. En la Tabla 15 se muestran las determinaciones bioquímicas en los mismos grupos de tratamiento. Todos los valores encontrados se situaron dentro de los intervalos de normalidad para el conejo.

GRUPO	CONTROL		ASPIRINA		TRIFLUSAL	
	Basal	Post-tto	Basal	Post-tto	Basal	Post-tto
Periodo determinación						
RBC (x10 ⁶ /mm ³)	5,6 ± 0,2	5,3 ± 0,1	5,4 ± 0,2	5,4 ± 0,2	5,5 ± 0,2	5,4 ± 0,2
PLT (x10 ³ /mm ³)	446 ± 46	464 ± 36	470 ± 28	465 ± 35	429 ± 20	428 ± 31
HCT (%)	34 ± 1	34 ± 1	33 ± 1	33 ± 1	33 ± 1	33 ± 11
MCV (micron mm ³)	61 ± 1	59 ± 3	60 ± 1	62 ± 1	61 ± 1	62 ± 1
MCH (pico grams)	20,1 ± 0,3	20,0 ± 0,5	21,4 ± 0,3	21,2 ± 0,3	21,0 ± 0,5	21,1 ± 0,4
HGB (%)	11,1 ± 0,3	11,2 ± 0,2	12,4 ± 0,4	11,2 ± 0,4	12,3 ± 0,3	11,0 ± 0,3
WBC (x10 ³ /mm ³)	6,8 ± 0,6	6,0 ± 0,4	7,0 ± 0,1	6,3 ± 0,7	8,4 ± 0,7	6,8 ± 0,6

Tabla 14. Parámetros hematológicos en los diferentes grupos de tratamiento, al empezar el tratamiento (basal) y al finalizarlo después de 8 días (post-tto).

GRUPO	CONTROL		ASPIRINA		TRIFLUSAL	
	Basal	Post-tto	Basal	Post-tto	Basal	Post-tto
Periodo determinación						
AST (U/L)	18 ± 3	35 ± 13	20 ± 3	30 ± 2	33 ± 5	46 ± 8
ALT (U/L)	47 ± 7	54 ± 8	42 ± 6	59 ± 9	43 ± 5	55 ± 8
BUN (mg/dl)	12 ± 1	15 ± 1	11 ± 1	15 ± 1	13 ± 1	16 ± 1
Creatinina (mg/dl)	0,7 ± 0	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,8 ± 0,1
Proteínas Totales (g/dl)	5,7 ± 0,2	4,6 ± 0,1	4,7 ± 0,2	4,3 ± 0,2	4,7 ± 0,2	4,4 ± 0,3

Tabla 15. Parámetros bioquímicos en los diferentes grupos de tratamiento, al empezar el tratamiento (basal) y al finalizarlo después de 8 días (post-tto).

Trombo Formado sobre un Trombo Preformado sobre Pared Vascular Lesionada: Trombosis Secundaria

Los estudios de trombosis se realizaron al finalizar el período de 8 días de tratamiento con aspirina (ASA 30, n=7), triflusal (TFS 40, n=5) o placebo (Control,

n=8). Se utilizaron animales sanos, con plaquetas sin marcar, para formar el trombo primario (Inductor, n=20).

Marcaje de las Plaquetas. Parámetros Hematológicos y de Coagulación

El marcaje de las plaquetas se realizó el día anterior al experimento de trombosis. En la Tabla 16 se resumen los datos del marcaje y en la Tabla 17 los valores medios de coagulación y hematológicos durante el experimento. No hubo diferencias entre los tres grupos experimentales para dichos parámetros.

PARÁMETRO	CONTROL	ASPIRINA	TRIFLUSAL
Lisis de plaquetas (%)	33 ± 5	16 ± 1	19 ± 1
Eficiencia (%)	83 ± 2	88 ± 2	87 ± 3
Plaquetas inyectadas (x10 ⁶)	1,9 ± 0,3	2,1 ± 0,2	2,0 ± 0,3
Dosis inyectada (μCi)	53 ± 3	52 ± 3	52 ± 5

Tabla 16. Resumen del marcaje de plaquetas en los tres grupos de tratamiento, el grupo inductor no aparece en la tabla ya que no se realizó el marcaje de sus plaquetas.

PARÁMETRO	CONTROL	ASPIRINA	TRIFLUSAL
aPTT (% basal)	159 ± 17	127 ± 51	160 ± 39
PT (% basal)	103 ± 2	122 ± 9	138 ± 20
Fibrinógeno (mg/dl)	274 ± 19	308 ± 14	274 ± 11
RBC (x10 ⁶ /μl)	4,4 ± 0,2	4,6 ± 0,2	4,6 ± 0,1
HCT (%)	27 ± 1	28 ± 1	29 ± 1
PLT (x10 ⁶ /μl)	281 ± 13	289 ± 12	322 ± 22

Tabla 17. Principales valores medios de coagulación y hematológicos obtenidos durante el experimento de deposición plaquetar.

Deposición Plaquetar

El estudio de deposición plaquetar se realizó en las mismas condiciones que en la primera parte del estudio (tratamiento agudo), pero las perfusiones se realizaron a alta velocidad de cizalladura (1700 s^{-1}).

Tal como se observa en las Figuras 23A y 24A, la deposición plaquetar disminuyó significativamente al perfundir sangre de conejos tratados con aspirina y triflusal sobre un trombo preformado sobre lesión ligera ($p < 0,05$) y severa ($p < 0,05$). Al analizar la deposición axial (Figuras 23B y 24B) se observó una tendencia a obtener el patrón característico: segmento a \geq segmento b \geq segmento c (Badimon L *et al.*, 1989). También se observó la reducción de la deposición plaquetaria en los grupos tratados farmacológicamente respecto al grupo control, aunque no siempre se alcanzó la significación estadística en los tres segmentos.

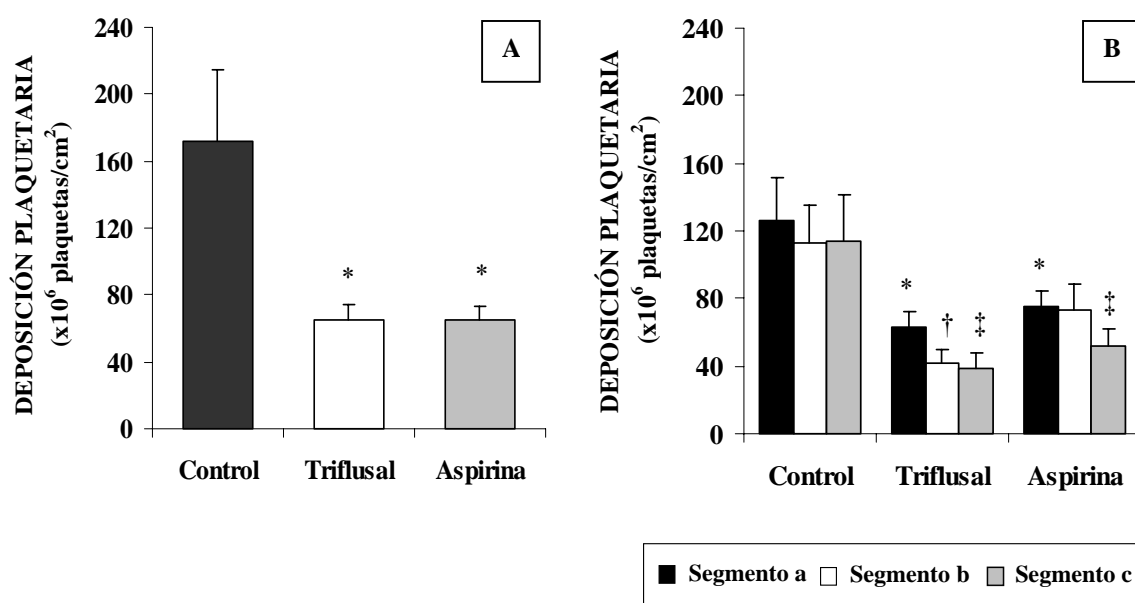


Figura 23. Deposición plaquetar total (A) y axial (B) sobre un trombo preformado sobre pared vascular con lesión ligera (subendotelio de conejo) a alta velocidad de cizalladura (1700 s^{-1}), en los tres grupos de tratamiento (C, n=12; ASA, n=12; TFS, n=9). Gráfica A: * $p < 0,05$ vs. grupo control; Gráfica B: * $p < 0,05$ vs. grupo control en el segmento a, † $p < 0,05$ vs. grupo control en el segmento b y ‡ $p < 0,05$ vs. grupo control en el segmento c.

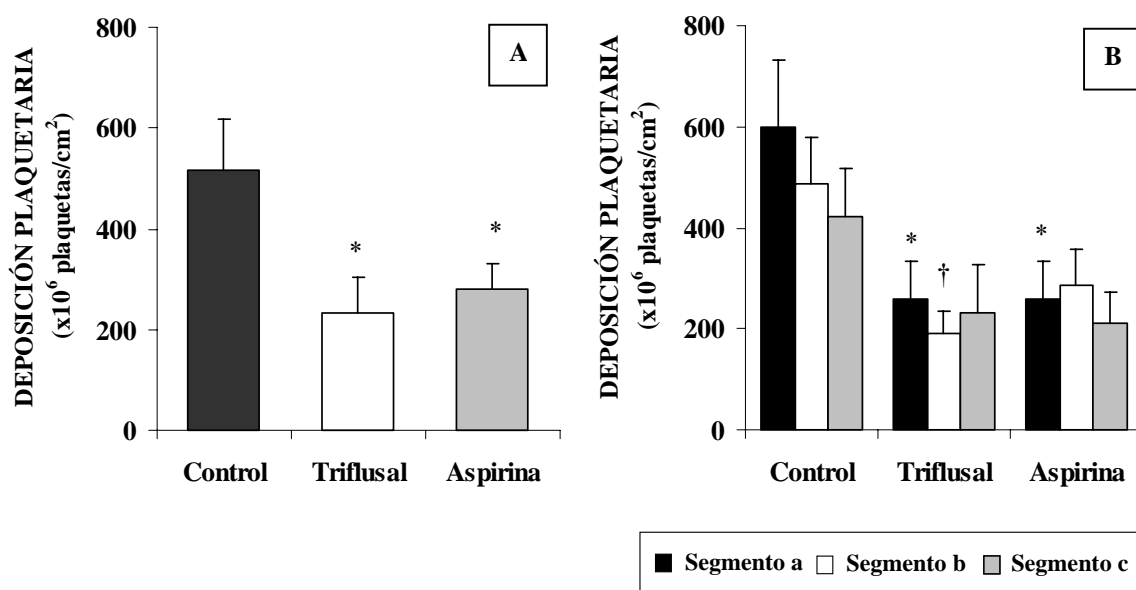


Figura 24. Deposición plaquetaria total (A) y axial (B) sobre un trombo preformado sobre pared vascular con lesión severa (túnica media de cerdo) a alta velocidad de cizalladura (1700 s^{-1}), en los tres grupos de tratamiento (C, n=12; ASA, n=12; TFS, n=9). Gráfica A: * $p < 0,05$ vs. grupo control; Gráfica B: * $p < 0,05$ vs. grupo control en el segmento a, † $p < 0,05$ vs. grupo control en el segmento b y ‡ $p < 0,05$ vs. grupo control en el segmento c.

Composición del Trombo

Mediante técnicas histológicas se analizó la composición y la forma de los trombos formados sobre la pared vascular lesionada. Los cortes histológicos obtenidos del segmento axial b se tiñeron con Tricrómico de Masson y posteriormente se detectó la presencia de fibrina y plaquetas mediante tinción inmunohistoquímica. La Figura 25 muestra imágenes representativas de los tres grupos. A diferencia de los trombos primarios (ver Figura 10 del apartado *Estudio con Inhibidor de Factor Tisular, FFR-rFVIIa*), el trombo compuesto por el trombo primario y secundario formado sobre lesión ligera no consistía en una monocapa de plaquetas sin fibrina, sino que estaba formado por pequeños agregados plaquetarios acompañados de unos pocos filamentos de fibrina (Figuras 25A, 25B y 25C). El trombo resultante sobre lesión severa era de gran tamaño, y al igual que los trombos primarios (ver Figura 11 del apartado *Estudio con Inhibidor de Factor Tisular, FFR-rFVIIa*), estaba compuesto de grandes agregados de plaquetas unidos a la superficie vascular mediante una importante capa de fibrina (Figuras 25D, 25E y 25F). En algunos casos se apreció una segunda capa de fibrina en

la zona central del trombo (las imágenes no se muestran), que indicaba el inicio de la formación del trombo secundario.

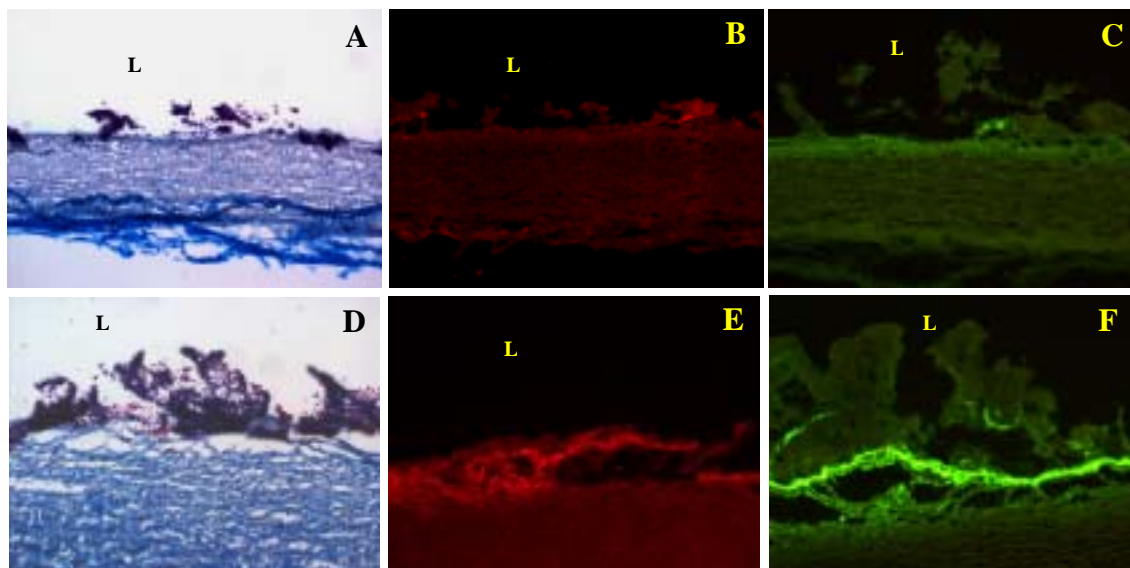


Figura 25. Micrografías representativas del trombo compuesto por el trombo primario y secundario formados sobre de pared vascular con lesión ligera (subendotelio de conejo) (A, B y C) y severa (túnica media de cerdo) (D, E y F), perfundida a alta velocidad de cizalladura (1700 s^{-1}). Las plaquetas aparecen teñidas en rojo (B y E) y la fibrina en verde (C y F) (x100 aumentos).

Efecto de la Aspirina y del Trifusal sobre la Expresión de Cox-1 y Cox-2 en la Pared Vascular

Cox-1 y Cox-2 están implicadas en la fisiología vascular así como en la progresión de la enfermedad aterosclerótica, ya que son responsables de la producción de prostaciclina, molécula antitrombótica y vasodilatadora, así como de mediadores de inflamación, que participan en la progresión de la lesión aterosclerótica. Por ello se estudió el efecto del tratamiento crónico con aspirina y triflusal, a dosis efectivas como antitrombóticas, sobre la expresión de ambos isoenzimas en la pared vascular (no aterosclerótica).

La expresión génica de Cox-1 y Cox-2 en la arteria aorta se evaluó por RT-PCR, y los resultados se normalizaron con los niveles del gen constitutivo gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). La expresión de proteína Cox-2 se determinó

mediante Western blot (Cox-1 no se pudo estudiar por no disponer de un anticuerpo específico). El número de muestras analizadas por grupo fue menor que el tamaño inicial del grupo, ya que no fue posible obtener muestras de RNA y proteína de todos los animales (Control, n=6; ASA n=6; TFS, n=5).

Expresión Génica de Cox-1 y Cox-2

En la Figura 26 se muestra el resultado de la amplificación de las secuencias específicas de GAPDH, Cox-1 y Cox-2 en aorta de conejo en los tres grupos de tratamiento. Tras correr el cDNA amplificado en un gel de agarosa junto al marcador de peso molecular, las bandas se situaron en las zonas previstas según su tamaño (GAPDH=652 pb, Cox-1=466 pb y Cox-2=282 pb). Al cuantificar la expresión de Cox-1 normalizada por los niveles de GAPDH, se observó que en el grupo tratado con triflusal los niveles fueron variables y la media fue inferior a la de los otros dos grupos, aunque las diferencias no fueron significativas (Figura 27A). En cambio, los niveles de Cox-2 (normalizados por GAPDH) estaban disminuidos de manera estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en los grupos tratados con aspirina y triflusal respecto al grupo control (Figura 27B).

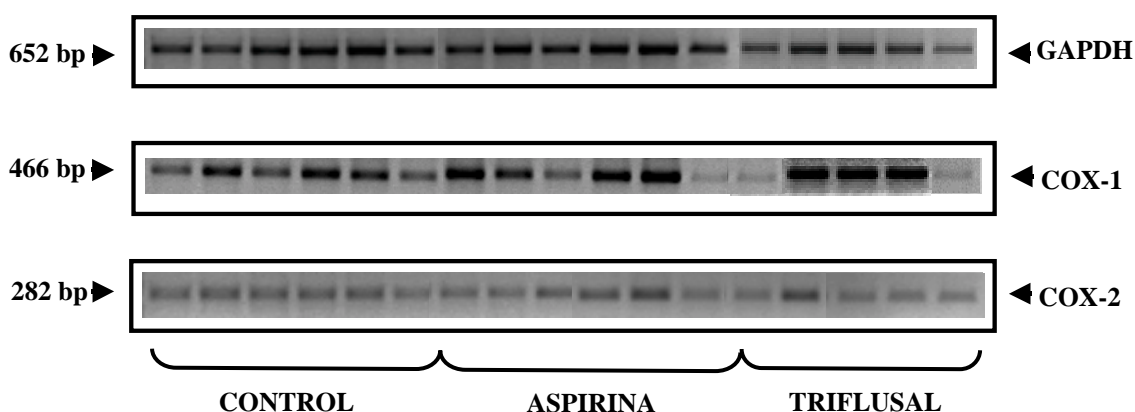


Figura 26. RT-PCR de GAPDH, Cox-1 y Cox-2 en los tres grupos de tratamiento (Control, n=6; ASA n=6; TFS, n=5).

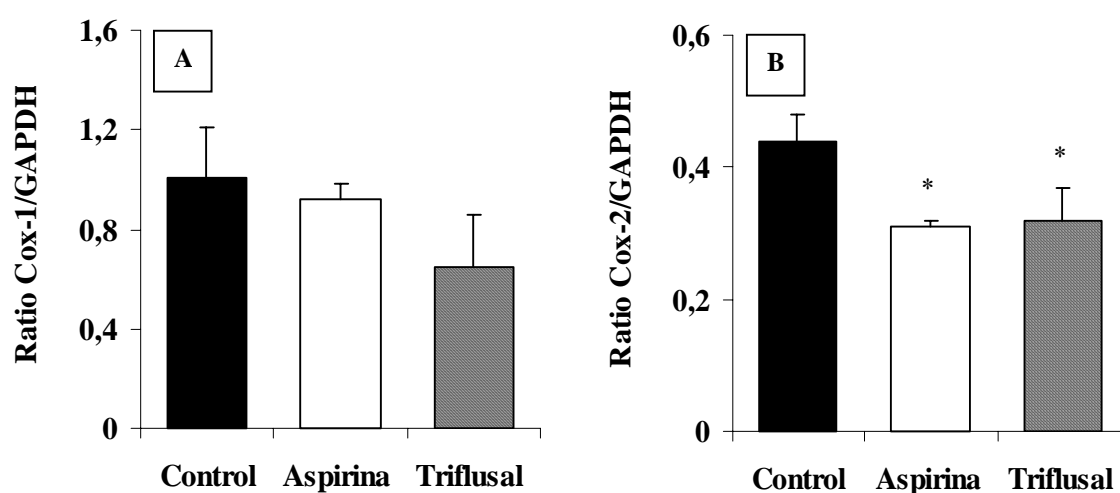


Figura 27. Cuantificación de la expresión de Cox-1 (A) y Cox-2 (B) (normalizadas con GAPDH) en arteria aorta en los tres grupos de tratamiento (Control, n=6; ASA n=6; TFS, n=5). * $p < 0,05$ vs. grupo control.

Expresión Proteica de Cox-2

En la Figura 28A se observan las bandas de proteína Cox-2 obtenidas en los tres grupos de tratamiento. La cuantificación densitométrica de las señales mostró una disminución significativa ($p < 0,0005$) de los niveles de Cox-2 en los grupos tratados con aspirina y triflusal respecto al grupo control (Figura 28B). La reducción de la expresión de Cox-2 fue mucho más importante en el grupo tratado con aspirina que en el tratado con triflusal, aunque la diferencia entre ambos no fue significativa.

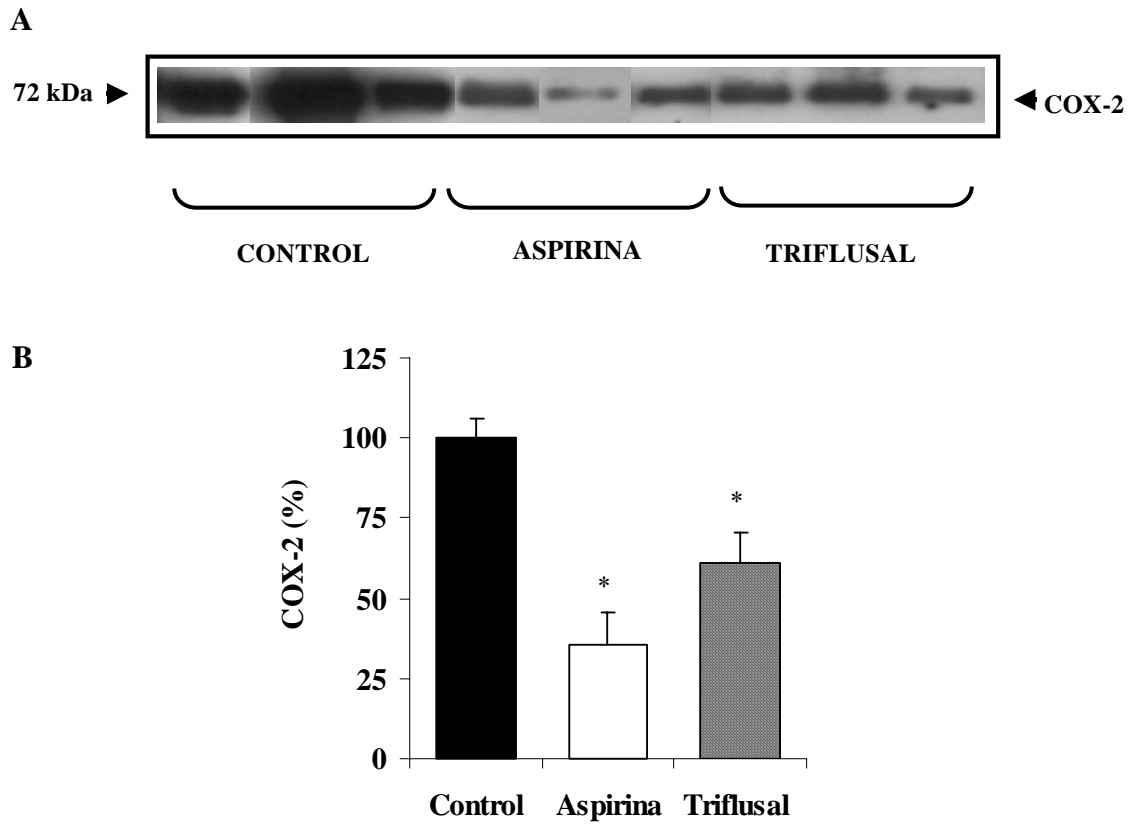


Figura 28. Western blot (A) y cuantificación (B) de la proteína Cox-2 en arteria aorta en los tres grupos tratamiento (Control, n=6; ASA n=6; TFS, n=5). * $p < 0,05$ vs. grupo control.

ESTUDIO CON INHIBIDORES DE LA HMG-CoA REDUCTASA

La hipótesis a evaluar en esta parte del estudio, consistió en que las estatinas ejercen efectos inhibidores sobre la trombosis aunque no se produzca una reducción de los lípidos plasmáticos. Para ello se utilizó un modelo hiperlipémico (cerdo) que se trató con estatinas (pravastatina y simvastatina) pero sin modificar los niveles plasmáticos de lípidos.

Los animales se dividieron en 4 grupos en función de la dieta y el tratamiento recibido: hiperlipémico control (HC), hiperlipémico tratado con pravastatina (HP), hiperlipémico tratado con simvastatina (HS) y normolipémico control (NC). Los animales hiperlipémicos fueron alimentados con una dieta hiperlipémica (pienso C-1, C.I.A. con 2% colesterol, 1% ácido cólico y 20% sebo ternera) durante 50 días, ya que es el periodo mínimo para obtener lesiones arteriales e incremento de los lípidos plasmáticos en el cerdo (Pueyo Palazón C *et al.*, 1998; Alfon J *et al.* 1999b; Royo T *et al.*, 2000). La cantidad de pienso recibida fue equivalente a un 3-3,5% del peso corporal. El tratamiento con estatinas se inició el día 50 y la dieta hiperlipémica se mantuvo. Para estudiar el efecto del tratamiento farmacológico a lo largo del tiempo, el estudio se dividió en dos partes: en la primera, los animales recibieron estatinas durante 50 días, y en la segunda, durante 100 días. Se administraron dos dosis de pravastatina (5 y 10 mg/kg/día) y de simvastatina (2,5 y 5 mg/kg), pero la dosis de pravastatina de 10 mg/kg/día produjo toxicidad hepática y se eliminó del estudio.

TRATAMIENTO CON ESTATINAS DURANTE 50 DÍAS

En este apartado se describen los resultados obtenidos en el protocolo experimental donde los cerdos recibieron una dieta normolipémica (grupo normolipémico control, NC, n=4) o hiperlipémica durante 100 días, y estatinas (grupo

pravastatina 5 mg/kg/día, HP, n=4; grupo simvastatina 5 mg/kg/día, HS, n=3) o placebo (grupo hiperlipémico control, HC, n=6) durante los últimos 50 días.

Evolución del Peso y de los Parámetros Hematológicos, Bioquímicos y de Coagulación

El control de los parámetros hematológicos, bioquímicos y de coagulación, así como del peso de los animales, se realizó periódicamente. La evolución de estos parámetros a lo largo de los 100 días se muestra en las Figuras 29, 30, 31 y 32.

El peso (Figura 29) en todos los grupos estudiados, se incrementó de manera similar durante todo el periodo. Los valores obtenidos en las determinaciones hematológicas (Figura 30) y bioquímicas (Figura 31) a lo largo de los 100 días, se mantuvieron prácticamente dentro de los valores de normalidad para esta especie y no se encontraron valores anómalos. Los parámetros de coagulación (Figura 32) también siguieron una evolución similar en todos los grupos y prácticamente se encontraron dentro de los intervalos normales para el cerdo.

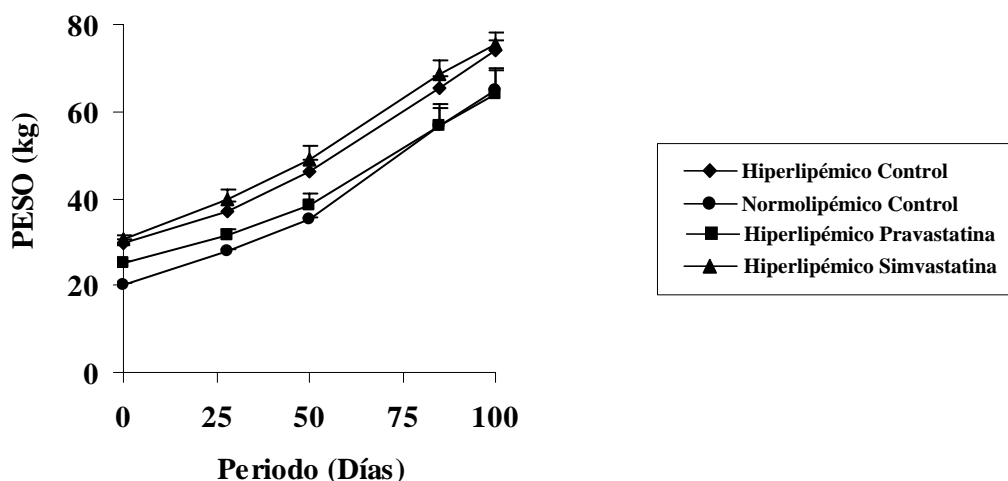


Figura 29. Seguimiento del peso de los animales a lo largo de los 100 días que duró el protocolo (HC, n=6; HP, n=4; HS, n=3; NC, n=4).

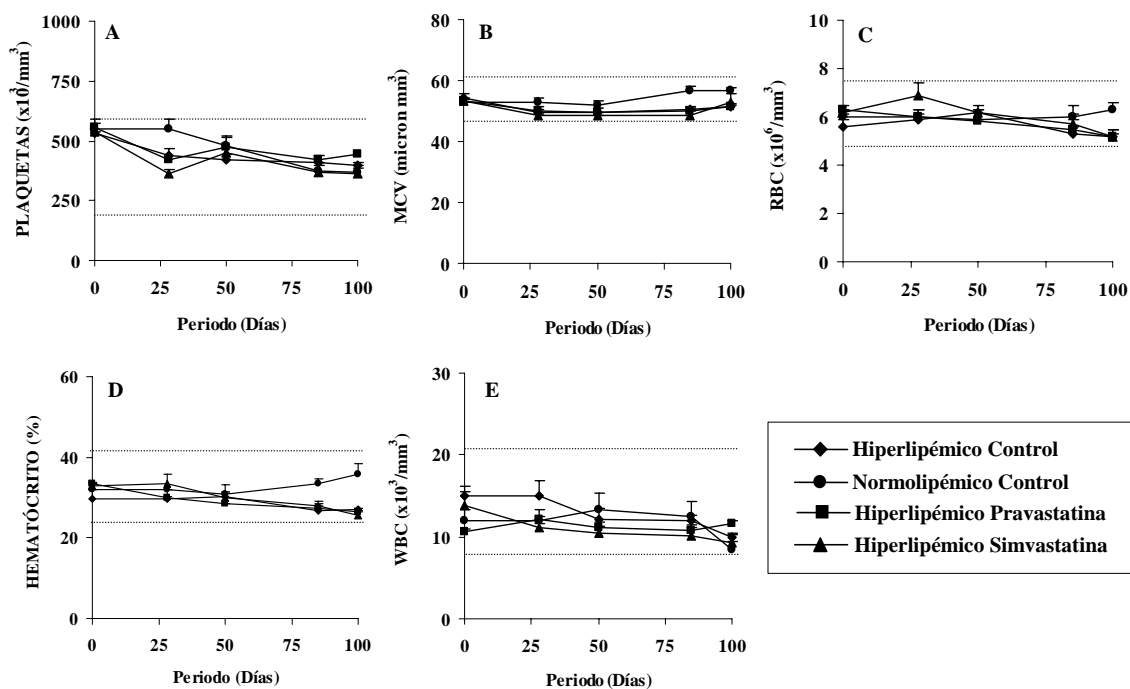


Figura 30. Seguimiento de los principales parámetros hematológicos a lo largo de los 100 días que duró el protocolo (HC, n=6; HP, n=4; HS, n=3; NC, n=4). Los intervalos de normalidad para cada parámetro aparecen delimitados por líneas punteadas.

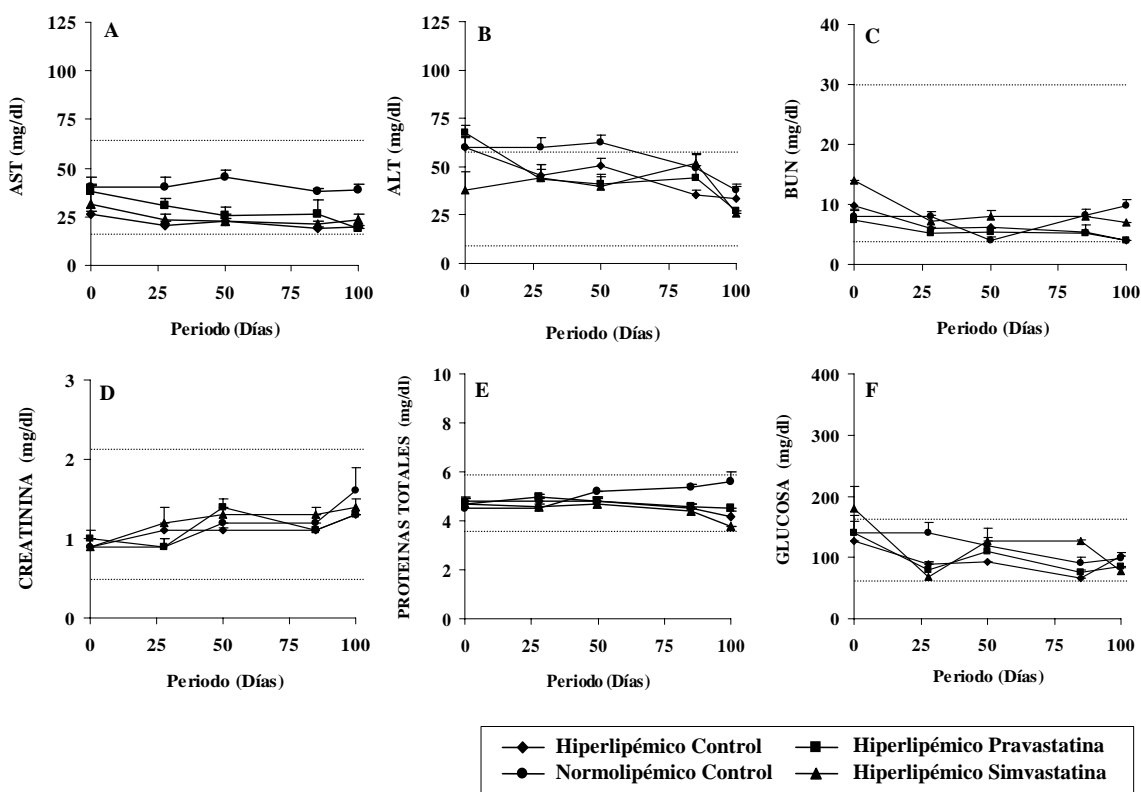


Figura 31. Seguimiento de los principales parámetros bioquímicos a lo largo de los 100 días que duró el protocolo (HC, n=6; HP, n=4; HS, n=3; NC, n=4). Los intervalos de normalidad para cada parámetro aparecen delimitados por líneas punteadas.

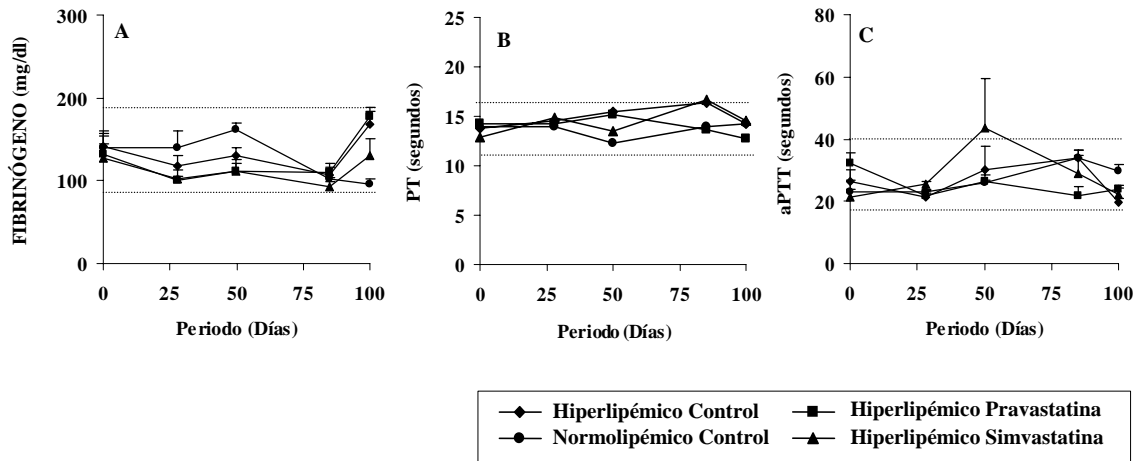


Figura 32. Seguimiento de los principales parámetros de coagulación a lo largo de los 100 días que duró el protocolo (HC, n=6; HP, n=4; HS, n=3; NC, n=4). Los intervalos de normalidad para cada parámetro aparecen delimitados por líneas punteadas.

Evolución de los Lípidos Plasmáticos

Al igual que los parámetros hematológicos, bioquímicos y de coagulación, los lípidos se determinaron periódicamente en todos los grupos.

Colesterol Total y Triglicéridos

La administración de la dieta hiperlipémica provocó un incremento de los niveles plasmáticos de colesterol (representado como niveles plasmáticos en mg/dl, Figura 33A; y como área bajo la curva, AUC, Figura 33B) en todos los grupos respecto a su determinación basal y respecto al grupo normolipémico control. El tratamiento con estatinas (entre el día 50 y 100) no modificó significativamente la evolución de los niveles de colesterol.

La concentración de triglicéridos (mg/dl, Figura 33C; y AUC, Figura 33D) no aumentó tras la administración de la dieta hiperlipémica, y su evolución a lo largo de los 100 días fue similar y dentro del intervalo de normalidad en todos los grupos.

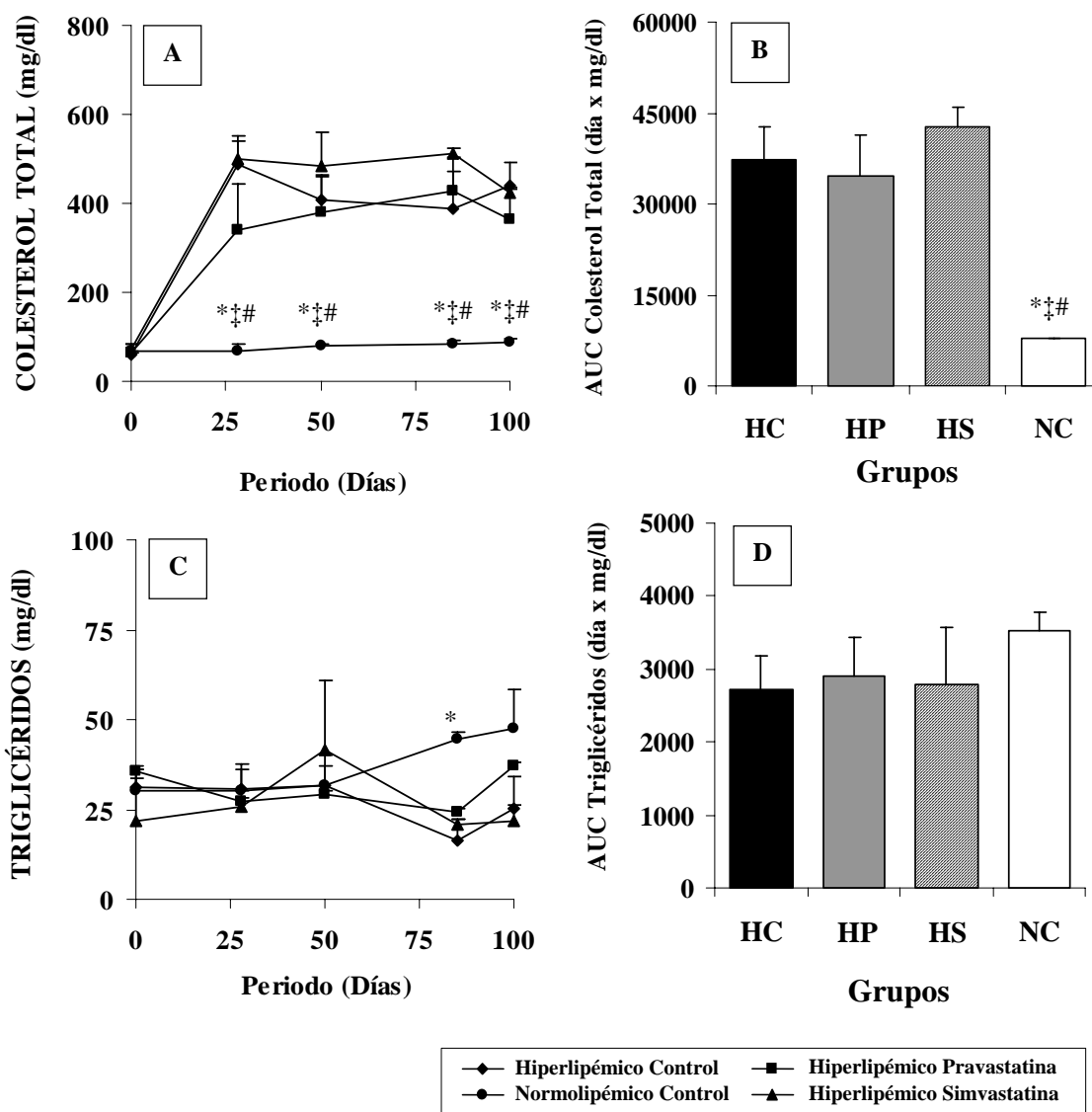


Figura 33. Seguimiento de los niveles plasmáticos de colesterol (A, B) y triglicéridos (C, D) (expresados como concentración y área bajo la curva -AUC-) a lo largo de los 100 días que duró el protocolo (HC, n=6; HP, n=4; HS, n=3; NC, n=4). * $p < 0,05$ vs. HC; ‡ $p < 0,05$ vs. HP y # $p < 0,05$ vs. HS.

Lipoproteínas

Las fracciones lipoproteicas (VLDL, HDL y LDL) también se incrementaron con la administración de la dieta hiperlipémica (Figura 34). No se encontraron diferencias significativas entre grupos hiperlipémicos en los niveles de colesterol HDL, ni LDL (mg/dl, Figura 34A y 34C, respectivamente; y AUC, Figura 34B y 34D, respectivamente). Los valores de VLDL fueron más variables (mg/dl, Figura 34E; y AUC, Figura 34F) y al final del protocolo, los grupos tratados se encontraron ligeramente por debajo del grupo hiperlipémico control (Figura 34E), aunque las diferencias no fueron significativas.

Se calcularon los ratios colesterol total/colesterol HDL y colesterol LDL/colesterol HDL (Figura 35), para evaluar la relación entre las diferentes fracciones lipoproteicas en cada grupo. Ambos ratios se incrementaron con la dieta hiperlipémica y no se apreciaron diferencias significativas entre grupos hiperlipémicos (Figura 35B).

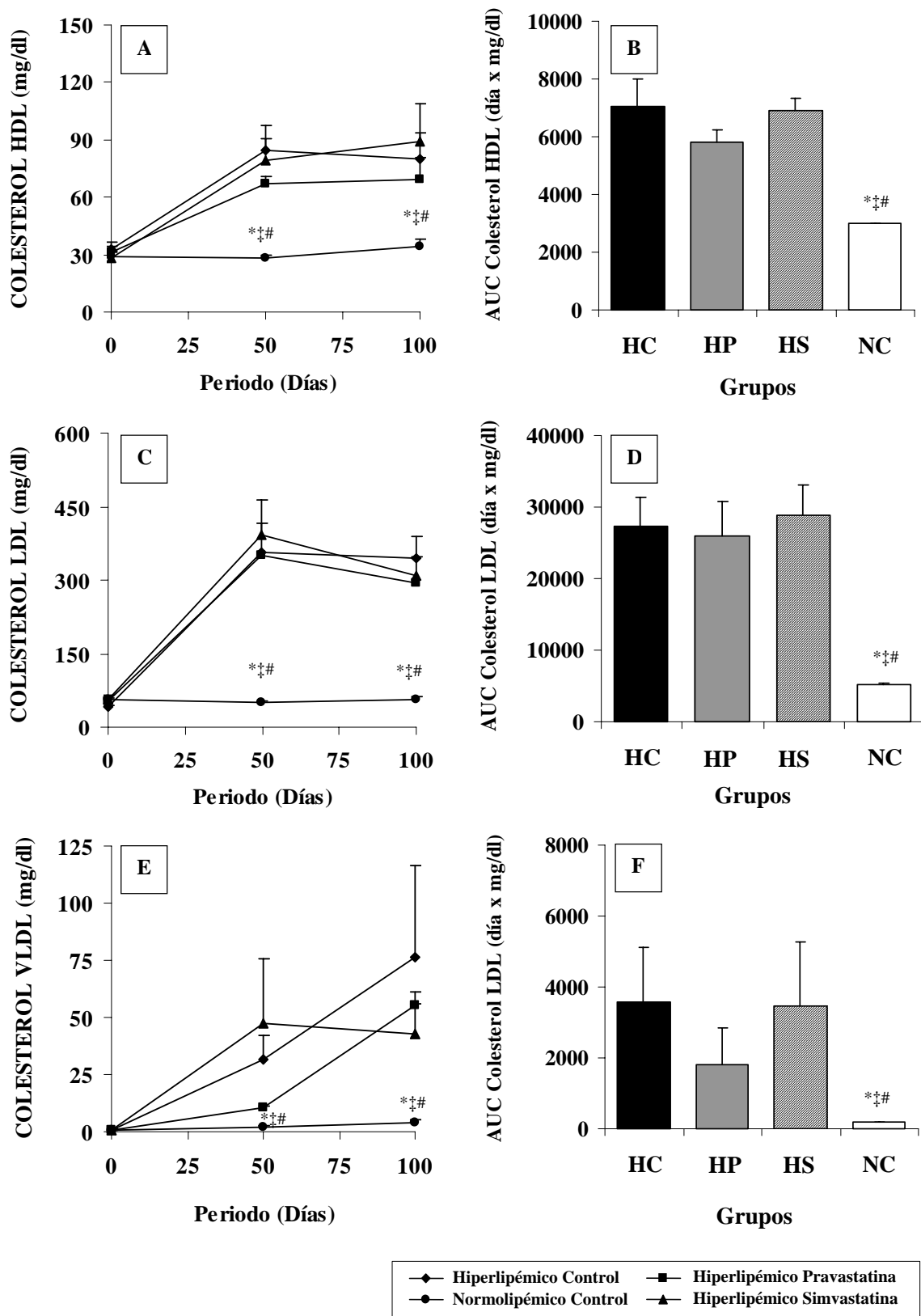


Figura 34. Seguimiento de los niveles plasmáticos de colesterol HDL (A, B), LDL (C, D) y VLDL (E, F) (expresados como concentración y área bajo la curva -AUC-) a lo largo de los 100 días que duró el protocolo (HC, n=6; HP, n=4; HS, n=3; NC, n=4). * p<0,05 vs. HC; ‡ p<0,05 vs. HP y # p<0,05 vs. HS.

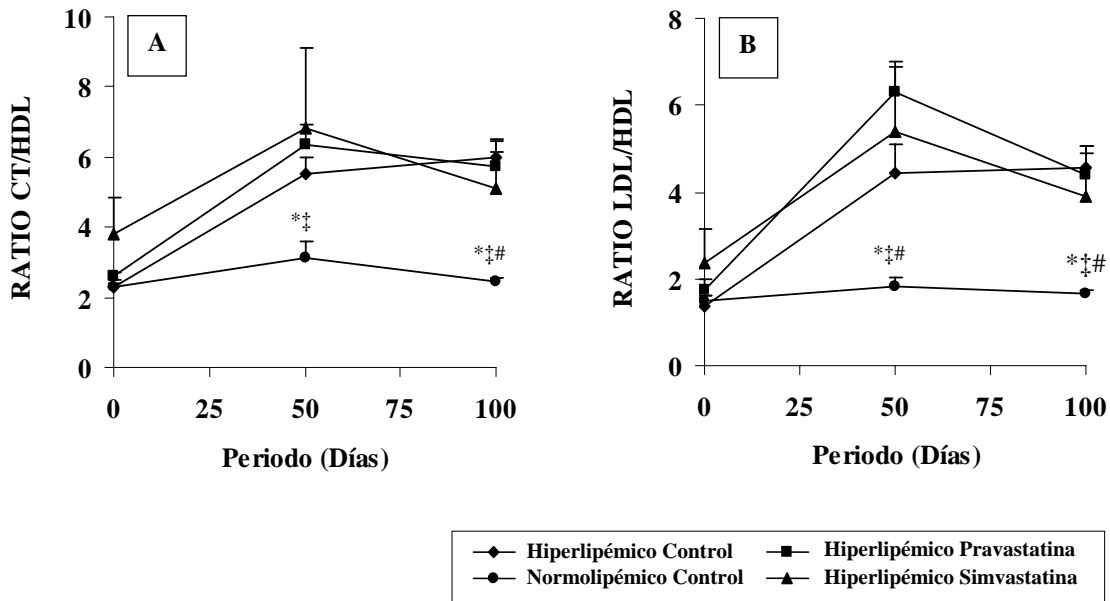


Figura 35. Evolución de los ratios colesterol total/colesterol HDL (A) y colesterol HDL/colesterol LDL (B) a lo largo de los 100 días que duró el protocolo (HC, n=6; HP, n=4; HS, n=3; NC, n=4). * p < 0,05 vs. HC; ‡ p < 0,05 vs. HP y # p < 0,05 vs. HS.

Agregación Plaquetar *ex vivo*

A partir de muestras de sangre obtenidas al final del periodo de tratamiento y dieta (100 días) se evaluó la agregación plaquetar en sangre total inducida por colágeno y en PRP inducida por colágeno y ADP. Los resultados obtenidos en las diferentes condiciones evaluadas aparecen en la Figura 36, no se encontraron diferencias entre grupos en ningún caso.

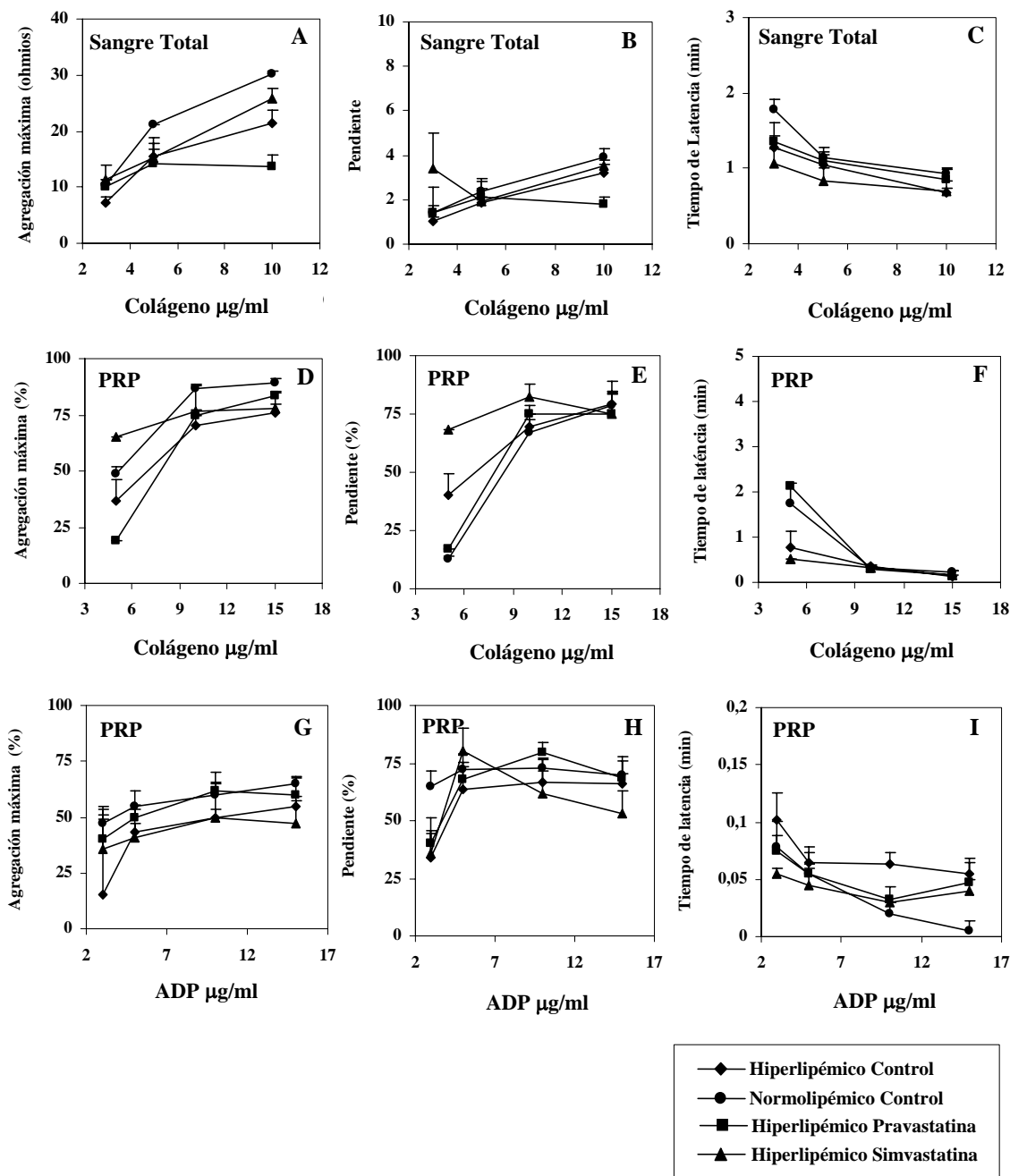


Figura 36. Agregación plaquetar *ex vivo* en los diferentes grupos al final del periodo de dieta y tratamiento (día 100) (HC, n=6; HP, n=4; HS, n=3; NC, n=4). Se estudió la agregación en sangre total a la que se añadió colágeno como agonista (A, B, C) y plasma rico en plaquetas al que se agregó colágeno (D, E, F) o ADP (G, H, I). La agregación se expresa en términos de agregación máxima (A, D, G), velocidad de agregación o pendiente (B, E, H) y tiempo de latencia (C, F, I).

Trombo Formado sobre Pared Vascular Lesionada

Al final el periodo de dieta y tratamiento, se estudió el efecto de la dieta hiperlipémica y de las dos estatinas sobre la trombosis desencadenada por pared vascular lesionada (trombo primario). Se realizaron perfusiones sobre lesión ligera y lesión severa, en condiciones de alta velocidad de cizalladura (1700 s^{-1}) y de flujo no laminar paralelo con estenosis (60-70%).

Marcaje de las Plaquetas. Parámetros Hematológicos y de Coagulación

En la Tabla 18 se resumen los datos del marcaje y en la Tabla 19 los valores medios de coagulación y hematológicos obtenidos durante el estudio de deposición plaquetar. En los parámetros de marcaje no se encontraron diferencias entre los grupos experimentales. Los valores de coagulación y hematológicos variaron ligeramente entre grupos pero oscilaron dentro el rango de normalidad para el cerdo.

PARÁMETRO	Hiperlipémico Control	Hiperlipémico Pravastatina	Hiperlipémico Simvastatina	Normolipémico Control
Lisis de plaquetas (%)	1,3 ± 0,0	1,4 ± 0,0	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,0
Eficiencia (%)	81,3 ± 4,1	81,1 ± 2,2	78 ± 2,1	80,9 ± 5,1
Plaquetas inyectadas ($\times 10^6$)	18,6 ± 3,6	15 ± 2	14,7 ± 5,2	20,1 ± 1,7
Dosis inyectada (μCi)	384 ± 65	313 ± 47	365 ± 28	439 ± 26

Tabla 18. Resumen del marcaje de plaquetas en los grupos de tratamiento (HC, n=6; HP, n=4; HS, n=3; NC, n=4).

PARÁMETRO	Hiperlipémico Control	Hiperlipémico Pravastatina	Hiperlipémico Simvastatina	Normolipémico Control
aPTT (% basal)	262 ± 7	268 ± 10	235 ± 6	329 ± 10
TP (% basal)	94 ± 1	99 ± 1	89 ± 1	105 ± 1
Fibrinógeno (mg/dl)	154 ± 2	168 ± 1	128 ± 2	146 ± 1
RBC (x10 ⁶ /μl)	5,4 ± 0,1	5,5 ± 0,1	5,5 ± 0,1	5,5 ± 0,1
HCT (%)	27,4 ± 0,2	27,5 ± 0,2	27,3 ± 0,1	27,4 ± 0,1
PLT (x10 ⁶ /μl)	354 ± 3	377 ± 7	393 ± 7	388 ± 4

Tabla 19. Principales valores medios de coagulación y hematológicos obtenidos durante el experimento de deposición plaquetar en los grupos de tratamiento (HC, n=6; HP, n=4; HS, n=3; NC, n=4)

Deposición Plaquetaria

Se determinó la deposición plaquetaria en los cuatro grupos de tratamiento (HC, n=6; NC, n=4; HP, n=4; HS, n=3) sobre pared vascular lesionada ligera y severamente en la condiciones flujo laminar paralelo y alta velocidad de cizalladura (1700 s⁻¹) y de flujo no laminar no paralelo y velocidad de cizalladura variable (estenosis vascular).

Deposición Plaquetar en Condiciones de Flujo Laminar Paralelo y Alta Velocidad de Cizalladura

La Figura 37 muestra la deposición plaquetaria total sobre lesión ligera y severa en condiciones de flujo laminar paralelo a alta velocidad de cizalladura (1700 s⁻¹) en los diferentes grupos de animales. Los dos grupos control (hiperlipémico y normolipémico) tuvieron valores de deposición similares en todos los casos, y de los dos grupos que recibieron estatinas, sólo el grupo tratado con pravastatina tuvo una deposición plaquetaria significativamente menor: sobre lesión ligera (Figura 37A) a los 10 minutos (p<0,05), y sobre lesión severa (Figura 37B) a los 5 (p<0,05) y 10 minutos (p<0,001).

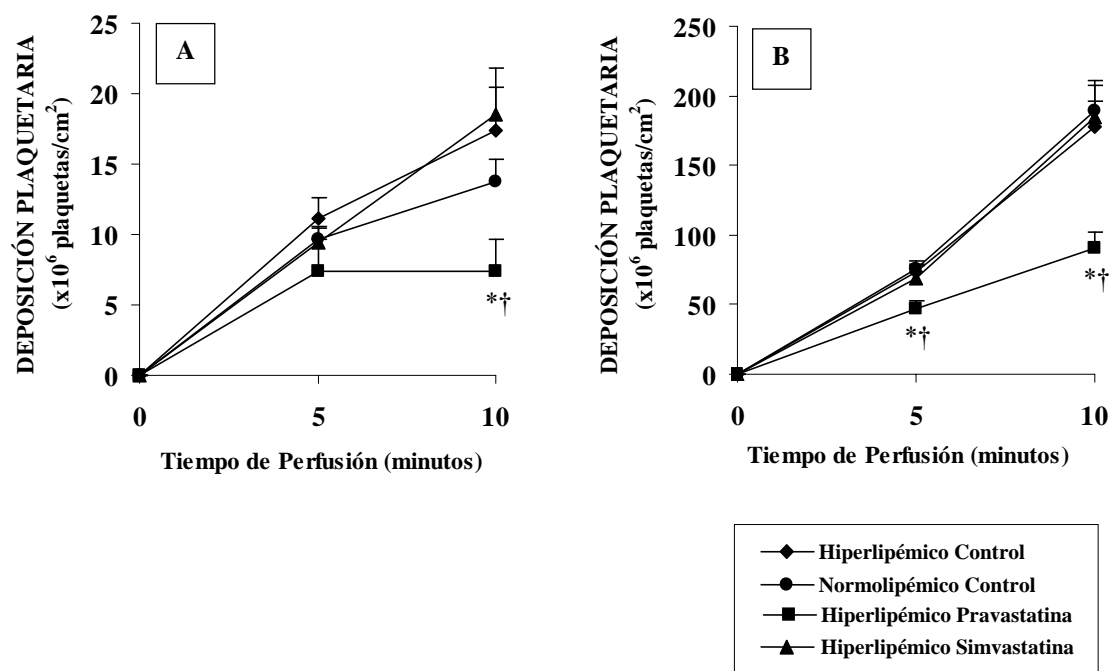


Figura 37. Deposición plaquetar total sobre pared vascular con lesión vascular ligera (A) y severa (B) en condiciones de alta velocidad de cizalladura y flujo laminar (1700 s^{-1}) durante 5 y 10 minutos, en los grupos de tratamiento (lesión ligera, NC, n=32; HC, n=28; HP, n=8; HS, n=17; lesión severa, NC, n=31; HC, n=28; HP, n=7; HS, n=17). * $p < 0,05$ vs. HC y † $p < 0,05$ vs. NC.

Al analizar la distribución axial de la deposición plaquetaria se obtuvo el patrón característico ($a \geq b \geq c$) en la mayoría de los casos, como previamente se ha descrito en los estudios con FFR-rFVIIa y salicilatos. También se apreció la reducción de la deposición en el grupo tratado con pravastatina (Figura 38).

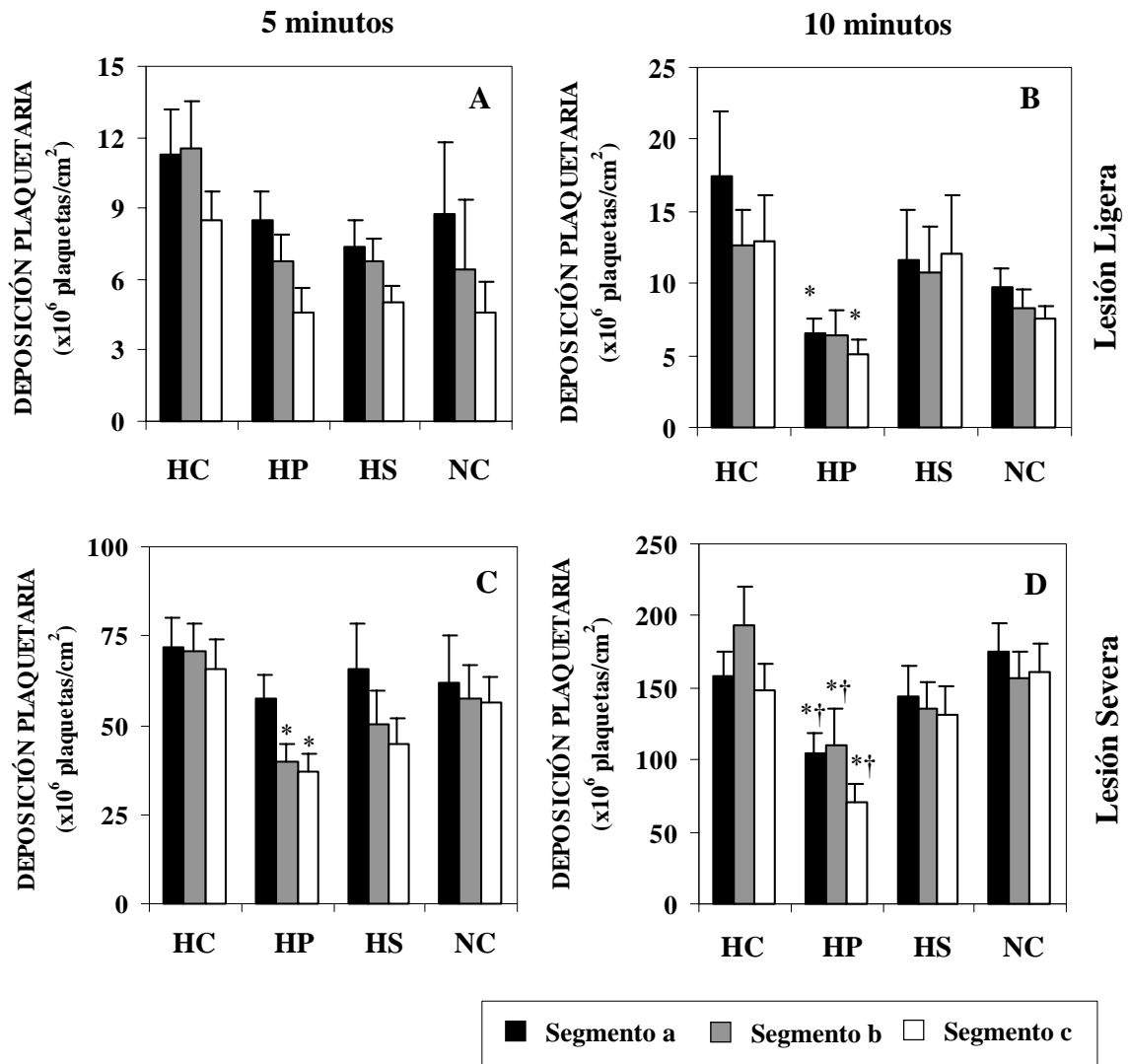


Figura 38. Deposición plaquetar axial sobre pared vascular con lesión ligera (A, B) y severa (C, D), en condiciones de alta velocidad de cizalladura y flujo laminar (1700 s^{-1}) durante 5 (A, C) y 10 minutos (B, D), en los grupos de tratamiento. * $p < 0,05$ HP vs. HC y † $p < 0,05$ HP vs. NC.

Deposición Plaquetar en Condiciones de Flujo no Laminar no Paralelo y Velocidad de Cizalladura Variable (Estenosis Vasculare)

La deposición plaquetaria también se determinó en condiciones de velocidad de cizalladura variable, que se consiguió con la presencia de un estrechamiento del diámetro (0,2 cm) en la zona central del canal de la cámara de perfusión (estenosis del 60-70%). En la Figura 39 aparece la deposición plaquetaria total sobre lesión ligera y

severa en estas condiciones de flujo en los diferentes grupos de tratamiento. La deposición plaquetaria sobre lesión ligera (Figura 39A) a los 5 ($p<0,001$) y a los 10 minutos ($p<0,05$) estaba significativamente incrementada en el grupo hiperlipémico control respecto al normolipémico control. Ambas estatinas redujeron la deposición respecto al grupo hiperlipémico control, aunque sólo el grupo tratado con pravastatina obtuvo una reducción significativa en todas las condiciones (Figura 39B; lesión ligera y severa: 5 minutos, $p<0,001$; 10 minutos, $p<0,05$).

Se estudió la deposición axial, pero a diferencia de los substratos perfundidos a alta velocidad de cizalladura, en este caso cada substrato se cortó en tres segmentos (a, b, c) de diferente tamaño, con la finalidad de obtener íntegro el fragmento central correspondiente a la zona de estenosis ($a=5$ mm; $b=11$ mm; $c=5$ mm) (Figura 40). Se encontraron las diferencias significativas entre grupos que ya se vieron con la deposición plaquetaria total (Figura 39). Además, se observó que en el grupo hiperlipémico control, el patrón de deposición axial era diferente al resto de grupos en todos los casos: la deposición plaquetaria estaba incrementada significativamente en el segmento central (b), correspondiente a la estenosis, respecto a los segmentos inicial (a) y final (c).

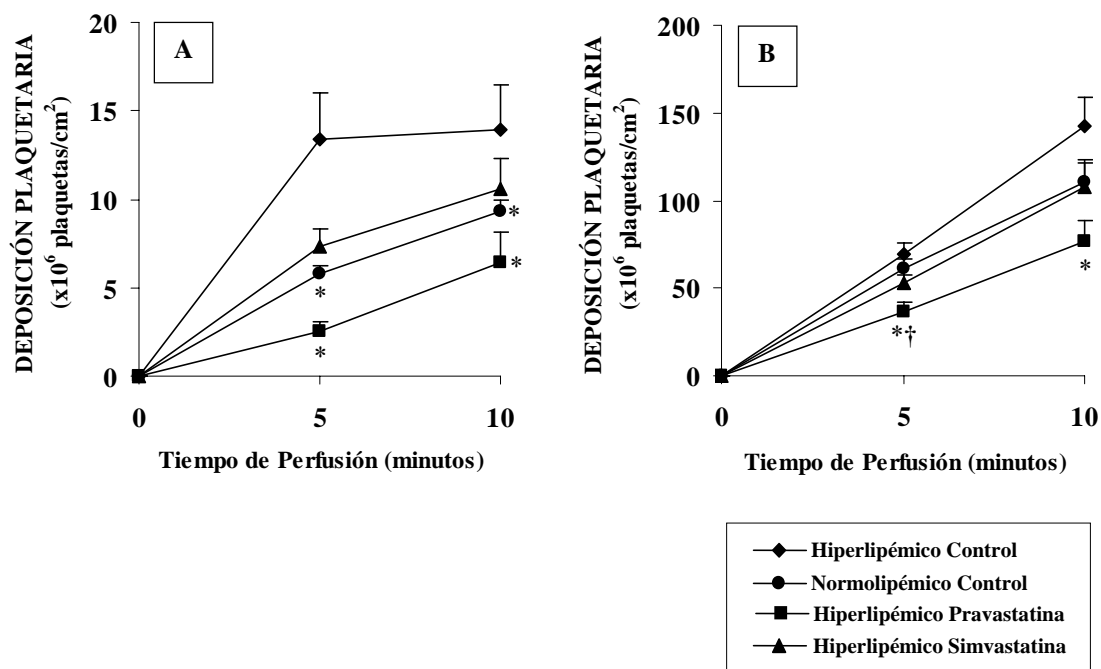


Figura 39. Deposición plaquetar total sobre pared vascular con lesión vascular ligera (A) y severa (B) en condiciones de flujo con estenosis y velocidad de cizalladura variable durante 5 y 10 minutos, en los grupos de tratamiento (lesión ligera, NC, n=31; HC, n=28;HP, n=7; HS, n=17; lesión severa, NC, n=32; HC, n=34;HP, n=21; HS, n=17). * p<0,05 vs. HC y † p<0,05 vs. NC

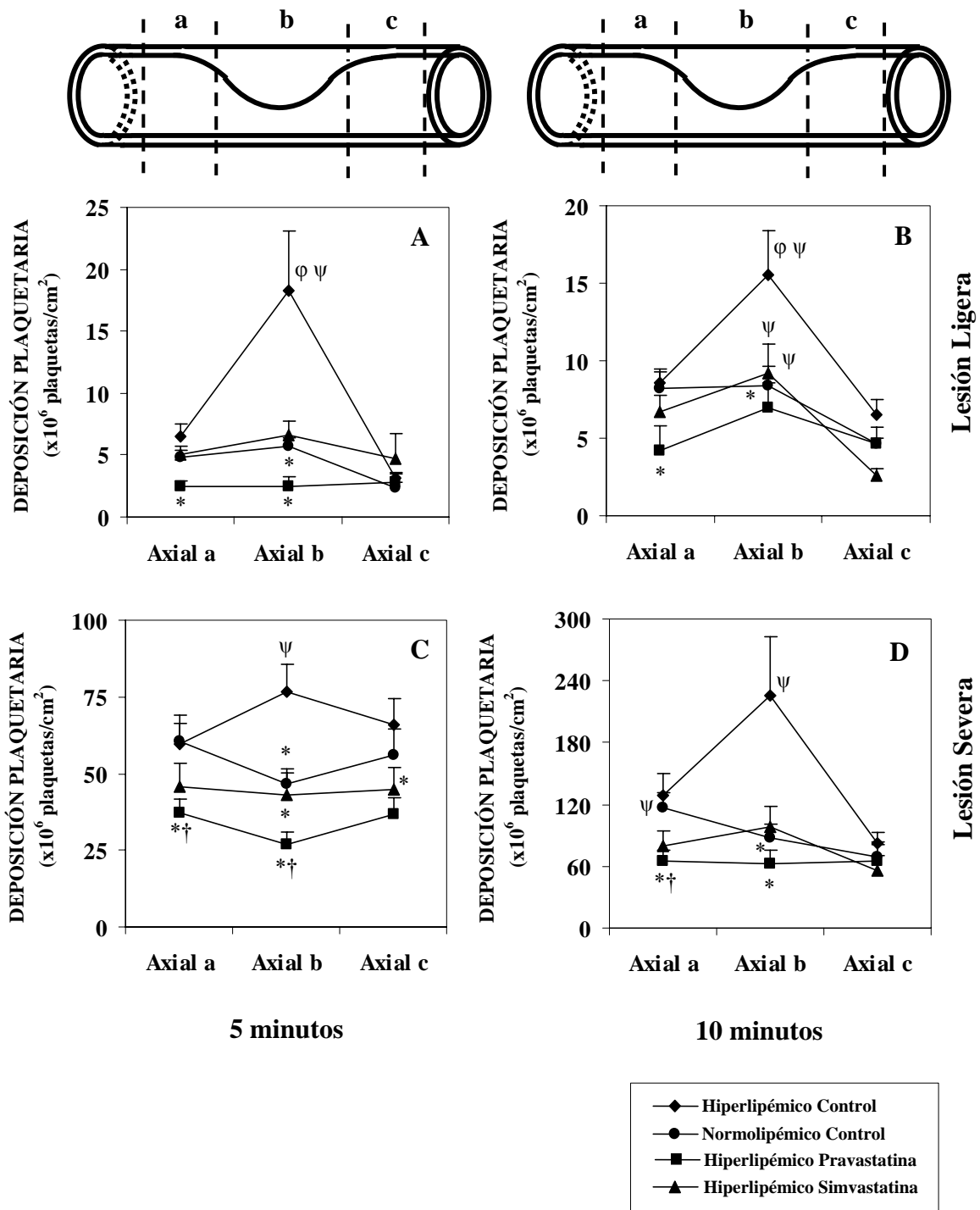


Figura 40. Deposición plaquetar axial sobre pared vascular con lesión ligera (A, B) y severa (C, D), en condiciones de velocidad de cizalladura variable con estenosis durante 5 (A, C) y 10 minutos (B, D), en los grupos de tratamiento. * $p < 0,05$ vs. HC, † $p < 0,05$ vs. NC, ϕ $p < 0,05$ vs. segmento a, ψ $p < 0,05$ vs. segmento c.

Correlación entre los Lípidos Plasmáticos y la Deposición Plaquetaria

Se llevó a cabo un análisis de regresión entre los parámetros lipídicos y la deposición plaquetaria para ver si existía alguna relación entre los niveles plasmáticos de lípidos y trombosis. No se halló ninguna correlación entre ambos factores en ninguna de las condiciones evaluadas (Tabla 20 y 21).

Condiciones	Subendotelio 5 min 1700 s ⁻¹		Subendotelio 10 min 1700 s ⁻¹		Túnica Media 5 min 1700 s ⁻¹		Túnica Media 10 min 1700 s ⁻¹	
	r ²	p	r ²	p	r ²	p	r ²	p
PARÁMETRO								
Colesterol Total (mg/dl)	0,00002	0,97	0,01	0,32	0,01	0,41	0,01	0,3
Colesterol HDL (mg/dl)	0,01	0,48	0,05	0,054	0,004	0,53	0,001	0,76
Colesterol LDL (mg/dl)	0,004	0,56	0,02	0,22	0,0005	0,51	0,01	0,46
Colesterol VLDL (mg/dl)	0,02	0,17	0,0004	0,58	0,03	0,1	0,04	0,05
Triglicéridos	0,02	0,19	0,002	0,7	0,003	0,56	0,02	0,19

Tabla 20. Correlación (r^2) entre lípidos plasmáticos y deposición plaquetar a alta velocidad de cizalladura (1700 s⁻¹) en los dos tipos de sustratos desencadenantes y tiempos de perfusión evaluados.

Condiciones	Subendotelio 5 min Estenosis		Subendotelio 10 min Estenosis		Túnica Media 5 min Estenosis		Túnica Media 10 min Estenosis	
	r ²	p	r ²	p	r ²	p	r ²	p
PARÁMETRO								
Colesterol Total (mg/dl)	0,02	0,22	0,01	0,39	0,01	0,37	0,0008	0,77
Colesterol HDL (mg/dl)	0,02	0,22	0,01	0,31	0,003	0,58	0,01	0,34
Colesterol LDL (mg/dl)	0,04	0,07	0,01	0,5	0,01	0,46	0,003	0,64
Colesterol VLDL (mg/dl)	0,003	0,64	0,02	0,25	0,02	0,16	0,003	0,57
Triglicéridos (mg/dl)	0,05	0,05	0,03	0,1	0,004	0,53	0,0006	0,8

Tabla 21. Correlación (r^2) entre lípidos plasmáticos y deposición plaquetar en condiciones de flujo con estenosis en los dos tipos de sustratos desencadenantes y tiempos de perfusión evaluados.

Composición del Trombo

Sobre lesión ligera, en las dos condiciones de flujo estudiadas, se observó una monocapa de plaquetas adherida a la superficie vascular sin prácticamente presencia de fibrina (Figura 41). En cambio, sobre lesión severa se observó la presencia de una capa de fibrina sobre la cual se depositaron las plaquetas formando agregados (Figura 42). Cualitativamente la composición del trombo formado sobre lesión ligera y severa no se vio significativamente afectada por la hiperlipemia ni por el tratamiento con fármacos.

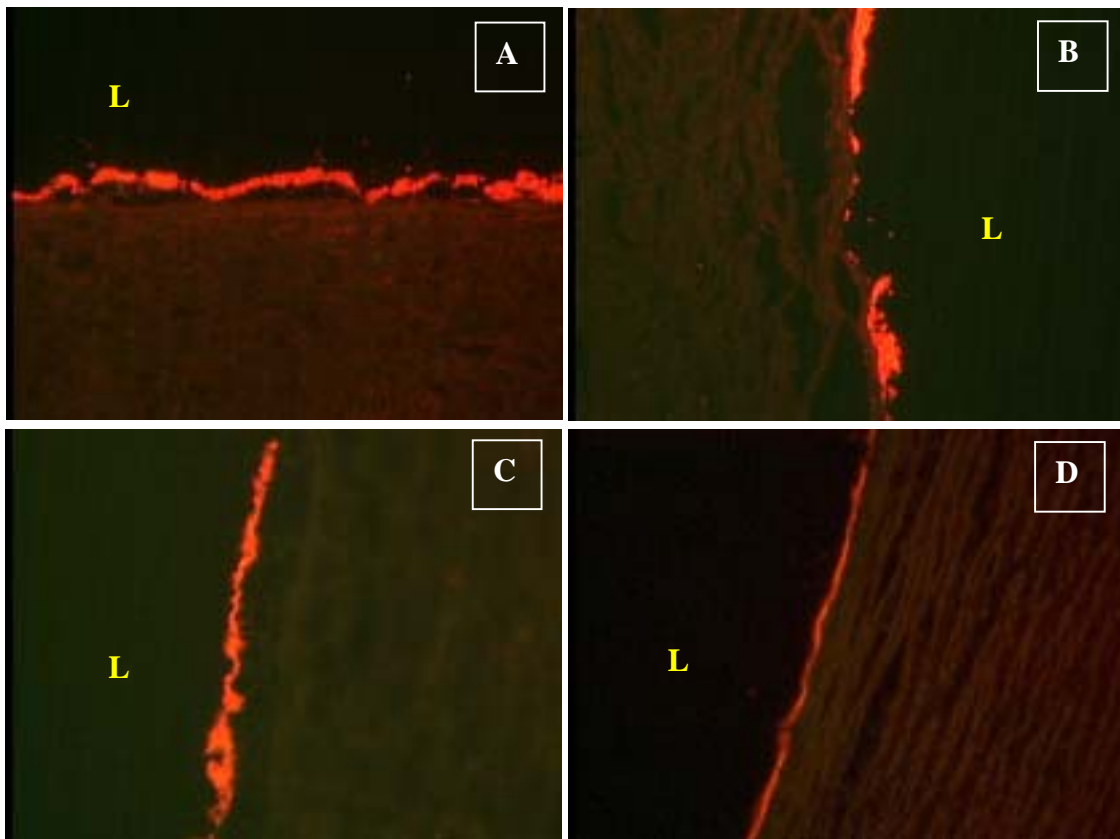


Figura 41. Micrografías del trombo formado sobre pared vascular con lesión ligera al perfundir en condiciones de alta velocidad de cizalladura (1700 s^{-1}) y flujo laminar paralelo (A, B), y de estenosis y flujo laminar no paralelo (zona con velocidad de cizalladura máxima, ápex) (C, D) en el grupo hiperlipémico control (A, C) y en el grupo tratado con pravastatina (B) y en el grupo tratado con simvastatina (D). Las plaquetas aparecen teñidas en rojo ($\times 200$ aumentos). L, indica luz vascular.

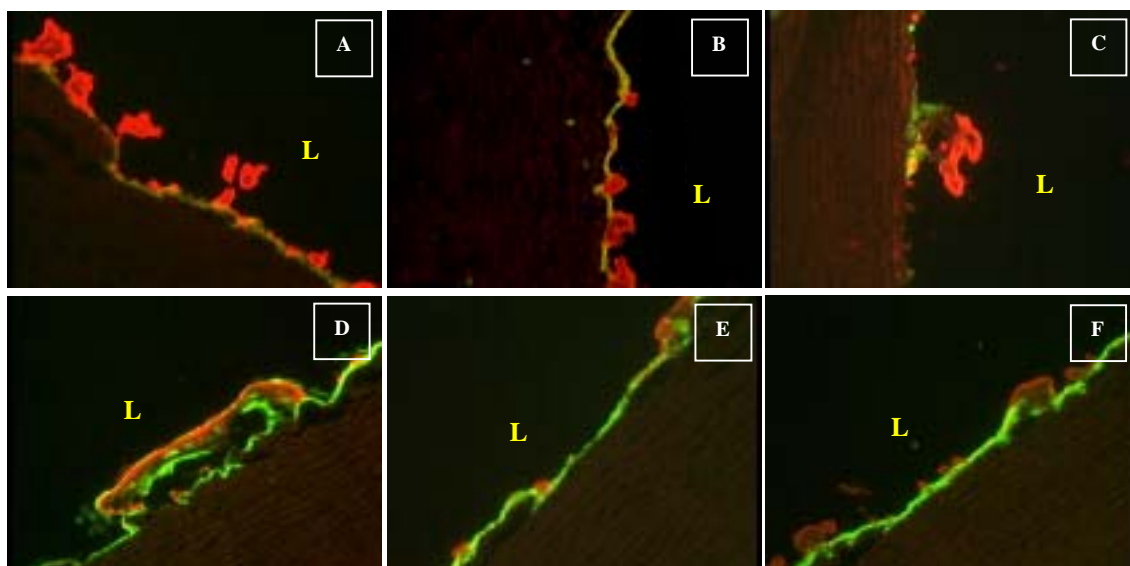


Figura 42. Micrografías del trombo formado sobre pared vascular con lesión severa al perfundir en condiciones de alta velocidad de cizalladura (1700 s^{-1}) y flujo laminar paralelo (A, B, C), de estenosis y flujo laminar no paralelo (zona con velocidad de cizalladura máxima, ápex) (D, E, F) en el grupo hiperlipémico control (A, D), en el grupo tratado con pravastatina (B, E) y en el grupo tratado con simvastatina (C, F). Las plaquetas aparecen teñidas en rojo y la fibrina en verde (x200 aumentos). L, indica luz vascular.

Análisis de la Plaqueta: Expresión de Rho A Plaquetario

Ya que la proteína Rho A parece estar implicada en la funcionalidad plaquetaria y podría estar afectada por el tratamiento con estatinas, mediante Western blot se determinó su contenido en la fracción de membrana (Rho A activo) de las plaquetas procedentes de los cuatro grupos de animales.

La Figura 43A muestra las bandas de proteína en cada grupo. La cuantificación por densitometría mostró que la cantidad de Rho A de la fracción de membrana fue significativamente menor en los grupos tratados con pravastatina (75%) y simvastatina (53%) ($p < 0,05$) respecto al grupo hiperlipémico control (Figura 43B). Este grupo tenía los niveles de Rho A de membrana incrementados respecto al grupo normolipémico control (38%), aunque esta diferencia no fue significativa.

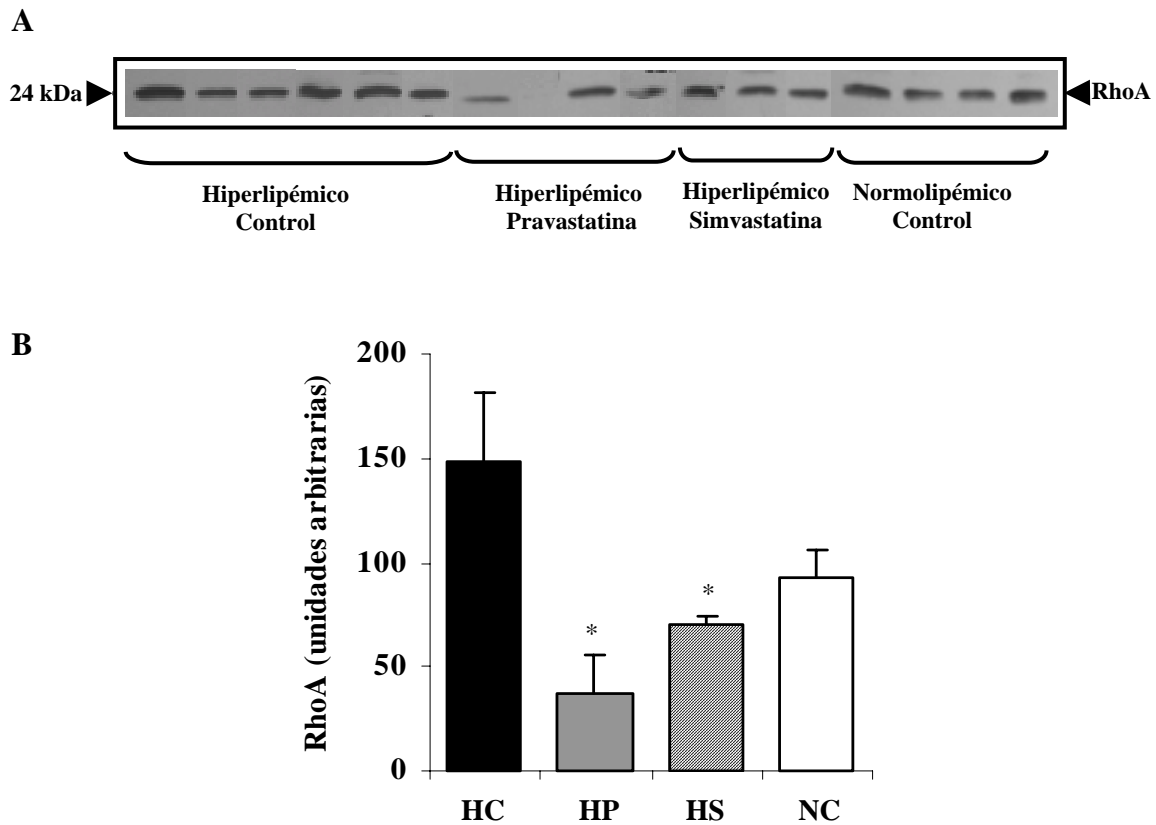


Figura 43. Western blot (A) y cuantificación (B) de la proteína Rho A en la fracción de membrana plaquetaria en los cuatro grupos de tratamiento (HC, n=6; NC, n=4; HP 5 mg/kg/día, n=4; HS 5 mg/kg/día, n=3). * $p < 0,05$ vs. grupo HC.

Lesiones Vasculares

Para estandarizar el modelo experimental, se evaluó el grado de lesión en todos los grupos de ensayo. Al finalizar el periodo de 100 días de tratamiento y dieta se analizaron las lesiones formadas en la aorta y coronarias mediante diversas técnicas histológicas.

Extensión de la Lesión

El estudio macroscópico de las lesiones se realizó en segmentos de la aorta torácica y abdominal (siempre de la misma zona) en un subgrupo de animales escogidos aleatoriamente. Los segmentos fijados se tiñeron con solución de Herxheimer,

quedando la lesión teñida de color rojo. La extensión de la lesión se cuantificó como porcentaje de área teñida de rojo respecto al área total del segmento.

La Figura 44 muestra los segmentos de aorta tras la tinción. Los segmentos de aorta torácica procedentes de animales hiperlipémicos, prácticamente no tenían lesión, además, macroscópicamente, ésta tenía aspecto de estar en una etapa muy inicial ya que no se apreciaba un aumento del grosor de la íntima y se limitaba a una infiltración de lípidos en la pared vascular. Por otro lado, se apreció que en los segmentos de aorta abdominal de los animales hiperlipémicos, la lesión era más extensa y de mayor grosor (lesión más avanzada) que en los segmentos de aorta torácica. En el grupo normolipémico control no se hallaron lesiones en ningún caso.

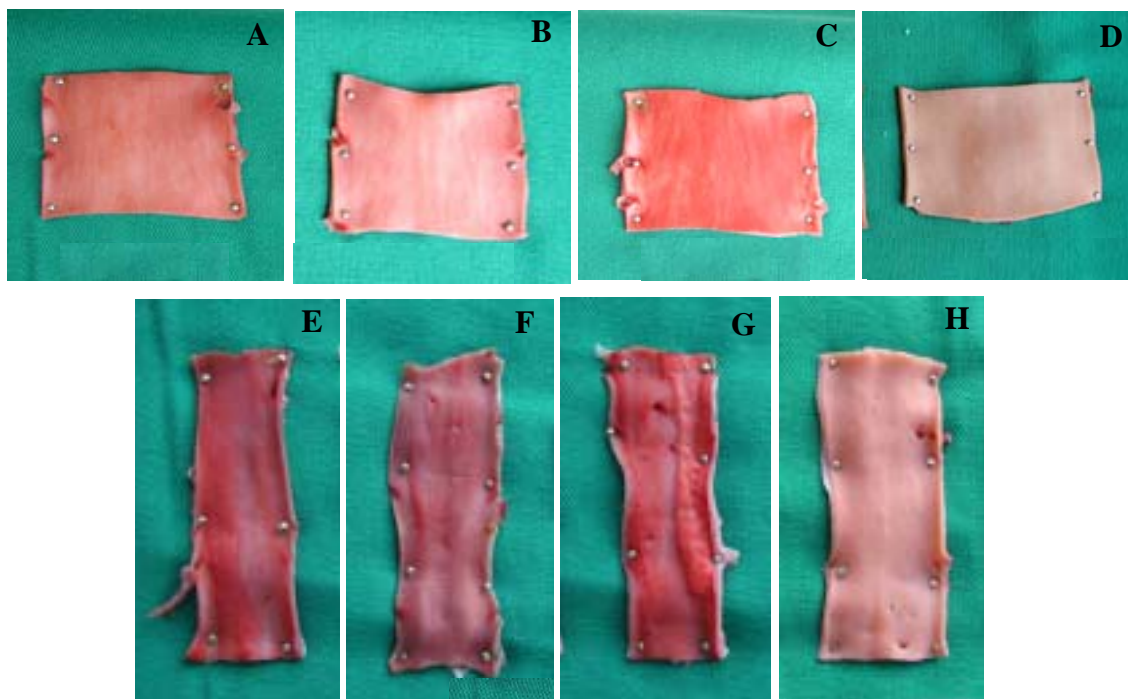


Figura 44. Fotografías de segmentos de aorta torácica (A-D) y abdominal procedentes del grupo hiperlipémico control (A, E), pravastatina (B, F), simvastatina (C, G) y normolipémico control (D, H). La presencia de lesión se detecta porque queda teñida en rojo.

Engrosamiento de la Capa Íntima Aórtica y Coronaria

El engrosamiento de la íntima se evaluó en muestras de aorta torácica abdominal (zona próxima a la bifurcación de las arterias ilíacas) y de coronaria izquierda descendente (LAD, zona proximal) teñidas por el método de Tricrómico de Mason. En la Figura 45 y 46 se muestran cortes representativos de cada grupo de tratamiento de la LAD y aorta abdominal, respectivamente. La dieta hiperlipémica indujo la formación de lesiones ateroscleróticas moderadas en las dos arterias evaluadas. Se cuantificó la luz vascular, así como las áreas limitadas por la elástica externa y la elástica interna. Con estas medidas se calculó el área de la íntima y de la túnica media, y a partir de estas áreas, se determinó el tamaño de la lesión aterosclerótica definido por el engrosamiento de la capa íntima ($\text{área íntima}/\text{área media}$) y el % de estenosis vascular ($100 \times \text{área íntima}/(\text{área íntima} + \text{área luz vascular})$).

La dieta hiperlipémica, con o sin tratamiento con estatinas, no modificó el grosor de la capa media en la aorta abdominal (los datos no se muestran). En cambio en la LAD sí se obtuvieron grosores variables de la capa media, que se debieron a que el segmento analizado estaba muy próximo a la bifurcación con el cayado aórtico, donde el diámetro del vaso es muy variable. El tamaño de la capa íntima de aorta abdominal estaba incrementado en los animales hiperlipémicos y no se observó que las estatinas indujesen una reducción de su tamaño (los datos no se muestran). Al realizar los cálculos de engrosamiento de la capa íntima y porcentaje de estenosis, se obtuvieron resultados similares entre grupos hiperlipémicos (Figura 47). En la LAD tampoco se encontraron diferencias significativas entre grupos respecto al área de la capa íntima (los datos no se muestran), al engrosamiento de la capa íntima y al porcentaje de estenosis (Figura 47), además se observó que los animales normolipémicos presentaban una lesión de tamaño similar a la de los grupos hiperlipémicos (Figura 47).

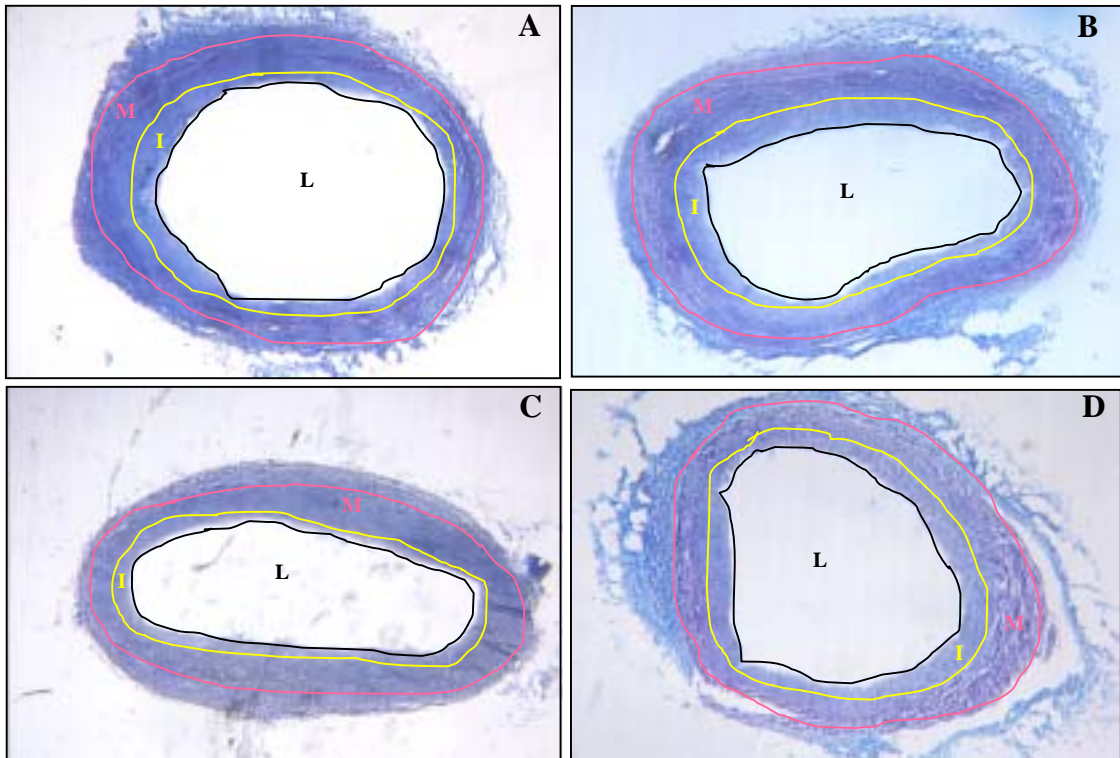


Figura 45. Coronaria izquierda descendente (LAD) de cerdos de los grupos hiperlipémico control (A), hiperlipémico pravastatina (B), hiperlipémico simvastatina (C), y normolipémico control (D). L, indica luz arterial; I, íntima; y M, túnica media.

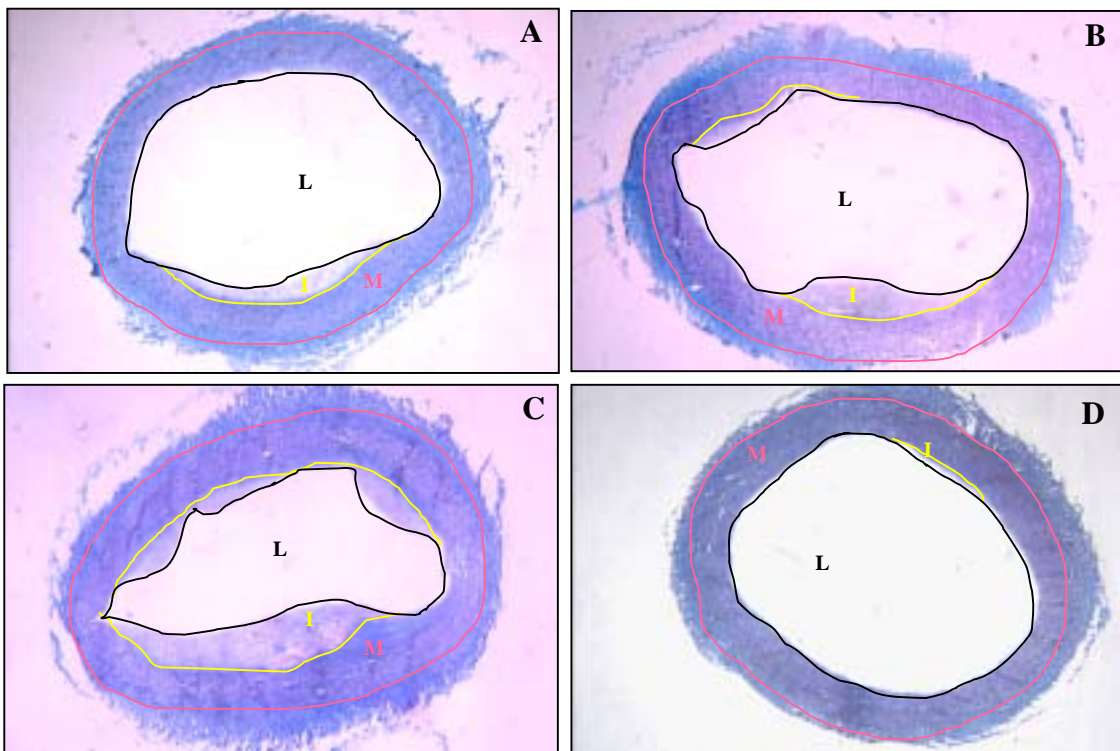


Figura 46. Aorta abdominal de cerdos de los grupos hiperlipémico control (A), hiperlipémico pravastatina (B), hiperlipémico simvastatina (C), y normolipémico control (D). L, indica luz arterial; I, íntima; y M, túnica media.

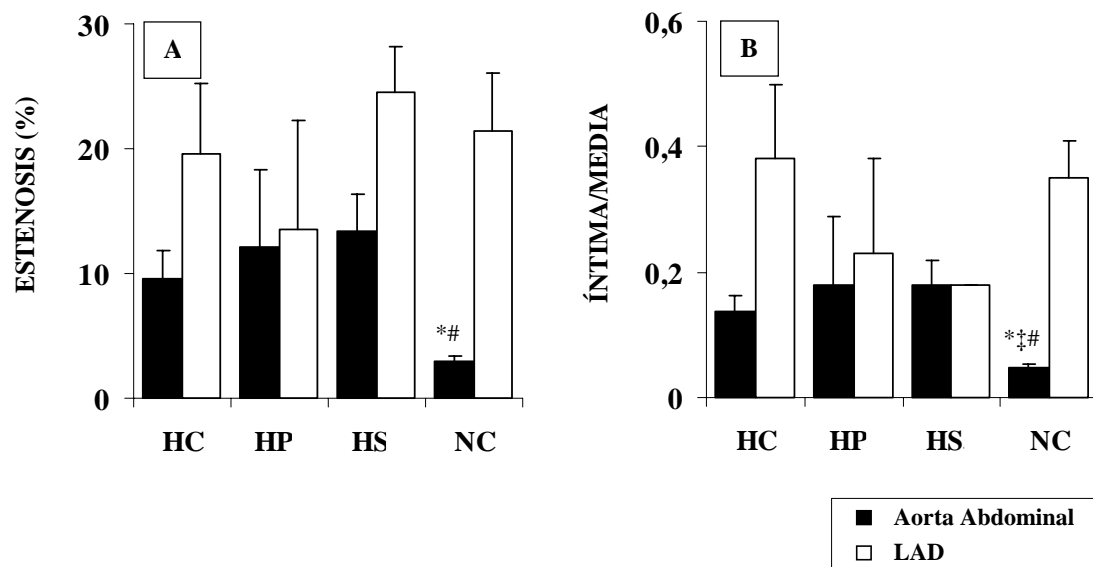


Figura 47. Porcentaje de estenosis vascular (A) y engrosamiento de la capa íntima (B) en aorta abdominal y LAD procedentes de cerdos de los diferentes grupos de tratamiento (HC, n=6; HP, n=4; HS, n=3 NC, n=4); * p<0,05 vs. HC, ‡ p<0,05 vs. HP, y # p<0,05 vs. HS.

Correlación entre los Lípidos Plasmáticos y el Tamaño de la Lesión Arterial

Se realizó el análisis de correlación estadístico para determinar si existía una relación entre los niveles de lípidos plasmáticos y los parámetros que determinan el tamaño de la lesión (engrosamiento de la capa íntima y % de estenosis).

En la Tabla 22 se muestran los resultados de este análisis en la aorta abdominal, al incluir todos los grupos hiperlipémicos. Los niveles de colesterol total, colesterol HDL y colesterol LDL (AUC) se correlacionaron significativamente y de manera positiva con el porcentaje de estenosis de la lesión y engrosamiento de la capa íntima de la aorta abdominal. Al realizar el análisis en la LAD no se halló correlación en ningún caso (los datos no se muestran).

Parámetro Lesión	Aorta Abdominal			
	% Estenosis Vascular		Engrosamiento Capa Íntima	
Parámetro Lipídico	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
AUC Colesterol Total (día x mg/dl)	0,76	0,008	0,67	0,02
AUC Colesterol HDL (día x mg/dl)	0,66	0,02	0,58	0,04
AUC Colesterol LDL (día x mg/dl)	0,64	0,03	0,61	0,03
AUC Colesterol VLDL (día x mg/dl)	0,51	0,08	0,45	0,12

Tabla 22. Correlación (*r*) entre lípidos plasmáticos (AUC) y % de estenosis y engrosamiento de la capa íntima de la aorta abdominal incluyendo todos los grupos hiperlipémicos (n=13).

Composición de la Lesión

Mediante técnicas de inmunohistoquímica e histología convencional se estudió la composición de las lesiones ateroscleróticas presentes en aorta abdominal y LAD. Se determinó el contenido en lípidos, fibrinógeno, CML, macrófagos y TF. El contenido de cada marcador estudiado se expresó como: a) cantidad de marcador dentro de la lesión (íntima), que se obtuvo al normalizar el área teñida respecto al área de la capa íntima y da una idea de la cantidad relativa, b) área total ocupada por marcador en la lesión (mm²), para obtener la cantidad total de marcador en todo el vaso, y finalmente, debido a que el tamaño de los vasos fue muy variable en la LAD, c) el área total ocupada por el marcador se normalizó por el área de la media, cuyo tamaño no se modificó por la dieta o el tratamiento, para obtener la composición relativa al vaso.

Contenido Lipídico de la Lesión

Los cortes histológicos se tiñeron con tinción oro y posteriormente se cuantificó el contenido en lípido (color rojo). La dieta hiperlipémica indujo infiltración de lípido en la capa íntima de la LAD (Figura 48) y de la aorta abdominal.

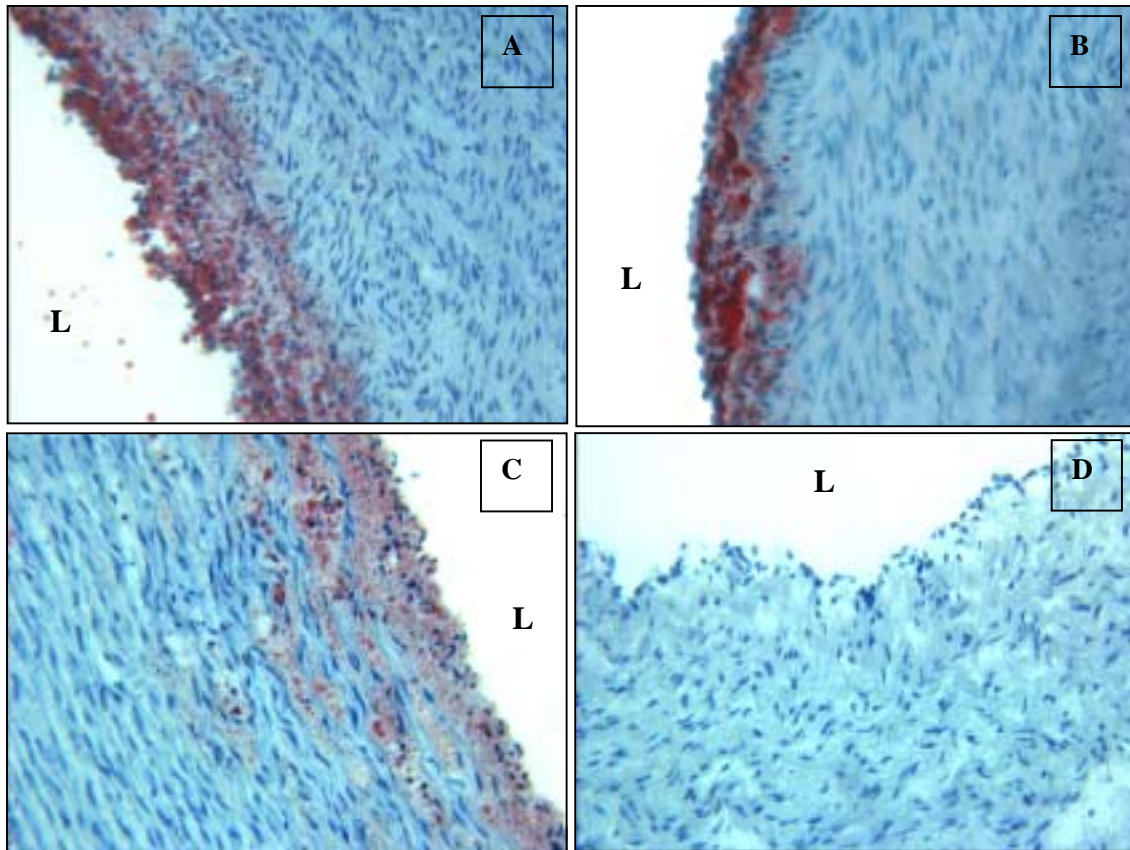


Figura 48. Microfotografías representativas de LAD de cerdos de los grupos hiperlipémico control (A), hiperlipémico pravastatina (B), hiperlipémico simvastatina (C), y normolipémico control (D) teñidos con tinción oro. El lípido infiltrado en la íntima aparece de color rojo (x200 aumentos). L, indica luz vascular; I, íntima.

La cuantificación del contenido lipídico se muestra en la Figura 49. Ninguna de las dos estatinas utilizadas redujeron la proporción en la lesión o la cantidad total en el vaso de lípido en la aorta abdominal y LAD, aunque se observó una ligera reducción en la LAD expresado como área ocupada por lípido normalizada por el área de la media (Figura 49D). En todos los grupos la proporción de lípido en la lesión fue superior en la aorta abdominal respecto a la LAD (Figuras 49A y 49B).

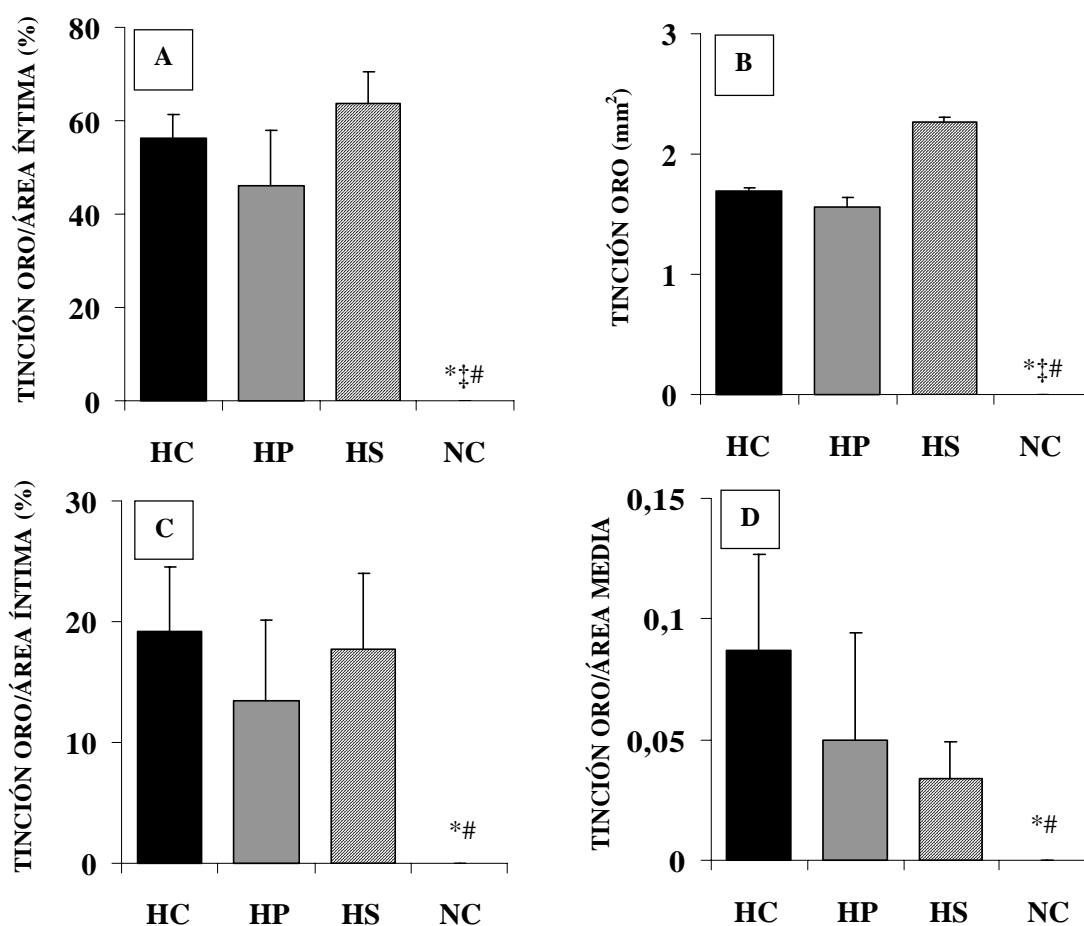


Figura 49. Contenido lipídico (tinción Oro) de la lesión respecto a la superficie de la íntima (A, C), como área total (B), y respecto al área de la media (D) en aorta abdominal (A, B) y LAD (C, D) procedentes de los cerdos de los diferentes grupos de tratamiento (HC, n=6; HP, n=4; HS, n=3; NC, n=4). * p < 0,05 NC vs. HC, ‡ p < 0,05 NC vs. HP, y # p < 0,05 NC vs. HS.

Componentes de la Lesión Vascular

Mediante técnicas inmunohistoquímica se analizó el contenido de fibrinógeno, CML, macrófagos y TF de la lesión. Se observó que las lesiones formadas en la aorta abdominal y la LAD en los animales hiperlipémicos, tenían un contenido importante de CML y fibrinógeno (Figura 50 y 51), y en menor medida de macrófagos (Figura 52 y 53). En algunas lesiones también se pudo apreciar presencia de TF (Figura 54). En la túnica media también se observó un ligero marcaje de TF (Figura 54). El estudio cualitativo de los cortes mostró que no había diferencias en la composición de la lesión entre los grupos hiperlipémicos. En los animales normolipémicos las zonas de la íntima

ligeramente engrosadas se componían básicamente de CML y en algunos casos se observó infiltración de fibrinógeno (Figura 51D).

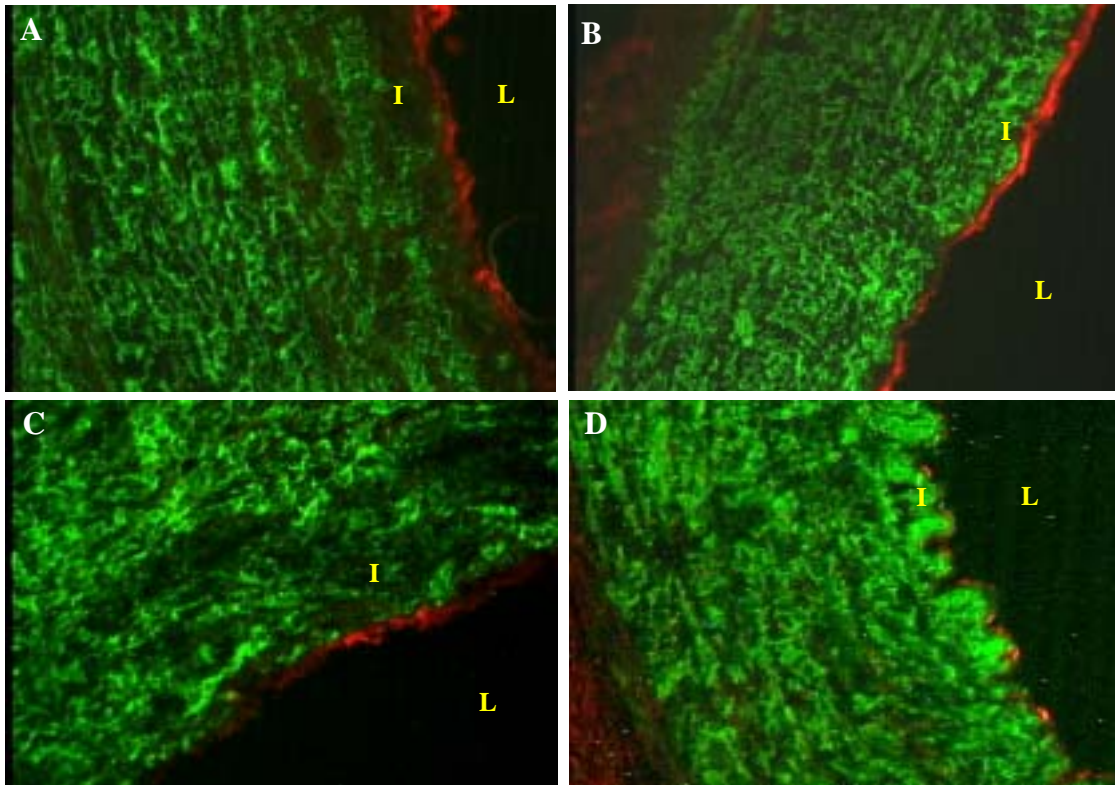


Figura 50. Microfotografías representativas de LAD de cerdos de los grupos hiperlipémico control (A), hiperlipémico pravastatina (B), hiperlipémico simvastatina (C), y normolipémico control (D); en las que se observa la presencia de fibrinógeno (rojo) y CML (verde) (x200). L, indica luz arterial; I, íntima.

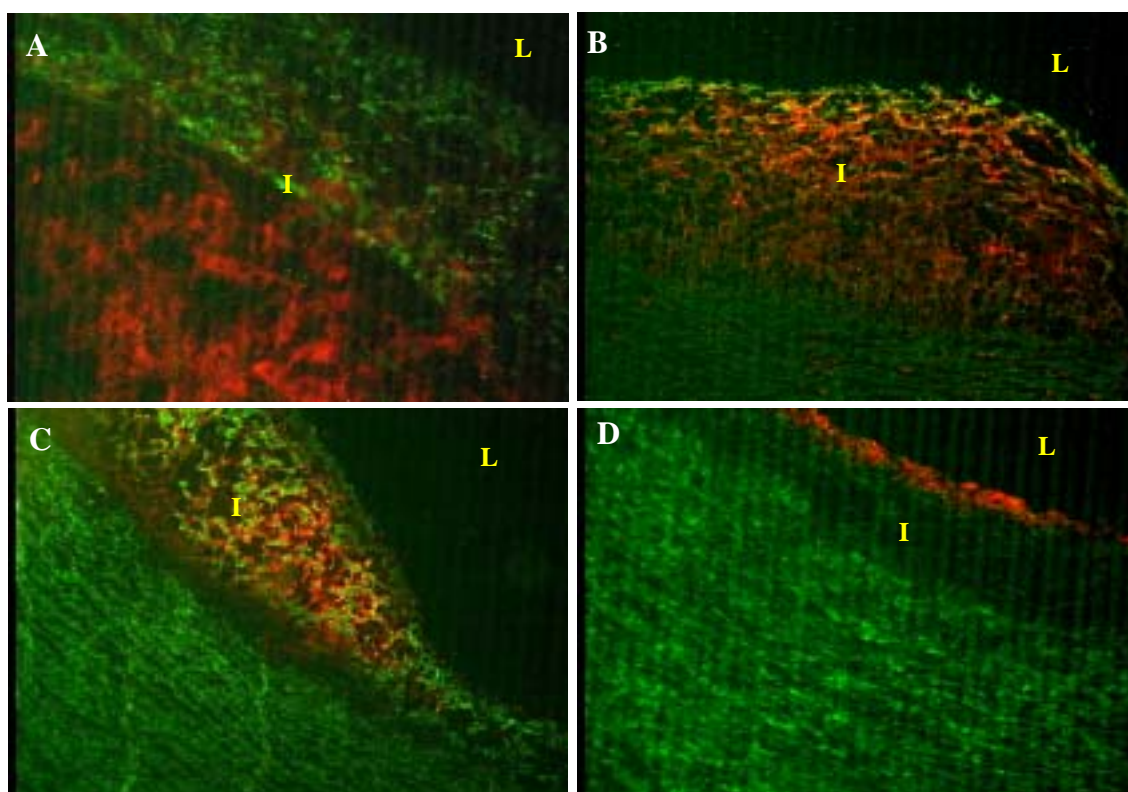


Figura 51. Microfotografías representativas de aorta abdominal de cerdos de los grupos hiperlipémico control (A), hiperlipémico pravastatina (B), hiperlipémico simvastatina (C), y normolipémico control (D); en las que se observa la presencia de fibrinógeno (rojo) y CML (verde) (x100). L, indica luz arterial; I, íntima.

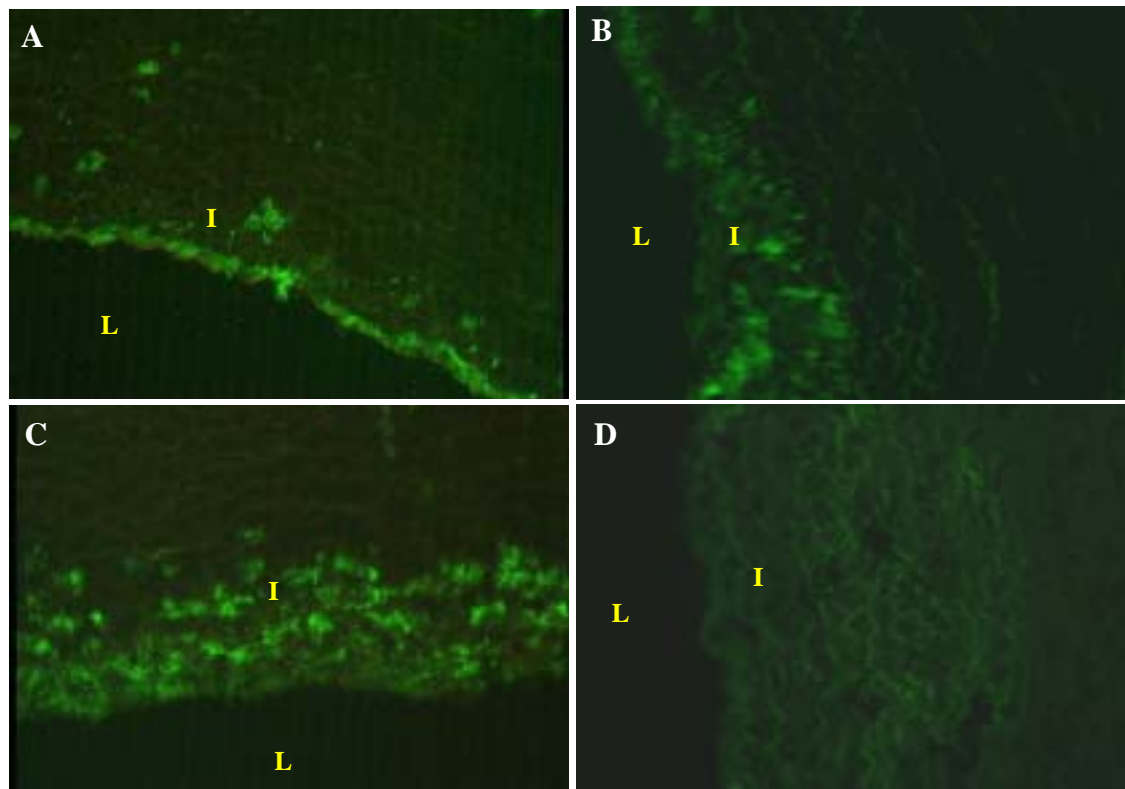


Figura 52. Microfotografías representativas de LAD de cerdos de los grupos hiperlipémico control (A), hiperlipémico pravastatina (B), hiperlipémico simvastatina (C), y normolipémico control (D); en las que se observa la presencia de macrófagos (verde) (x200). L, indica luz arterial; I, íntima.

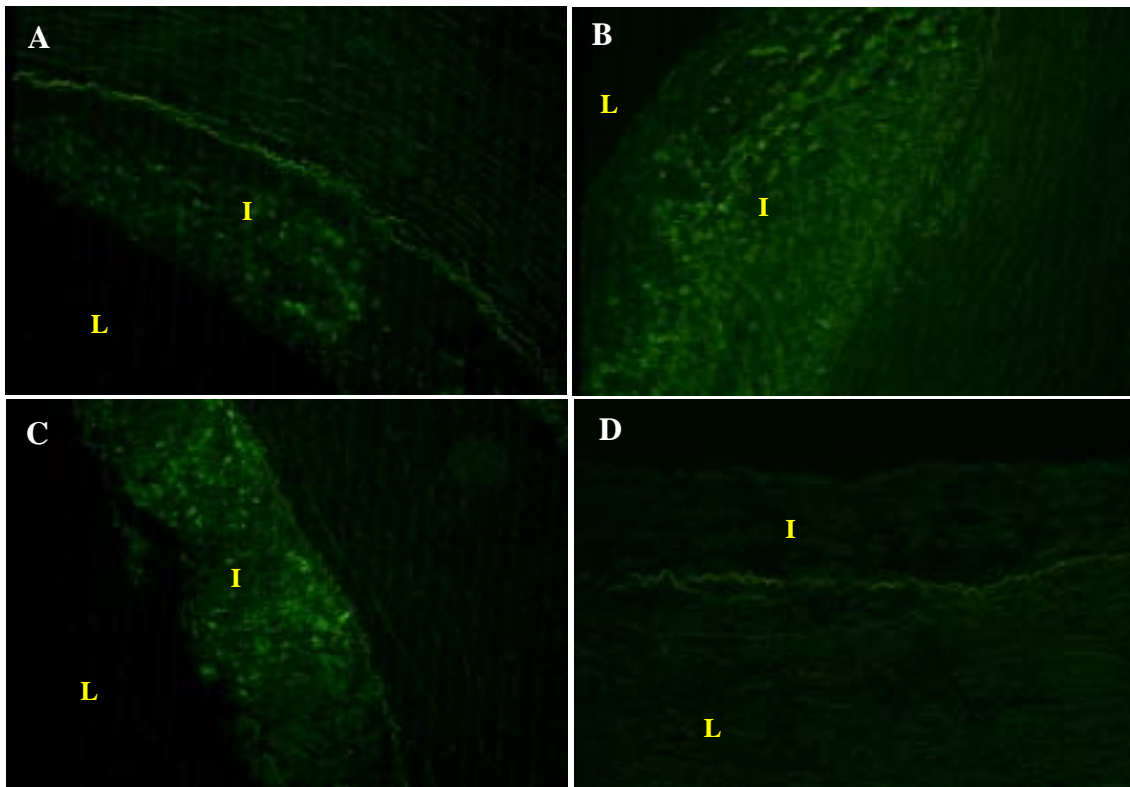


Figura 53. Microfotografías representativas de aorta abdominal de cerdos de los grupos hiperlipémico control (A), hiperlipémico pravastatina (B), hiperlipémico simvastatina (C), y normolipémico control (D); en las que se observa la presencia de macrófagos (verde) (x100). L, indica luz arterial; I, íntima.

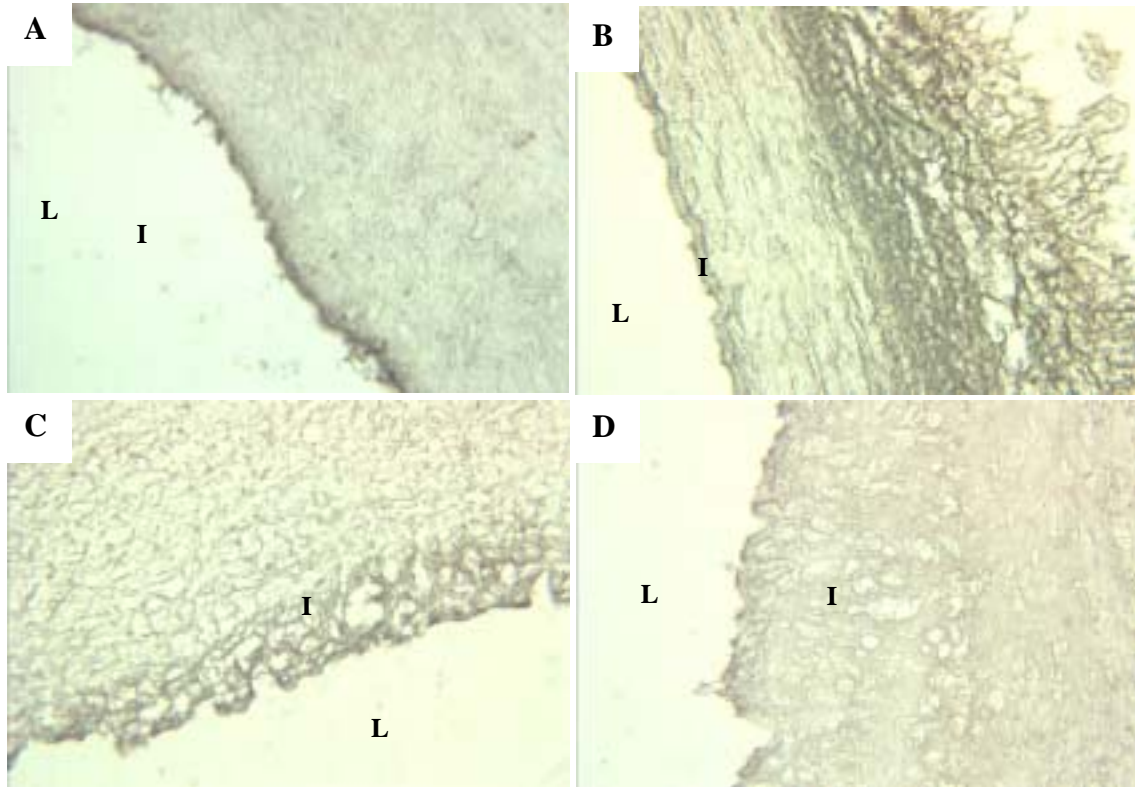


Figura 54. Microfotografías representativas de LAD de cerdos de los grupos hiperlipémico control (A), hiperlipémico pravastatina (B), hiperlipémico simvastatina (C), y normolipémico control (D); en las que se observa la presencia de TF (marrón) (x200). L, indica luz arterial; I, íntima.

El análisis semicuantitativo del marcaje obtenido para cada uno de los cuatro marcadores se realizó en la aorta abdominal y se muestra en la Figura 55. La cantidad relativa (área con tinción positiva/área íntima, Figura 55A) y absoluta (área con tinción positiva, Figura 55B) de CML no se modificó por el tratamiento con estatinas. Sin embargo, la proporción de fibrinógeno (Figura 55A) estaba significativamente reducida en el grupo tratado con pravastatina respecto al grupo tratado con simvastatina ($p < 0,05$), pero al expresarse como cantidad absoluta (Figura 55B) no se obtuvieron diferencias significativas. El contenido en macrófagos tampoco se redujo por el tratamiento farmacológico. Es más, en el grupo hiperlipémico control la proporción en la íntima (Figura 55A) y el área total ocupada por macrófagos (Figura 55B) en la lesión fue menor que los grupos tratados, de manera significativa respecto al grupo tratado con simvastatina ($p < 0,05$). En cuanto a la cuantificación de TF, el tratamiento con estatinas no redujo su expresión (Figura 55A y 55B). En la íntima de la aorta abdominal del grupo normolipémico control no se encontró prácticamente presencia de ningún marcador.

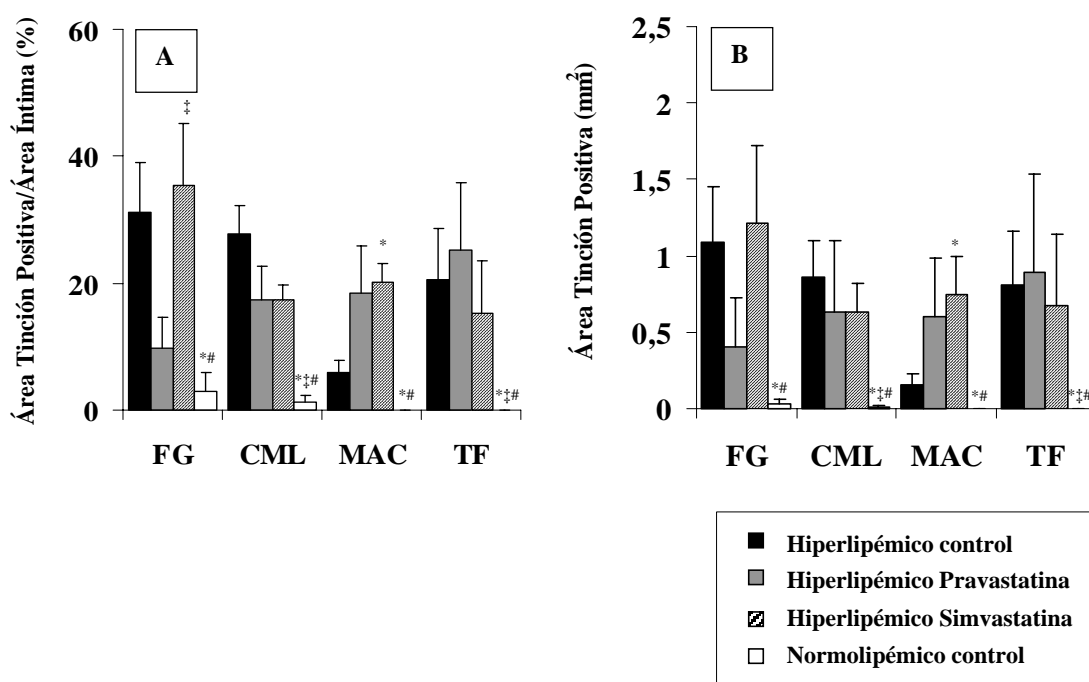


Figura 55. Contenido en fibrinógeno (FG), CML, macrófagos (MAC) y TF en la lesión respecto a la superficie de la íntima (A) y como área total (B) en aorta abdominal procedente de los cerdos de los diferentes grupos de tratamiento (HC, n=6; HP, n=4; HS, n=3; NC, n=4). * $p < 0,05$ vs. HC, ‡ $p < 0,05$ vs. HP, y # $p < 0,05$ vs. HS

Correlación entre los Lípidos Plasmáticos y la Composición de la Lesión Arterial

Se estudió si existía una relación entre los niveles de lípidos plasmáticos y los diferentes componentes de la lesión aterosclerótica de la aorta abdominal en animales hiperlipémicos. Los valores del coeficiente de correlación r fueron elevados y significativos o con tendencia a la significación, al relacionar el colesterol total y el colesterol LDL (AUC) con el área total del vaso ocupada por lípido, CML, macrófagos y TF (Tabla 23). El único marcador que no se correlacionó con los lípidos plasmáticos fue el fibrinógeno, aunque se halló una correlación prácticamente significativa con el colesterol HDL. Se obtuvieron resultados similares al analizar el contenido de la íntima expresado como porcentaje de marcador en la íntima (los datos no se muestran).

Marcador de la Lesión	Aorta Abdominal									
	Lípido		Fibrinógeno		CML		Macrófagos		TF	
	r	p	r	p	r	p	r	p	r	p
AUC Colesterol Total (día x mg/dl)	0,6	0,04	0,38	0,2	0,53	0,06	0,74	0,01	0,54	0,06
AUC Colesterol HDL (día x mg/dl)	0,51	0,08	0,55	0,05	0,49	0,09	0,36	0,22	0,36	0,21
AUC Colesterol LDL (día x mg/dl)	0,54	0,06	0,31	0,29	0,54	0,06	0,67	0,02	0,57	0,048
AUC Colesterol VLDL (día x mg/dl)	0,44	0,13	0,34	0,23	0,28	0,34	-0,1	0,72	0,28	0,34

Tabla 23. Correlación (r) entre lípidos plasmáticos (AUC) y el contenido en lípido, fibrinógeno, CML, macrófagos y TF de la íntima (área total con tinción positiva) en aorta abdominal incluyendo todos los grupos hiperlipémicos (n=13).

Correlación entre el Tamaño y la Composición de la Lesión Aórtica

Se estudió la relación que existía entre la cantidad de cada uno de los marcadores evaluados (área total con tinción positiva) y la extensión (%) y el grosor (% estenosis vascular y engrosamiento de la capa íntima) de la lesión de la aorta abdominal.

En los grupos hiperlipémicos todos los marcadores se correlacionaron muy significativamente y de manera positiva con el porcentaje de estenosis vascular y

engrosamiento de la capa íntima (Tabla 24). Se obtuvieron resultados similares al realizar el análisis de la cantidad de los cinco marcadores en la lesión expresada como porcentaje de tinción positiva en la íntima (los datos no se muestran).

Parámetro Tamaño Lesión	Aorta Abdominal			
	% Estenosis Vascular		Engrosamiento Capa Íntima	
Marcador de la Lesión	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Lípido	0,9	0,002	0,97	0,0008
Fibrinógeno	0,63	0,03	0,75	0,009
CML	0,78	0,008	0,58	0,04
Macrófagos	0,65	0,02	0,9	0,002
TF	0,78	0,007	0,86	0,003

Tabla 24. Correlación (*r*) entre los marcadores de la lesión (lípido, fibrinógeno, CML, macrófagos y TF) y el tamaño de la lesión (% estenosis y engrosamiento de la capa íntima) de la aorta abdominal, incluyendo todos los grupos hiperlipémicos (n=13).

Expresión Génica de MCP-1, eNOS y Cox (1 y 2) en la Pared Vascular

Se estudió la expresión de varios genes implicados en la evolución de la lesión aterosclerótica (MCP-1, eNOS, Cox-1 y Cox-2) en la aorta abdominal de los cerdos de los cuatro grupos de tratamiento. El análisis de la expresión de MCP-1 y de e-Nos se realizó mediante la técnica de RT-PCR semicuantitativa, y el de Cox-1 y Cox-2 mediante RT-PCR cuantitativa (tiempo real).

Expresión de MCP-1

En la Figura 56 se muestran las bandas de cDNA amplificado de GAPDH (265 pb) y MCP-1 (215 pb), así como los resultados de la cuantificación densitométrica de las bandas. Los grupos hiperlipémicos tenían la expresión de MCP-1 (ratio MCP-1/GAPDH) significativamente aumentada respecto al grupo normolipémico control ($p < 0,05$). El tratamiento con estatinas no modificó los niveles de este gen.

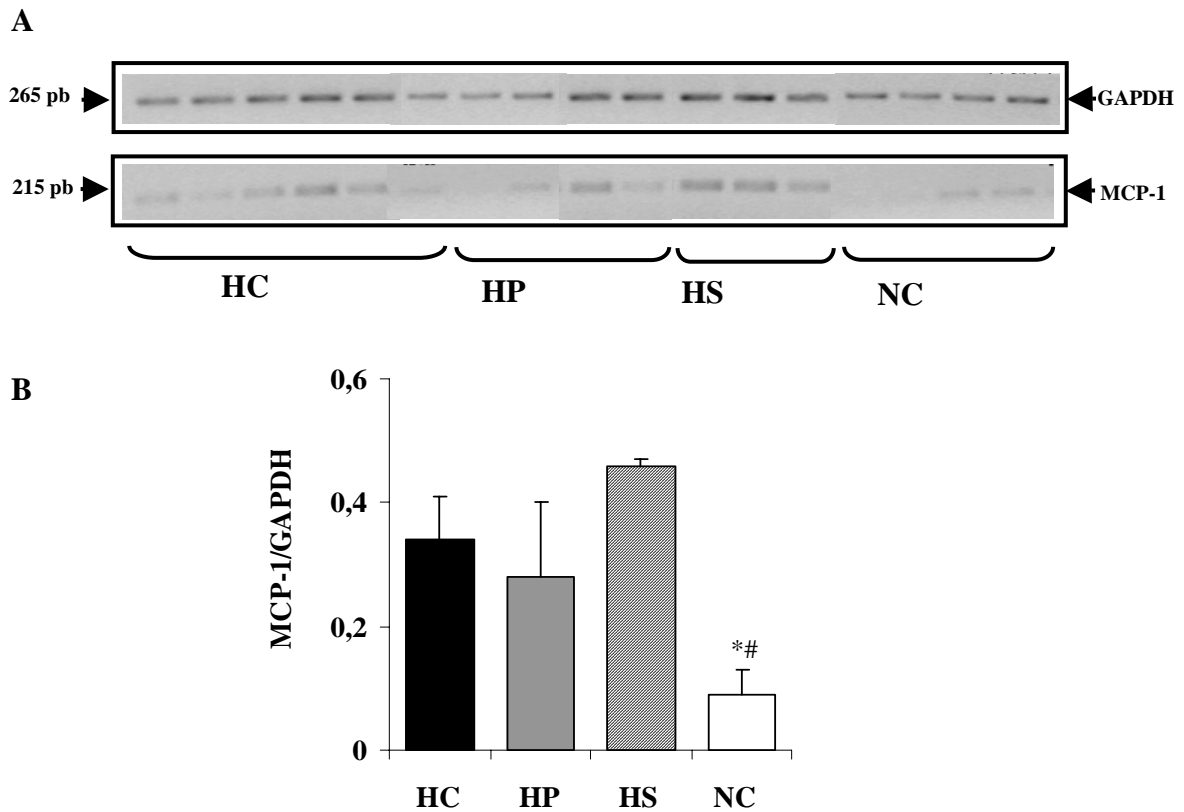


Figura 56. RT-PCR de MCP-1 y GAPDH (A) y cuantificación de MCP-1 (normalizado por GAPDH) (B) en la aorta abdominal procedente de los cerdos de los diferentes grupos de tratamiento (HC, n=6; HP, n=4; HS, n=3; NC, n=4). * $p < 0,05$ vs. HC y # $p < 0,05$ vs. HS.

Expresión de eNOS

El análisis de la expresión eNOS (889 pb) en aorta abdominal (Figura 57A) mostró que los niveles de este gen estaban significativamente reducidos en los grupos hiperlipémicos (Figura 57B), y que el grupo tratado con simvastatina presentaba mayor expresión de eNOS respecto al grupo hiperlipémico control ($p < 0,05$).

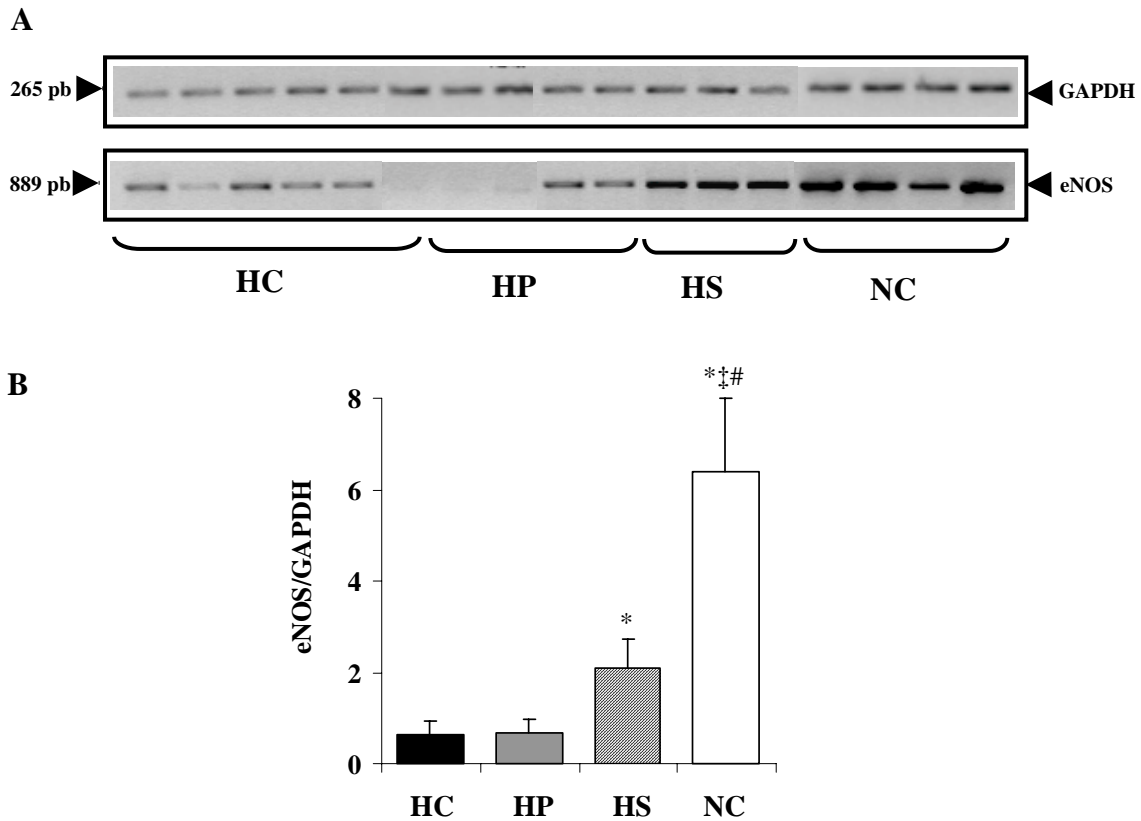


Figura 57. RT-PCR de eNOS y GAPDH (A) y cuantificación de eNOS (normalizado por GAPDH) (B) en la aorta abdominal procedente de los cerdos de los diferentes grupos de tratamiento (HC, n=6; HP, n=4; HS, n=3; NC, n=4). * $p < 0,05$ vs. HC, ‡ $p < 0,05$ vs. HP, y # $p < 0,05$ vs. HS.

Expresión de Cox-1 y Cox-2

El análisis de la expresión de Cox-1 y Cox-2 se realizó mediante RT-PCR (tiempo real) y los resultados obtenidos se normalizaron con los niveles del gen constitutivo RNA ribosomal 18S (rRNA 18S). La Figura 58 muestra el nivel de expresión de Cox-1 y Cox-2 en los diferentes grupos. Los niveles de Cox-1 estaban reducidos en los grupos hiperlipémicos, esta diferencia alcanzó la significación respecto al grupo tratado con pravastatina ($p < 0,05$). La expresión de Cox-2 fue ligeramente inferior en los grupos hiperlipémicos control y simvastatina, aunque esta reducción no fue significativa. El tratamiento con estatinas no modificó significativamente la expresión de Cox-1, ni de Cox-2.

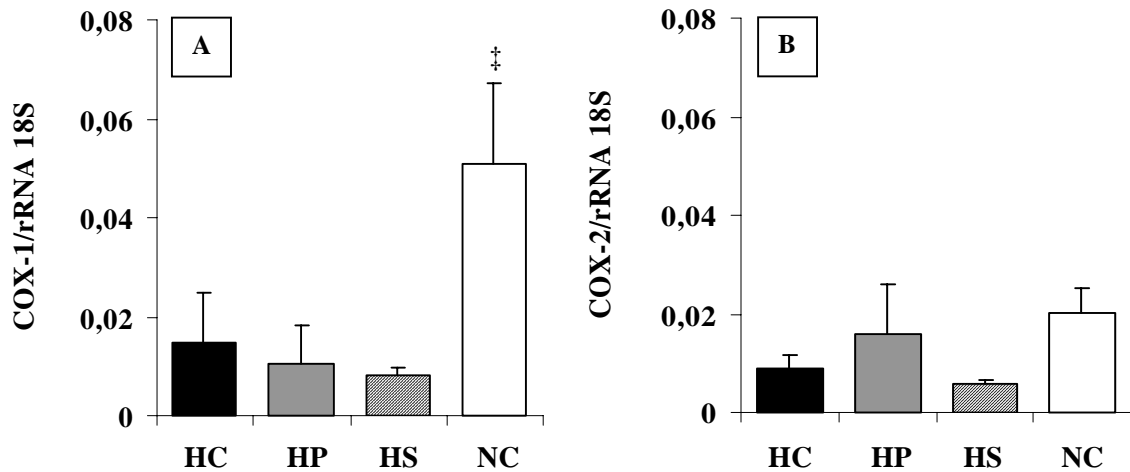


Figura 58. Cuantificación de la expresión de Cox-1 (A) y Cox-2 (B) (normalizada con rRNA 18S) en aorta abdominal procedente de los cerdos de los diferentes grupos de tratamiento (HC, n=6; HP, n=4; HS, n=3; NC, n=4). ‡ p<0,05 NC vs. HP.

TRATAMIENTO CON ESTATINAS DURANTE 100 DÍAS

Una serie de animales se trataron durante 100 días con estatinas después del periodo inicial de 50 días con dieta, para estudiar la evolución de la lesión.

A continuación se describe la serie de procedimientos realizados en el protocolo experimental con modelo porcino en el que se administró una dieta normolipémica (grupo normolipémico control, NC, n=4) o hiperlipémica durante 150 días, y estatinas (grupo pravastatina 5 mg/kg/día, HP, n=3; grupo simvastatina 2,5 mg/kg/día, HS, n=3) o placebo (grupo hiperlipémico control, HC, n=3) durante los últimos 100 días.

Evolución del Peso y de los Parámetros Hematológicos, Bioquímicos y de Coagulación

Las Figuras 59, 60, 61 y 62 muestran la evolución del peso y de los parámetros hematológicos, bioquímicos y de coagulación a lo largo de los 150 días.

Al igual que en los grupos tratados durante 50 días, el incremento de peso durante el periodo (Figura 59) fue similar en todos los grupos, y los parámetros hematológicos (Figura 60) y bioquímicos (Figura 61) se situaron dentro del rango de normalidad para la especie. La evolución de los parámetros de coagulación (Figura 62) también fue similar en los cuatro grupos y no alcanzaron valores fuera de la normalidad.

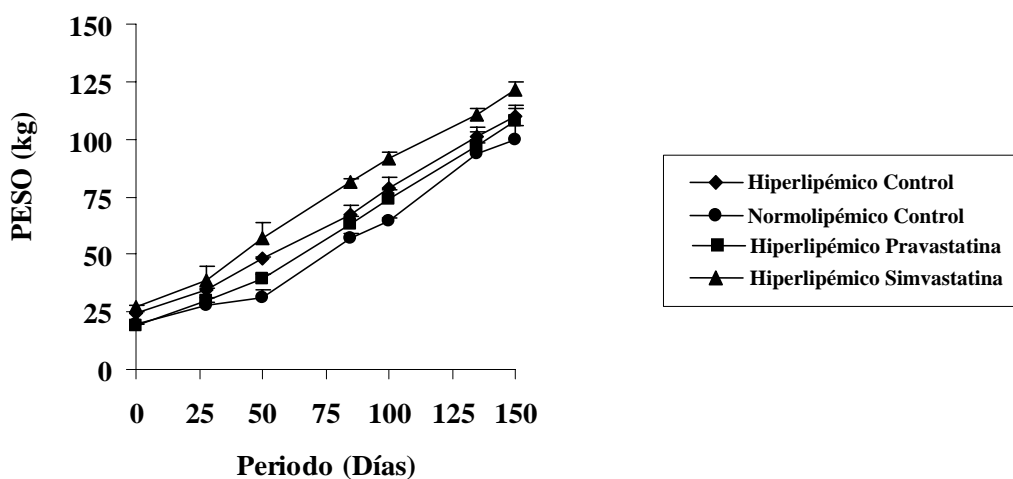


Figura 59. Seguimiento del peso de los animales a lo largo de los 150 días que duró el protocolo (HC, n=3; HP, n=3; HS, n=3; NC, n=4).

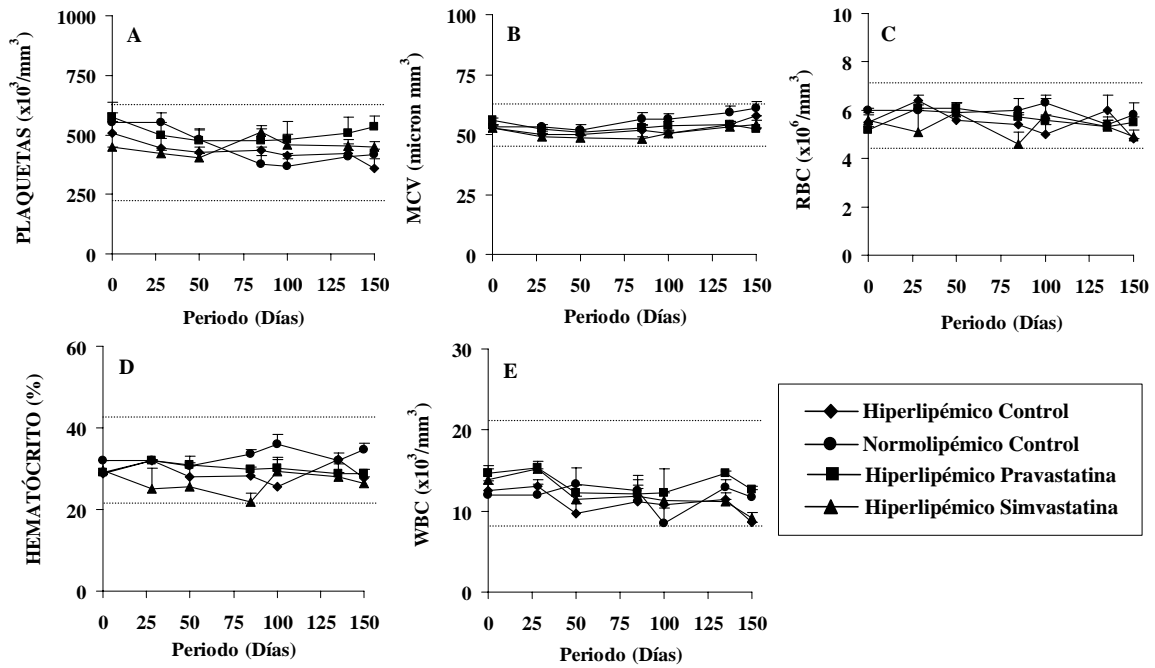


Figura 60. Seguimiento de los principales parámetros hematológicos a lo largo de los 150 días que duró el protocolo (HC, n=3; HP, n=3; HS, n=3; NC, n=4). Los intervalos de normalidad para cada parámetro aparecen delimitados por líneas punteadas.

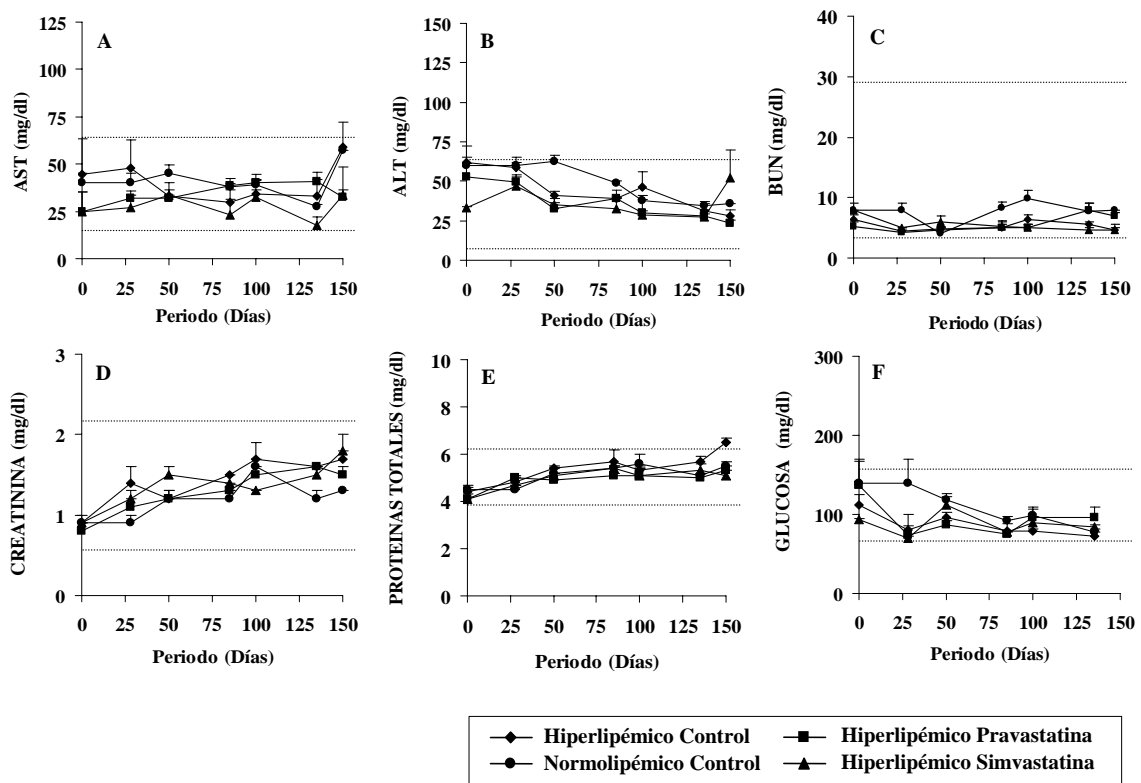


Figura 61. Seguimiento de los principales parámetros bioquímicos a lo largo de los 150 días que duró el protocolo (HC, n=3; NC, n=4; HP, n=3; HS, n=3). Los intervalos de normalidad para cada parámetro aparecen delimitados por líneas punteadas.

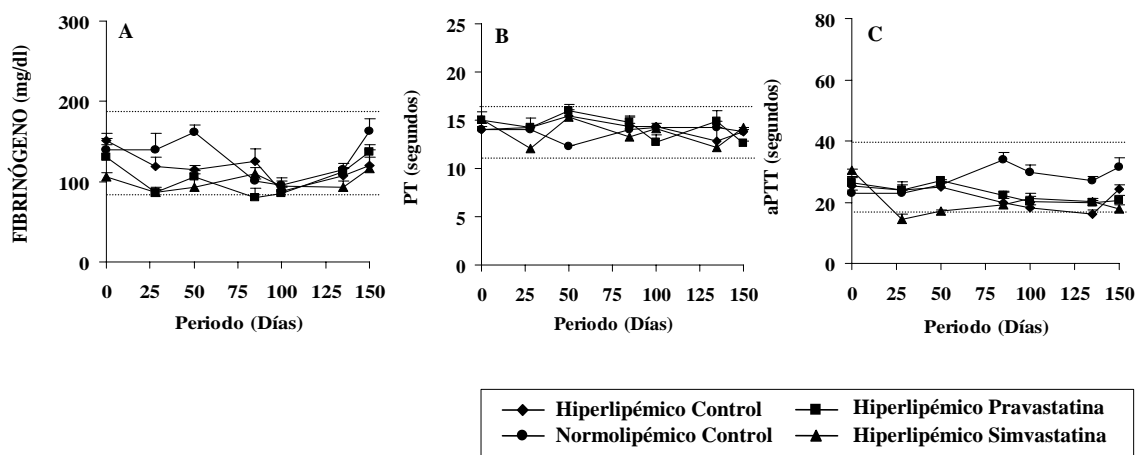


Figura 62. Seguimiento de los principales parámetros de coagulación a lo largo de los 150 días que duró el protocolo (HC, n=3; HP, n=3; HS, n=3; NC, n=4). Los intervalos de normalidad para cada parámetro aparecen delimitados por líneas punteadas.

Evolución de los Lípidos Plasmáticos

Colesterol Total y Triglicéridos

Los niveles de colesterol total (mg/dl, Figura 63A) se redujeron en el grupo tratado con pravastatina a partir del día 85. En el grupo tratado con simvastatina se observó también una reducción no significativa a partir del día 135 (Figura 63A). En el grupo hiperlipémico control, los niveles se mantuvieron estables entre los días 50 y 135, incrementándose ligeramente en la última etapa. Al final del periodo (día 150) los grupos tratados con pravastatina y simvastatina alcanzaron una reducción del 44% y 30% respecto al grupo normolipémico, y del 35% y 15% respecto al valor obtenido al inicio del tratamiento (día 50), respectivamente. Los valores de AUC de colesterol total (Figura 63B) también estaban ligeramente reducidos en los grupos tratados respecto al grupo hiperlipémico control, pero sin llegar a la significación.

Los valores de triglicéridos (mg/dl, Figura 63C; y AUC, Figura 63D) fueron similares en los cuatro grupos.

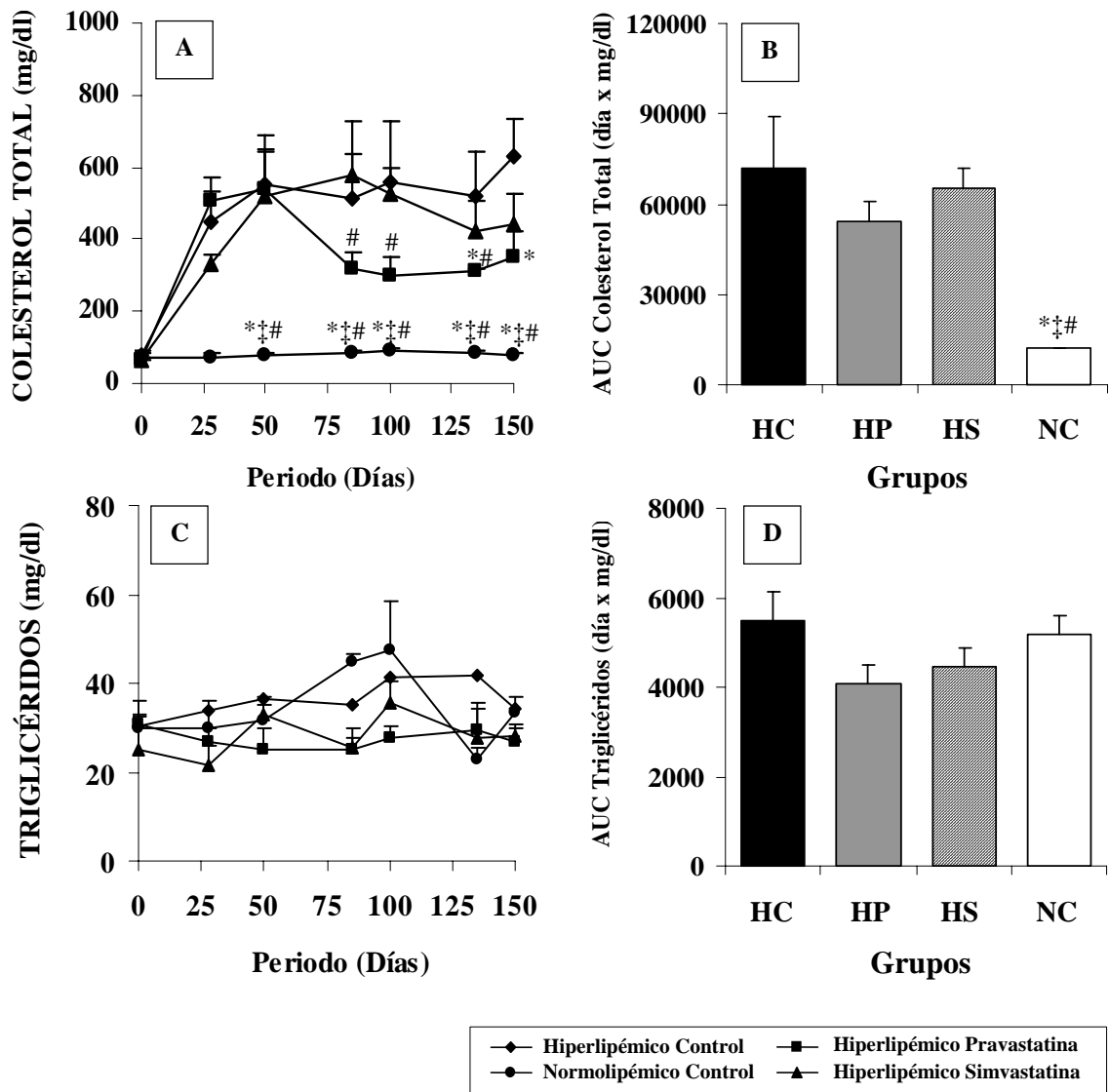


Figura 63. Seguimiento de los niveles plasmáticos de colesterol (A, B) y triglicéridos (C, D) (expresados como concentración y área bajo la curva -AUC-) a lo largo de los 150 días que duró el protocolo (HC, n=3; HP, n=3; HS, n=3; NC, n=4). * p<0,05 vs. HC; ‡ p<0,05 vs. HP y # p<0,05 vs. HS.

Lipoproteínas

La evolución de los niveles de las lipoproteínas (HDL, LDL y VLDL) a lo largo del periodo se muestra en la Figura 64. Los niveles de colesterol HDL (Figura 64A) evolucionaron de manera similar en los tres grupos hiperlipémicos. Los niveles de colesterol LDL (Figura 64C) y VLDL (Figura 64E) se redujeron tras iniciar el tratamiento (día 50) en los grupos tratados con pravastatina y simvastatina (reducción del 35% y 35% de colesterol LDL, y del 64% y 32% de colesterol VLDL, respectivamente, respecto al valor obtenido el día 50). Al final del periodo, ambos parámetros fueron inferiores respecto al grupo hiperlipémico control (reducción del 33% y 32% de colesterol LDL, y del 82% y 52% de colesterol VLDL, respectivamente), aunque esta reducción sólo fue significativa en el grupo tratado con pravastatina el día 150 para el colesterol VLDL. Los valores de las tres lipoproteínas expresados como AUC también estaban ligeramente reducidos en los grupos tratados respecto al grupo hiperlipémico control (Figuras 64B, 64D y 64F), pero tampoco se obtuvo significación.

En los ratios colesterol total/colesterol HDL y colesterol LDL/colesterol HDL (Figura 65) se observó una tendencia a la reducción a partir de la administración del tratamiento (día 50), que fue significativa en el grupo tratado con pravastatina el día 135. Al final del periodo (día 150), los dos parámetros estaban reducidos respecto al grupo hiperlipémico control, aunque la diferencia no llegó a ser significativa.

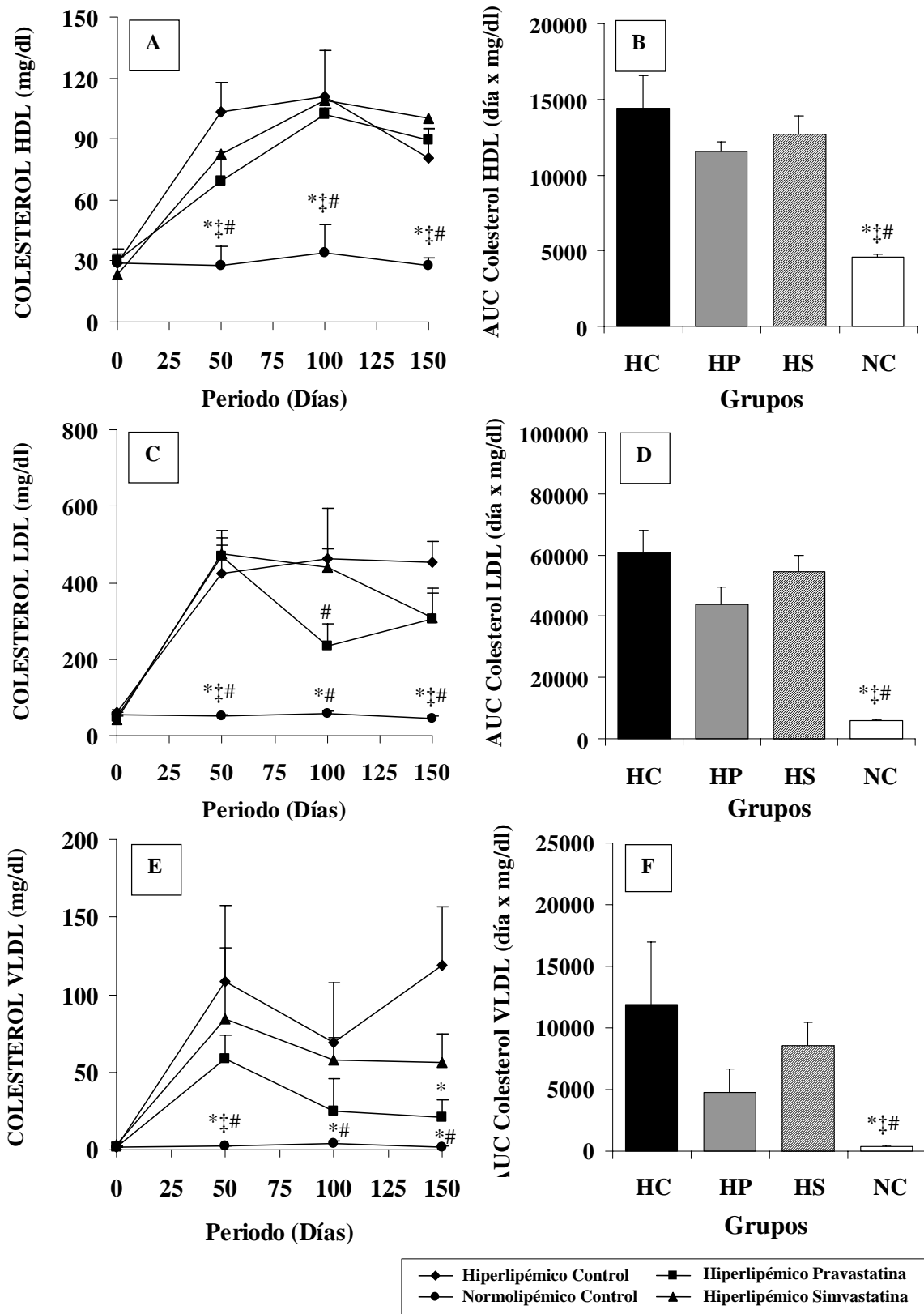


Figura 64. Seguimiento de los niveles plasmáticos de colesterol HDL (A, B), LDL (C, D) y VLDL (E, F) (expresados como concentración y área bajo la curva -AUC-) a lo largo de los 150 días que duró el protocolo (HC, n=3; HP, n=3; HS, n=3; NC, n=4). * p<0,05 vs. HC; ‡ p<0,05 vs. HP y # p<0,05 vs. HS.

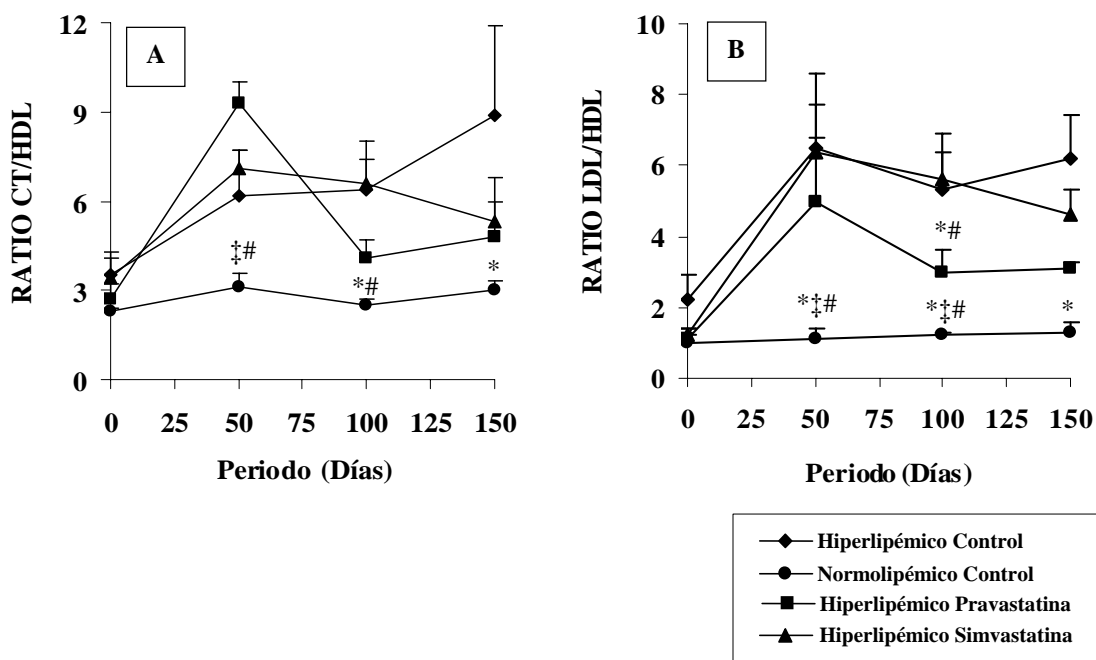


Figura 65. Evolución de los ratios colesterol total/colesterol HDL (A) y colesterol LDL /colesterol HDL (B) a lo largo de los 150 días que duró el protocolo (HC, n=3; HP, n=3; HS, n=3; NC, n=4). * p<0,05 vs. HC; ‡ p<0,05 vs. HP y # p<0,05 vs. HS.

Lesiones Vasculares

Los resultados obtenidos en el estudio de las lesiones vasculares fueron bastante variables entre individuos, sobretudo en el grupo tratado con estatinas, en el que hubo un animal que desarrolló lesiones muy avanzadas y de gran tamaño, que se salían de la normalidad para este modelo experimental (ver Figura 66). Debido esta variabilidad y al reducido tamaño de muestra, en este apartado el análisis comparativo entre grupos se realizó de manera cualitativa, y sólo se aplicaron pruebas estadísticas para comparar los animales hiperlipémicos con los normolipémicos.

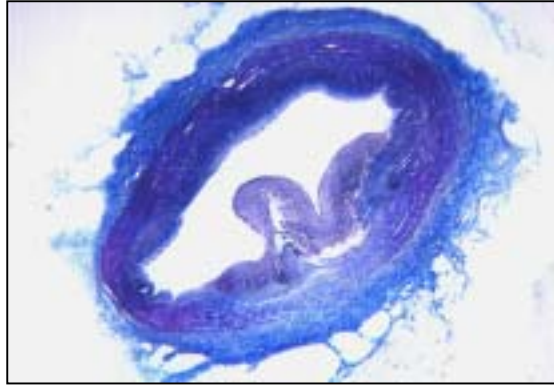


Figura 66. LAD de animal hiperlipémico tratado con pravastatina. Se puede apreciar una lesión de gran tamaño que protuye de forma considerable en la luz vascular, incluso hay presencia de calcificaciones en el núcleo de la lesión.

Extensión de la Lesión

En las Figuras 67 y 68 se muestran los segmentos de aorta torácica y abdominal tras ser teñidos con tinción de Herxheimer, respectivamente. Se observó que la lesión en la aorta abdominal tenía mayor grosor que en la aorta torácica, ya que probablemente se encontraba en una etapa más avanzada. La cuantificación de la extensión de la lesión ($100 \times \text{área de la lesión} / \text{área total del segmento}$) mostró que las estatinas no indujeron regresión de la lesión (Figura 69).

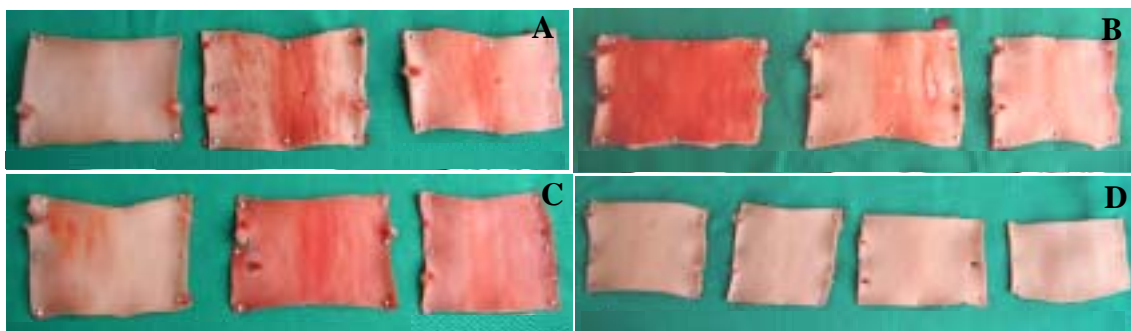


Figura 67. Fotografías de segmentos de aorta torácica procedentes del grupo hiperlipémico control (A), pravastatina (B), simvastatina (C) y normolipémico control (D). La presencia de lesión (estría grasa) se detecta porque queda teñida en rojo.

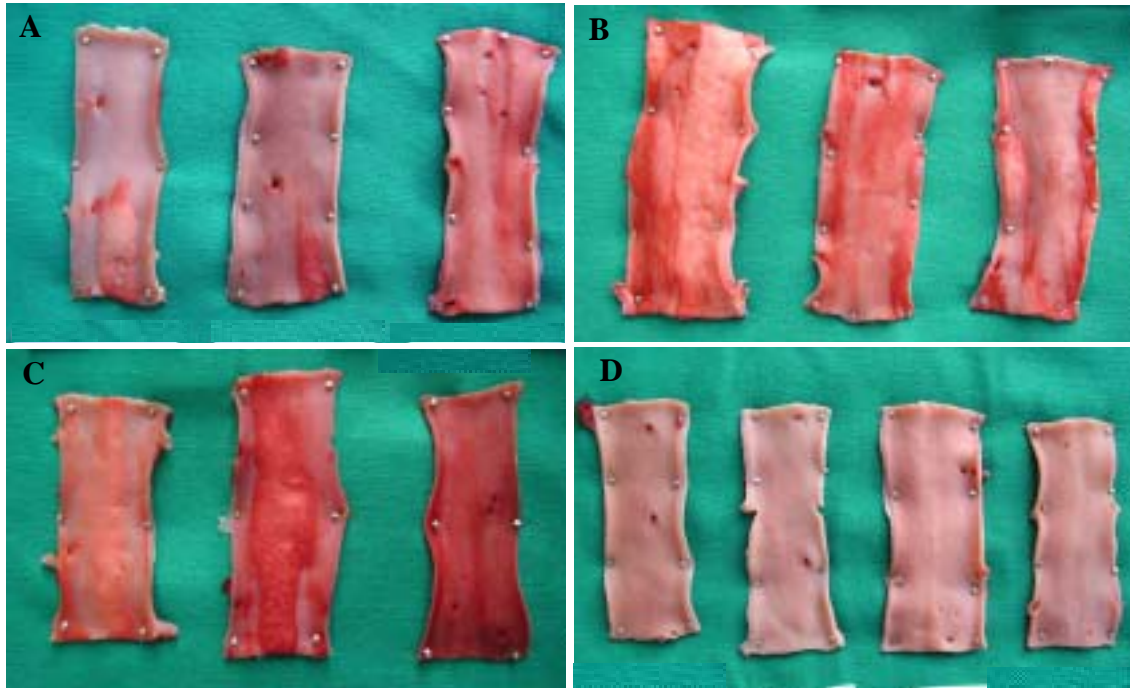


Figura 68. Fotografías de segmentos de aorta abdominal procedentes del grupo hiperlipémico control (A), pravastatina (B), simvastatina (C) y normolipémico control (D). La presencia de lesión (estría grasa) se detecta porque queda teñida en rojo.

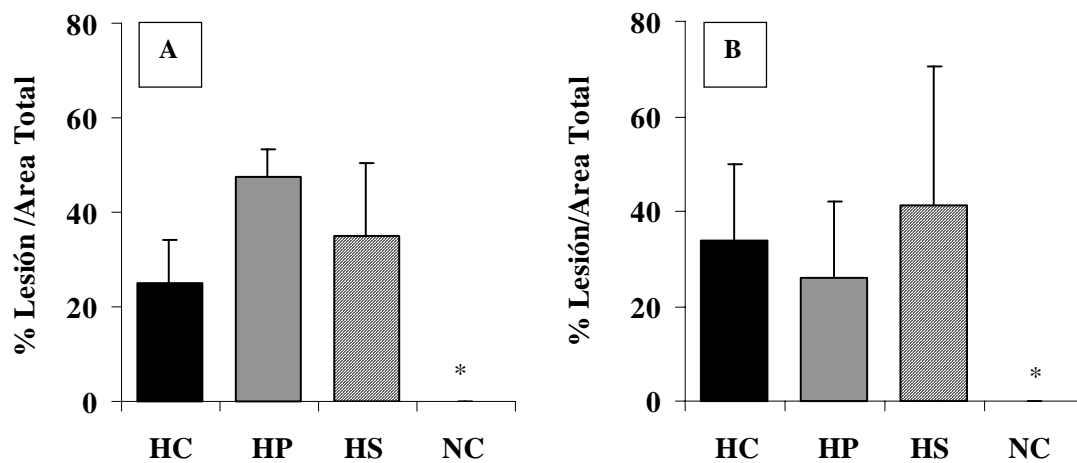


Figura 69. Extensión de la lesión en la aorta torácica (A) y abdominal (B) procedentes de los cerdos de los diferentes grupos de tratamiento (HC, n=3; NC, n=4; HP, n=3; HS, n=3). * $p < 0,05$ vs. grupos hiperlipémicos.

Engrosamiento de la Capa Íntima Aórtica y Coronaria

En las Figuras 70 y 71 se muestran cortes representativos de cada grupo de tratamiento de la LAD y aorta abdominal, respectivamente. Las lesiones inducidas por la hiperlipemia fueron moderadas y de reducido tamaño, a pesar de incrementar el periodo de dieta. Al igual que en los animales tratados durante 50 días, el área de la media de la aorta abdominal fue similar en todos los animales, en cambio en la LAD fue muy variable debido a la proximidad de la bifurcación con el arco aórtico (los datos no se muestran). El tratamiento con estatinas fue incapaz de reducir el tamaño de lesión en las dos arterias evaluadas (Figura 72). Además, se observó que el engrosamiento de la íntima y el porcentaje de estenosis vascular en la LAD era superior en el grupo tratado con pravastatina debido al animal que desarrollo lesiones de gran tamaño (Figura 72).

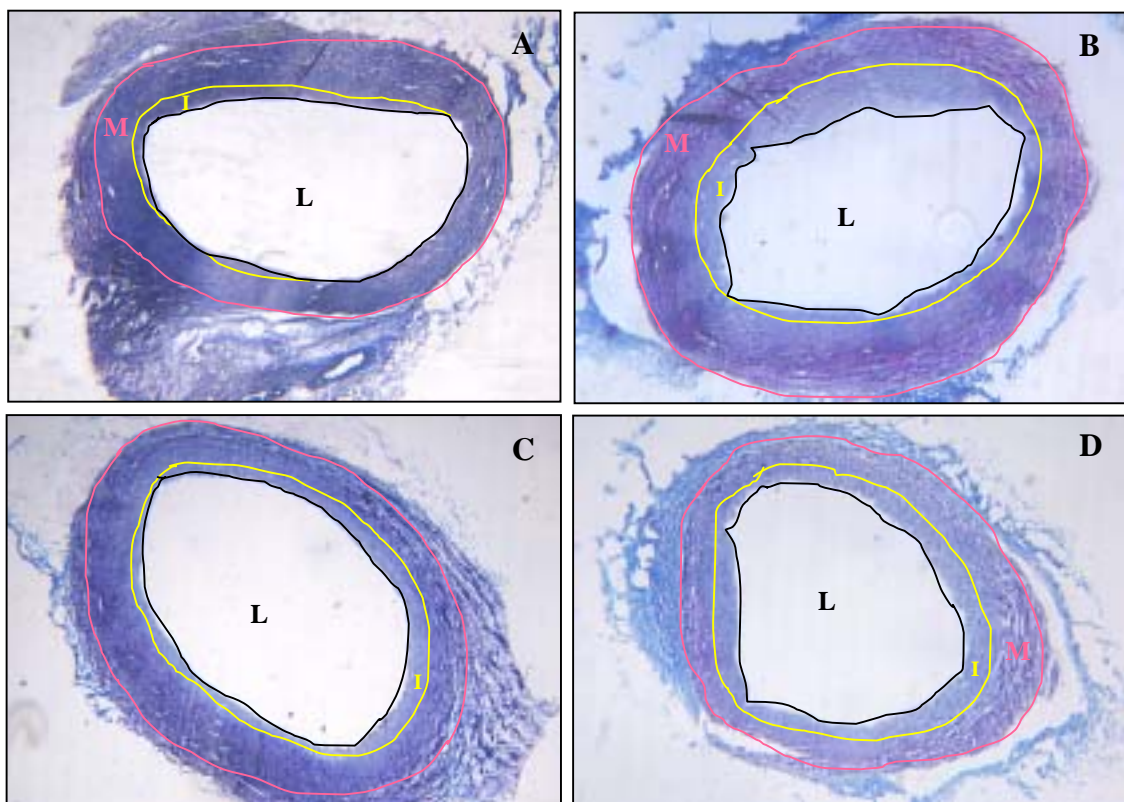


Figura 70. Coronaria izquierda descendente (LAD) de cerdos de los grupos hiperlipémico control (A), hiperlipémico pravastatina (B), hiperlipémico simvastatina (C) y normolipémico control (D). L, indica luz arterial; I, íntima; y M, túnica media.

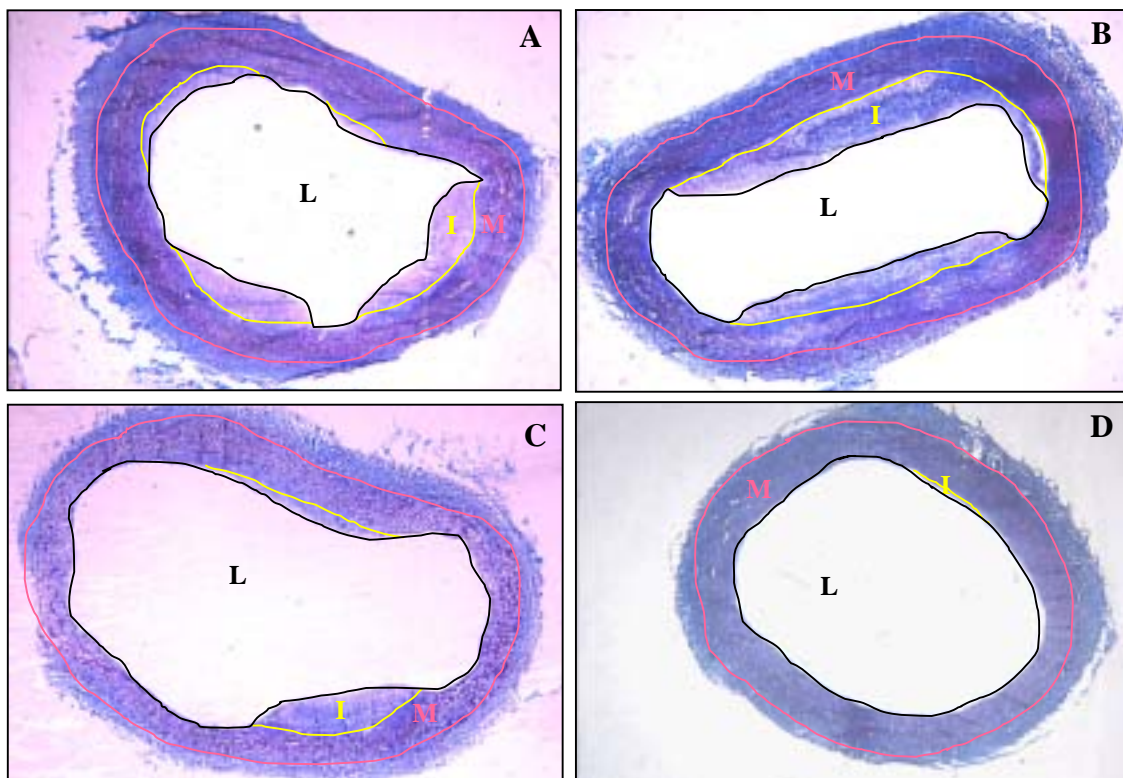


Figura 71. Aorta abdominal de cerdos de los grupos hiperlipémico control (A), hiperlipémico pravastatina (B), hiperlipémico simvastatina (C) y normolipémico control (D). L, indica luz arterial; I, íntima; y M, túnica media.

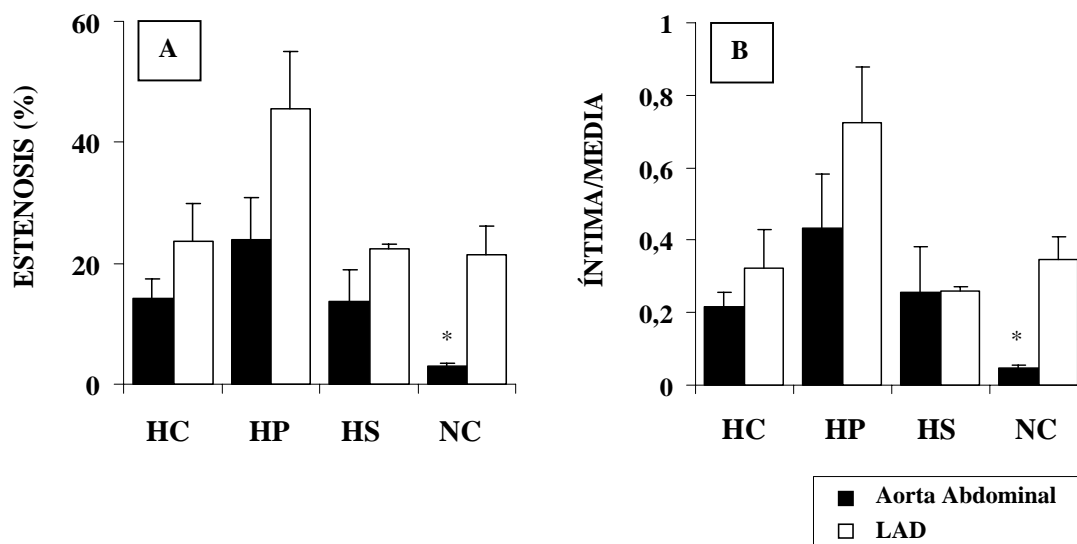


Figura 72. Porcentaje de estenosis vascular (A) y engrosamiento de la capa íntima respecto al grosor de la media (B) en aorta abdominal y LAD procedentes de los cerdos de los diferentes grupos de tratamiento (HC, n=3; HP, n=3; HS, n=3; NC, n=4). * $p < 0,05$ vs. grupos hiperlipémicos.

Correlación entre los Lípidos Plasmáticos y el Tamaño de la Lesión Arterial

Se estudió la relación entre los lípidos plasmáticos y el tamaño de la lesión (extensión de la lesión, estenosis vascular y engrosamiento de la capa íntima) en la aorta abdominal, torácica y LAD en los grupos hiperlipémicos. No se halló ninguna correlación significativa entre los lípidos plasmáticos (AUC) y la extensión de la lesión en la aorta abdominal y torácica (Tabla 25). Tampoco se obtuvieron valores significativos respecto la estenosis vascular y el engrosamiento de la capa íntima en la aorta abdominal (Tabla 26) y LAD (los datos no se muestran).

Parámetro Lesión	% Extensión de la Lesión			
	Aorta Torácica		Aorta Abdominal	
Tipo de Vaso				
Parámetro Lipídico	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
AUC Colesterol Total (día x mg/dl)	0,13	0,7	0,25	0,48
AUC Colesterol HDL (día x mg/dl)	0,08	0,81	-0,08	0,8
AUC Colesterol LDL (día x mg/dl)	0,44	0,66	0,24	0,5
AUC Colesterol VLDL (día x mg/dl)	-0,08	0,81	0,24	0,5

Tabla 25. Correlación (*r*) entre lípidos plasmáticos y la extensión de la lesión (%) en la aorta abdominal y torácica incluyendo todos los grupos hiperlipémicos (n=9).

Parámetro Lesión	Aorta Abdominal			
	% Estenosis Vascular		Engrosamiento Capa Íntima	
Parámetro Lipídico	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
AUC Colesterol Total (día x mg/dl)	0,33	0,35	0,5	0,2
AUC Colesterol HDL (día x mg/dl)	0,05	0,89	0,12	0,74
AUC Colesterol LDL (día x mg/dl)	0,25	0,47	0,4	0,25
AUC Colesterol VLDL (día x mg/dl)	0,18	0,3	0,38	0,28

Tabla 26. Correlación (*r*) entre lípidos plasmáticos y la extensión de la lesión (%) en la aorta abdominal y torácica incluyendo todos los grupos hiperlipémicos (n=9).

Composición de la Lesión

Contenido Lipídico de la Lesión

La Figura 73 muestra la acumulación lipídica en la LAD inducida por la dieta hiperlipémica. El tratamiento con estatinas no modificó el contenido lipídico de la lesión (Figura 74), expresado como porcentaje de tinción positiva en la íntima (Figuras

74A y 74B), área total con tinción positiva (aorta abdominal, Figura 74C) y área con tinción positiva normalizada por el área de la media (LAD, Figura 74D). La proporción de lípido en la íntima fue mayor en la aorta abdominal que en la LAD (Figuras 74A y 74B).

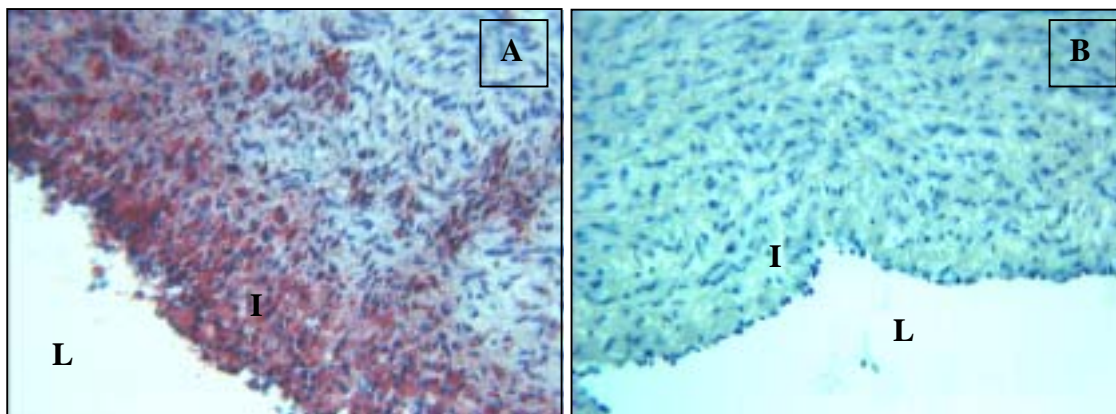


Figura 73. Micrográficas de segmentos de LAD procedentes de un animal hiperlipémico (A) y normolipémico (B) teñidos con tinción oro. El lípido infiltrado en la íntima aparece de color rojo (x200 aumentos). L, indica luz vascular; I, íntima.

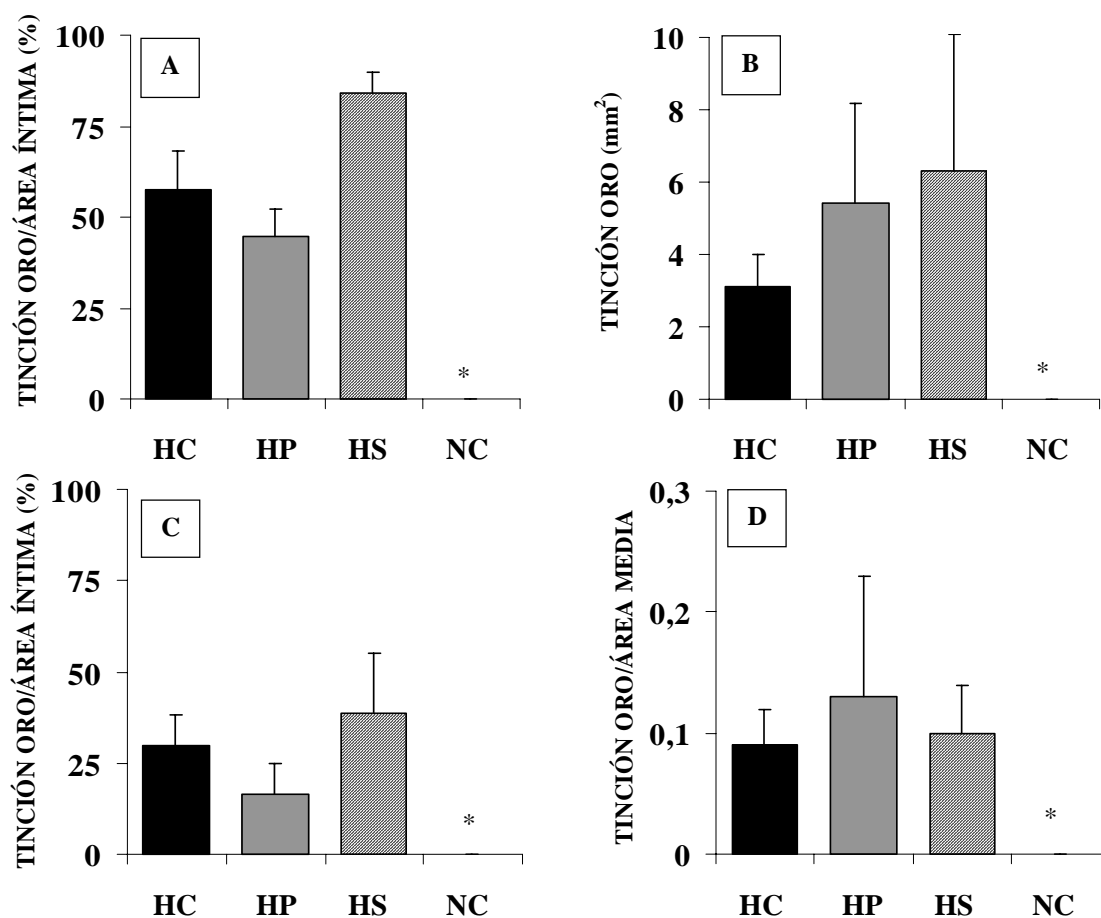


Figura 74. Contenido lipídico (tinción Oro) de la lesión respecto a la superficie de la íntima (A, C), como área total (B), y respecto al área de la media (D) en aorta abdominal (A, B) y LAD (C, D) procedentes de los cerdos de los diferentes grupos de tratamiento (HC, n=3; HP, n=3; HS, n=3; NC, n=4). * $p < 0,05$ vs. grupos hiperlipémicos.

Componentes de la Lesión Vascular

Las Figuras 75, 76, 77, 78 y 79 muestran microfotografías representativas de la LAD y aorta abdominal de los cuatro grupos de tratamiento, donde se localiza fibrinógeno, CML (Figuras 75 y 76), macrófagos (Figuras 77 y 78) y TF (Figura 79). Se observó que las lesiones de animales hiperlipémicos tenían bastante contenido de CML, fibrinógeno y macrófagos y, en menor medida, TF; además, se apreció presencia de este último marcador en la túnica media. En los animales normolipémicos, las zonas engrosadas de la íntima contenían básicamente CML y pequeñas cantidades de fibrinógeno.

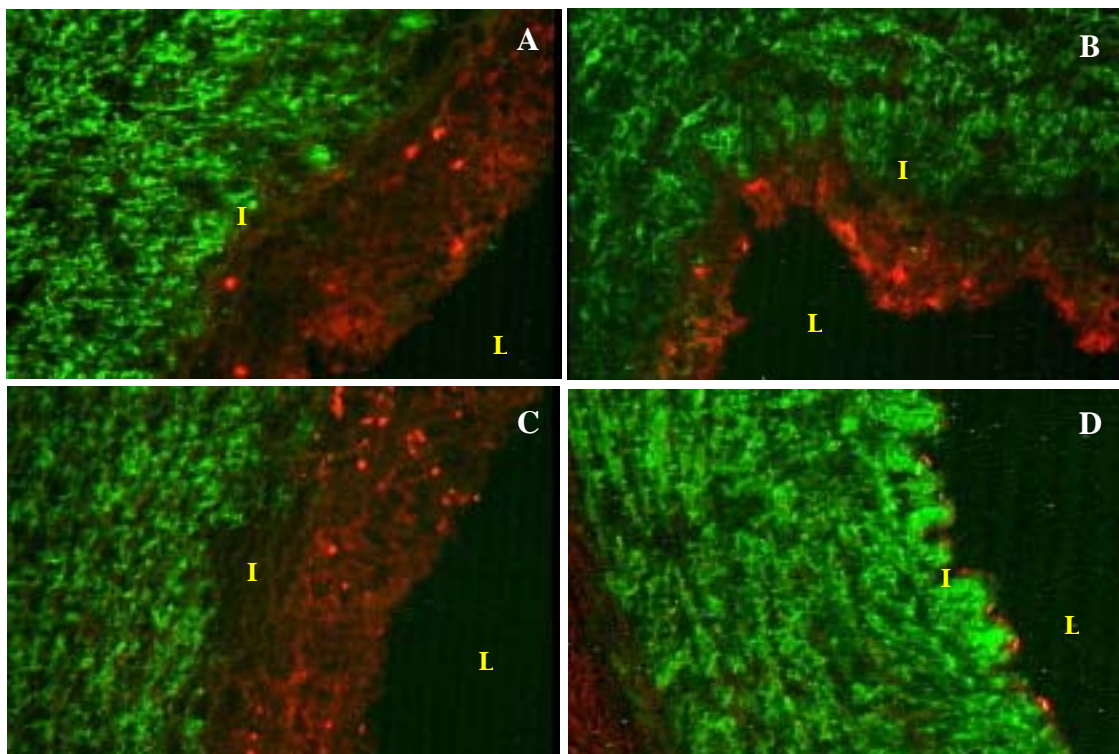


Figura 75. Microfotografías representativas de LAD de cerdos de los grupos hiperlipémico control (A), hiperlipémico pravastatina (B), hiperlipémico simvastatina (C), y normolipémico control (D); en las que se observa la presencia de fibrinógeno (rojo) y CML (verde) (x200). L, indica luz arterial; I, íntima.

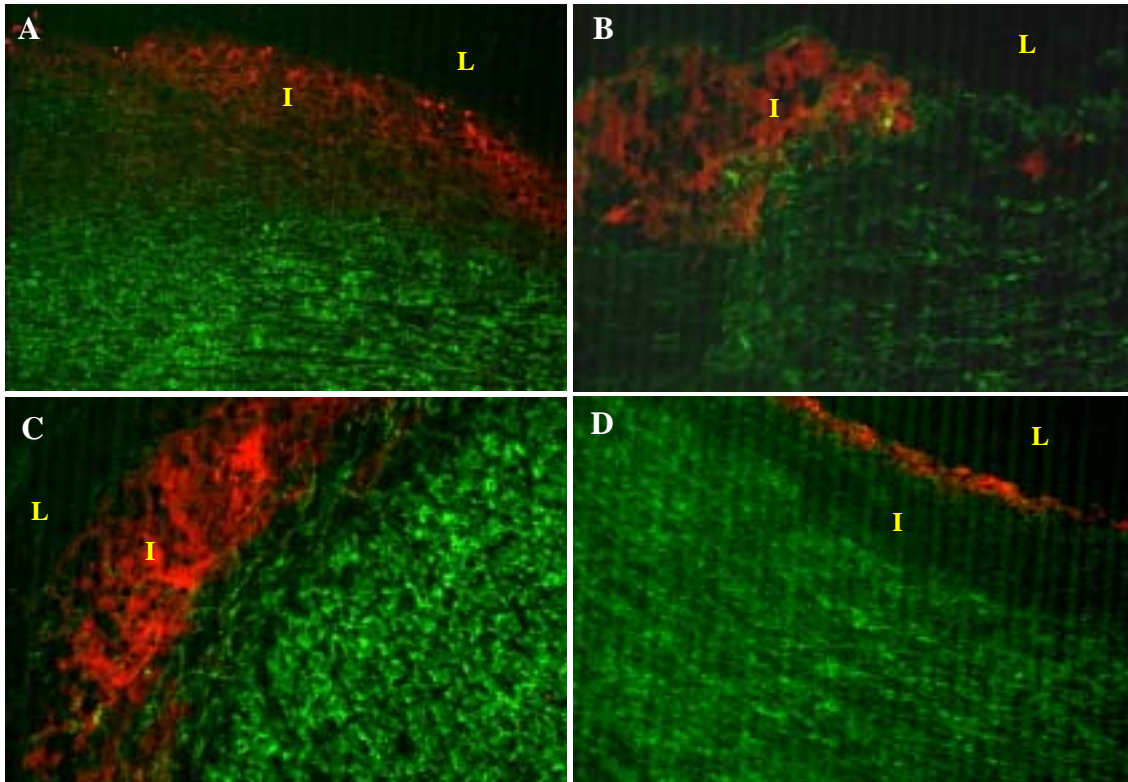


Figura 76. Microfotografías representativas de aorta abdominal de cerdos de los grupos hiperlipémico control (A), hiperlipémico pravastatina (B), hiperlipémico simvastatina (C), y normolipémico control (D); en las que se observa la presencia de fibrinógeno (rojo) y CML (verde) (x100). L, indica luz arterial; I, íntima.

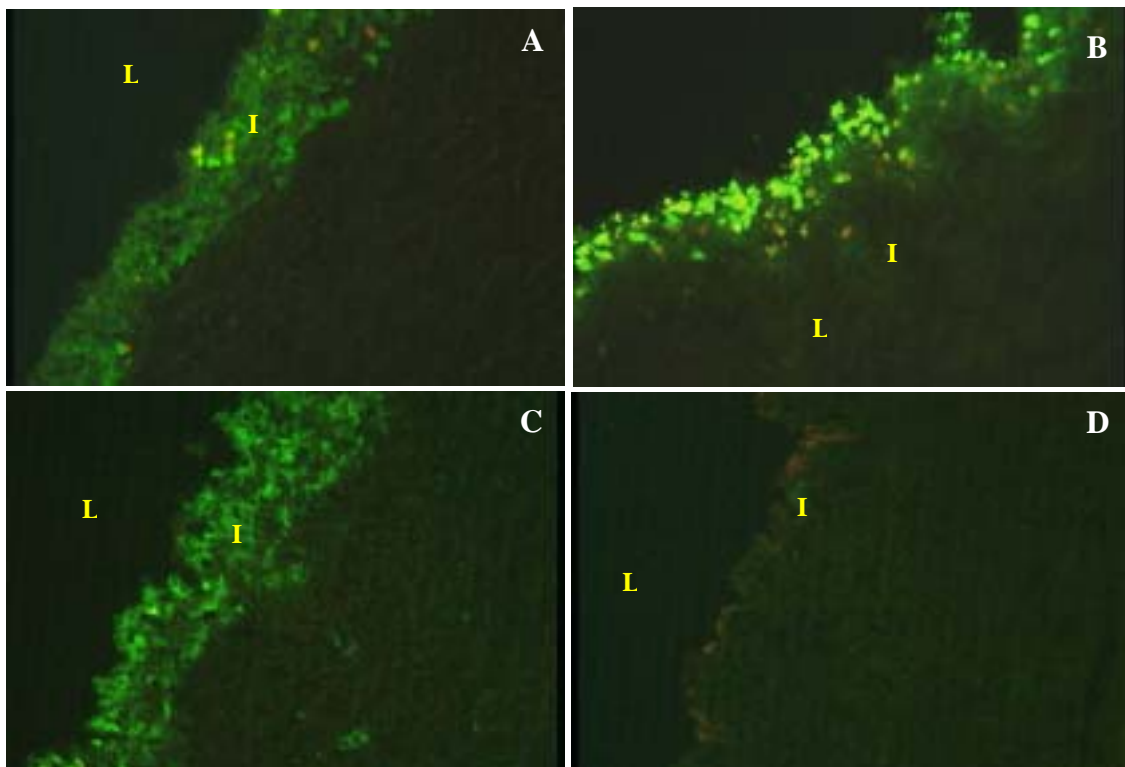


Figura 77. Microfotografías representativas de LAD de cerdos de los grupos hiperlipémico control (A), normolipémico control (B), hiperlipémico pravastatina (C) y hiperlipémico simvastatina (D); en las que se observa la presencia de macrófagos (verde) (x200). L, indica luz arterial; I, íntima.

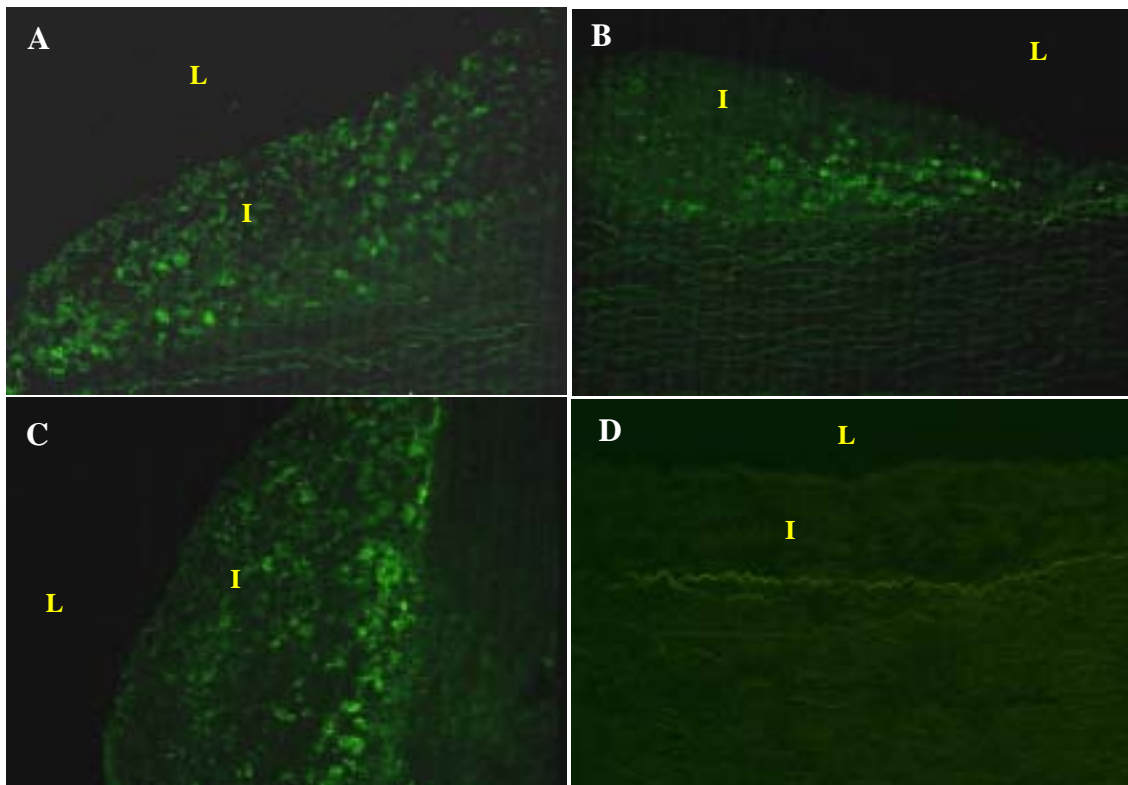


Figura 78. Microfotografías representativas de aorta abdominal de cerdos de los grupos hiperlipémico control (A), normolipémico control (B), hiperlipémico pravastatina (C) y hiperlipémico simvastatina (D); en las que se observa la presencia de macrófagos (verde) (x100). L, indica luz arterial; I, íntima.

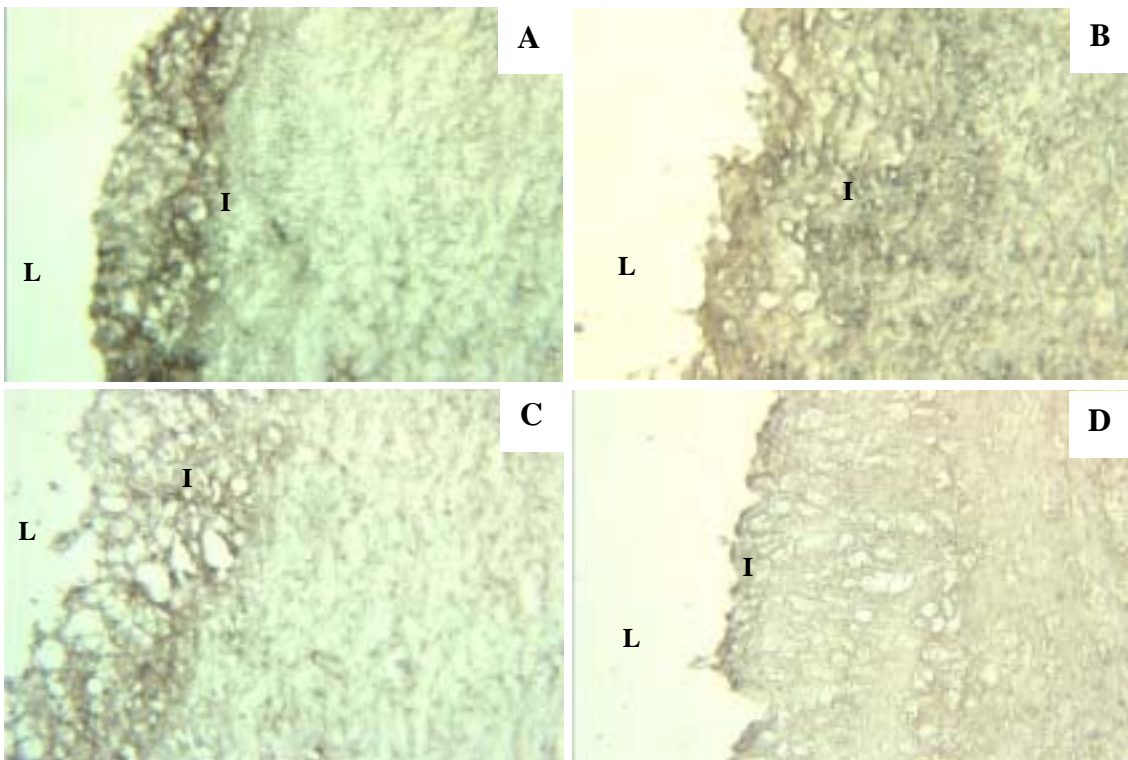


Figura 79. Microfotografías representativas de LAD de cerdos de los grupos hiperlipémico control (A), normolipémico control (B), hiperlipémico pravastatina (C) y hiperlipémico simvastatina (D); en las que se observa la presencia de TF (marrón) (x200). L, indica luz arterial; I, íntima.

Se cuantificó la cantidad de cada uno de los cuatro marcadores en la aorta abdominal. La cantidad relativa de fibrinógeno, macrófagos y TF en la íntima (Figura 80A) fue similar en los tres grupos hiperlipémicos.. Al expresar la cuantificación como área total con tinción positiva (Figura 80B) tampoco se hallaron diferencias significativas entre grupos hiperlipémicos, pero se observó que en el grupo tratado con pravastatina existía una mayor cantidad de alguno de los marcadores determinados, respecto el resto de grupos.

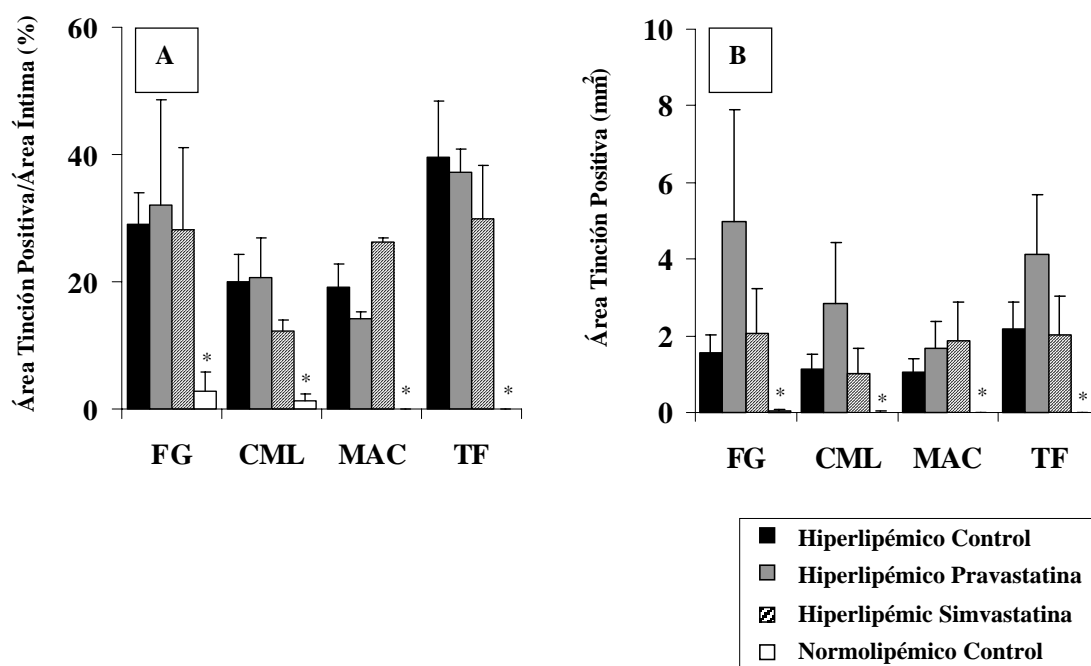


Figura 80. Contenido en fibrinógeno (FG), CML, macrófagos (MAC) y TF en la lesión respecto a la superficie de la íntima (A) y como área total (B) en aorta abdominal procedente de los cerdos de los diferentes grupos de tratamiento (HC, n=6; HP, n=4; HS, n=3; NC, n=4). * $p < 0,05$ vs. grupos hiperlipémicos.

Correlación entre los Lípidos Plasmáticos y la Composición de la Lesión Arterial

Al analizar todos los animales hiperlipémicos, no se obtuvieron correlaciones significativas entre el área total con tinción positiva en la íntima para cada marcador y los lípidos plasmáticos (AUC, Tabla 27) en la aorta abdominal, aunque en el colesterol

total se observó cierta tendencia a la significación. Se obtuvieron resultados similares al analizar la cantidad relativa de cada marcador en la íntima (los datos no se muestran).

Marcador de la Lesión	Aorta Abdominal									
	Lípido		Fibrinógeno		CML		Macrófagos		TF	
	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Parámetro Lipídico										
AUC Colesterol Total (día x mg/dl)	0,67	0,06	0,53	0,13	0,38	0,58	0,6	0,09	0,33	0,35
AUC Colesterol HDL (día x mg/dl)	0,3	0,34	0,07	0,85	-0,02	0,96	0,18	0,6	0,05	0,89
AUC Colesterol LDL (día x mg/dl)	0,58	0,1	0,3	0,39	0,24	0,5	0,47	0,18	0,25	0,47
AUC Colesterol VLDL (día x mg/dl)	0,53	0,13	0,43	0,22	0,32	0,37	0,45	0,2	0,18	0,6

Tabla 27. Correlación (*r*) entre lípidos plasmáticos (AUC) y el contenido en lípido, fibrinógeno, CML, macrófagos y TF de la íntima (área total con tinción positiva) en aorta abdominal incluyendo todos los grupos hiperlipémicos (n=9).

Correlación entre el Tamaño y la Composición de la Lesión Aórtica

Los resultados del estudio de la relación existente entre la cantidad de cada uno de los marcadores evaluados (área total con tinción positiva) y el tamaño de la lesión (% extensión de la lesión, % estenosis vascular y engrosamiento de la capa íntima) de la aorta abdominal, se muestran en la Tabla 28. Todos los marcadores se correlacionaron significativamente con la estenosis vascular y el engrosamiento de la capa íntima. Se obtuvieron coeficientes de correlación *r* elevados y una tendencia a la significación en el análisis de la extensión de la lesión. Al analizar el contenido de los diferentes marcadores expresado como porcentaje de la íntima, se obtuvieron resultados similares (los datos no se muestran).

Parámetro Tamaño Lesión	Aorta Abdominal					
	% Extensión de la Lesión		% Estenosis Vascular		Engrosamiento Capa Íntima	
Marcador de la Lesión	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>	<i>r</i>	<i>p</i>
Lípidos	0,53	0,13	0,85	0,02	0,92	0,01
Fibrinógeno	0,68	0,05	0,88	0,01	0,92	0,1
CML	0,63	0,07	0,95	0,007	0,97	0,006
Macrófagos	0,65	0,07	0,87	0,01	0,92	0,01
Factor Tisular	0,77	0,03	0,99	0,005	0,97	0,006

Tabla 28. Correlación (*r*) entre los marcadores de la lesión (lípidos, fibrinógeno, CML, macrófagos y TF) y el tamaño de la lesión (% extensión, % estenosis y engrosamiento de la capa íntima) de la aorta abdominal, incluyendo todos los grupos hiperlipémicos (n=9).

Expresión Génica de MCP-1, eNOS y Cox (1 y 2) en la Pared Vascular

Mediante RT-PCR se determinó la expresión de MCP-1, eNOS, Cox-1 y Cox-2 en la capa superior (que contiene la íntima (lesión), el subendotelio y restos de la capa media) e inferior (que contiene la túnica media y restos de la adventicia) de la aorta abdominal.

Expresión de MCP-1

La cuantificación densitométrica de las bandas de MCP-1 (normalizada por GAPDH) (Figura 81) mostró que los tres grupos hiperlipémicos tenían significativamente mayor expresión de MCP-1 que el grupo normolipémico en la capa superior, mientras que en la capa media no se observaron diferencias significativas. No se obtuvo una reducción significativa de la expresión de MCP-1 por el tratamiento con estatinas. Se observó que en la capa superior existía mayor expresión de MCP-1 que en la capa media en los tres grupos hiperlipémicos, si embargo no fue así en el grupo normolipémico.

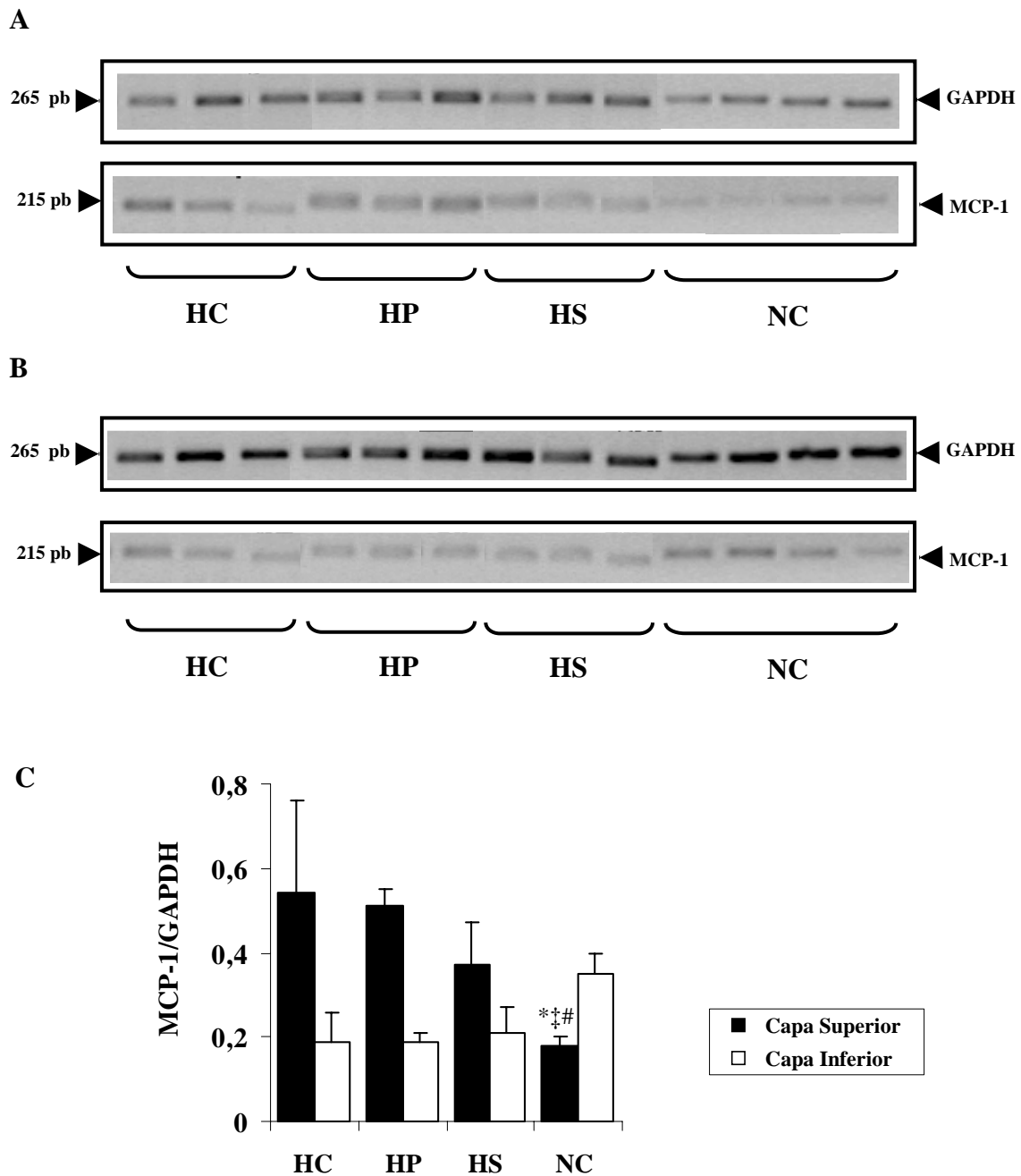


Figura 81. RT-PCR de MCP-1 y GAPDH en la capa superior (A) y en la capa media (B) y cuantificación de MCP-1 (normalizado por GAPDH) (C) en la aorta abdominal procedente de los cerdos de los diferentes grupos de tratamiento (HC, n=3; HP, n=3; HS, n=3; NC, n=4). * p<0,05 vs. HC, ‡ p<0,05 vs. HP, y # p<0,05 vs. HS.

Expresión de eNOS

El estudio de la expresión eNOS en aorta abdominal (Figura 82), mostró que no había diferencias significativas entre grupos en su expresión. Los tres grupos hiperlipémicos tendieron a una menor expresión de eNOS en la capa superior respecto

al grupo normolipémico, sobretodo el grupo tratado con simvastatina. En la capa inferior los grupos hiperlipémico control y simvastatina tuvieron una expresión de eNOS mucho menor que el grupo normolipémico y el tratado con pravastatina. En los cuatro grupos la expresión de este gen fue muy superior en la capa superior que en la capa inferior.

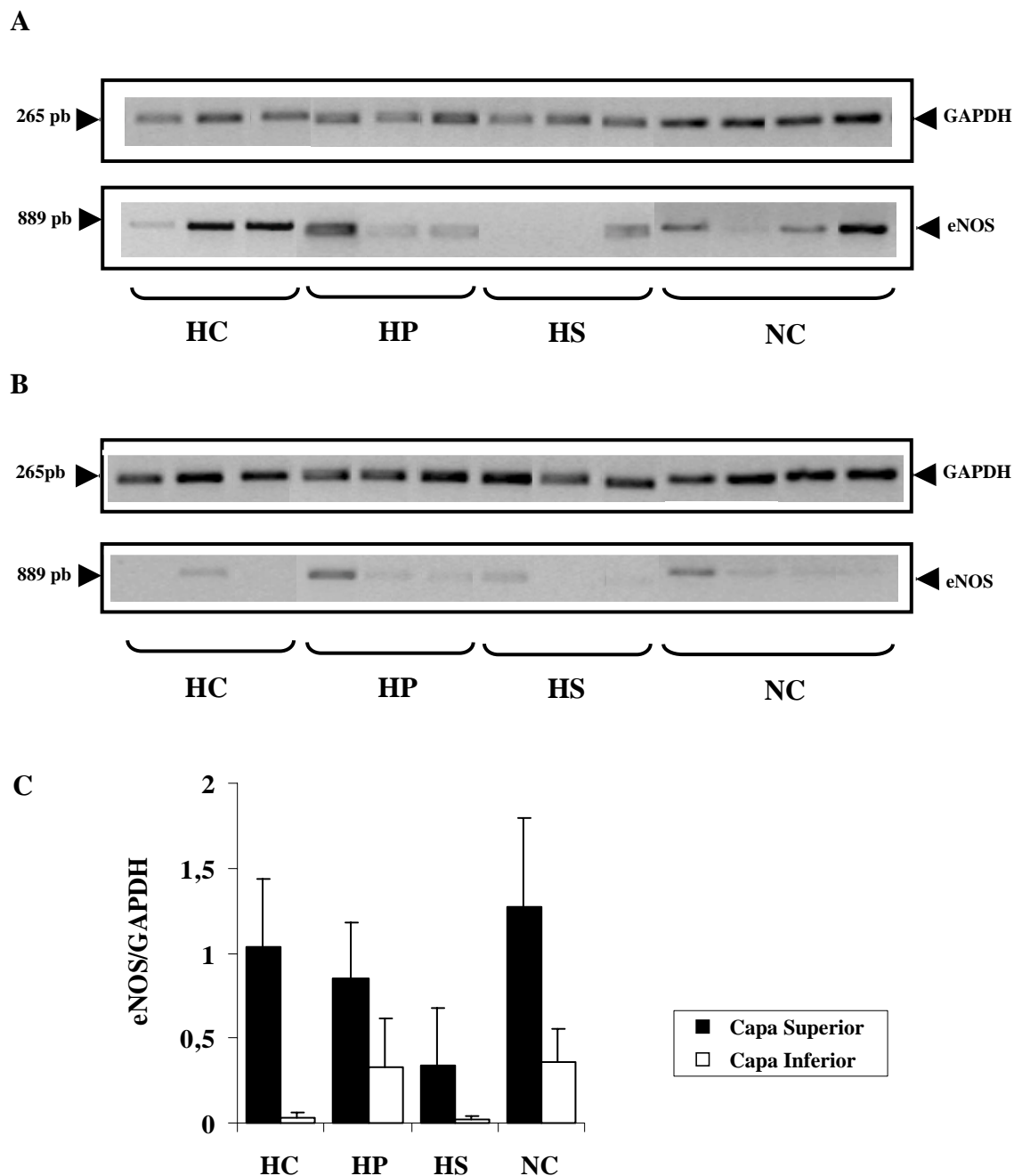


Figura 82. RT-PCR de eNOS y GAPDH en la capa superior (A) y en la capa media (B) y cuantificación de eNOS (normalizado por GAPDH) (C) en la aorta abdominal procedente de los cerdos de los diferentes grupos de tratamiento (HC, n=3; HP, n=3; HS, n=3; NC, n=4). * $p < 0,05$ vs. HC, ‡ $p < 0,05$ vs. HP, y # $p < 0,05$ vs. HS.

Expresión de Cox-1 y Cox-2

La Figura 83 muestra los resultados de la cuantificación de la expresión de Cox-1 y de Cox-2 (normalizada por rRNA 18S). Respecto a los niveles de Cox-1, no se apreciaron diferencias significativas entre grupos en ninguna de las capas analizadas, aunque se observó una menor expresión en la capa inferior en los grupos hiperlipémicos. En cuanto a la Cox-2, tampoco se observaron diferencias significativas entre los cuatro grupos en la capa superior, pero se observó una tendencia a una mayor expresión en los tres grupos hiperlipémicos. En cambio, en la capa inferior se apreció que estos grupos (hiperlipémico control y pravastatina) tenían niveles de Cox-2 significativamente menores a los del grupo normolipémico control. Al comparar ambas capas se apreciaron niveles mayores de Cox-2 en la capa superior que en la capa inferior en los grupos hiperlipémicos, siendo al revés en el grupo normolipémico.

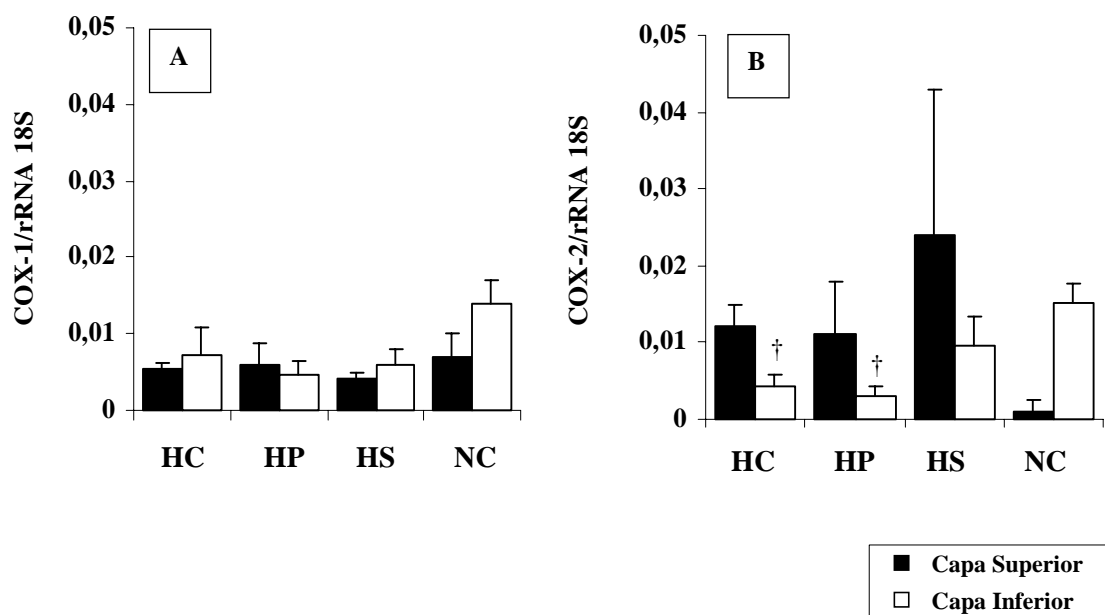


Figura 83. Cuantificación de la expresión de Cox-1 (A) y Cox-2 (B) (normalizada con rRNA 18S) en la capa superior e inferior de la aorta abdominal procedente de los cerdos de los diferentes grupos de tratamiento (HC, n=3; HP, n=3; HS, n=3; NC, n=4). † p<0,05 vs. NC.

DISCUSIÓN

Las manifestaciones clínicas de la aterosclerosis coronaria, tales como la angina y el infarto de miocardio, y los accidentes vasculares cerebrales, suponen la principal causa de muerte, incapacidad a largo plazo y admisión hospitalaria en los países occidentales (Bonita R, 1992). Todas estas patologías están causadas por la interrupción crónica o aguda del flujo sanguíneo en determinadas arterias, lo que conlleva a la aparición de isquemia local que puede causar graves trastornos e incluso la muerte.

La aterosclerosis es una enfermedad silente de progresión lenta, cuya evolución dura, en la mayoría de los casos, muchos años. Normalmente no produce sintomatología, a no ser que la lesión sea de tal tamaño que llegue a estenotar el vaso produciendo isquemia. Son los episodios trombóticos los que suelen motivar los episodios clínicos más graves, ya que aquellas placas ateroscleróticas más inestables se pueden fisurar e inducir la formación de trombos que ocasionan en muchos casos la oclusión aguda y total del vaso. Además, la trombosis mural es también importante en la progresión de las placas ateroscleróticas, incluso en ausencia de síntomas clínicos.

Entre las estrategias farmacológicas encaminadas al tratamiento y prevención de la patología aterosclerótica destacan la terapia antitrombótica y la dirigida a la prevención de la enfermedad, básicamente mediante el control de los niveles plasmáticos de lípidos. La terapia antitrombótica se aplica a pacientes que han sufrido un proceso isquémico o que tienen el riesgo de sufrirlo, así como tras intervenciones de revascularización (angioplastia) realizadas en pacientes con enfermedad aterosclerótica sintomática. Por otro lado, una de las dianas de la prevención es el control de los niveles plasmáticos de lípidos, que se consigue mediante la administración de fármacos hipolipemiantes. Éstos se administran a pacientes que tienen un riesgo importante de sufrir un proceso isquémico, ya que reúnen determinados factores de riesgo además de hiperlipemia, por ello su uso tiene un carácter básicamente preventivo.

Tradicionalmente se han utilizado antitrombóticos como la aspirina y la heparina, en algunos casos combinados con fármacos fibrinolíticos, pero mediante este abordaje no se consigue inhibir completamente los eventos trombóticos (Chesebro JH & Fuster V, 1987; Antiplatelet Trialists' Collaboration, 1988; Antiplatelet Trialists' Collaboration, 1994). La aspirina y otros salicilatos, como el triflusal, inhiben la formación del TXA₂ (Roth GJ & Majerus PW, 1975; Roth GJ & Calverley DC, 1994;

Cruz JP & Sánchez de la Cuesta F, 1995), que es un importante agonista plaquetario, tras el bloqueo irreversible de la Cox-1 de las plaquetas. Existe un dilema a la hora de utilizar los salicilatos con el fin de conseguir un efecto antitrombótico, ya que por el mismo mecanismo por el cual inhiben la Cox plaquetaria, pueden estar inhibiendo la Cox vascular, que es la responsable de la producción de PGI₂ (Preston FE *et al.*, 1981; Cruz JP *et al.*, 1992). La PGI₂ tiene una función antiagregante y vasodilatadora, por tanto su bloqueo por aspirina o similares da lugar a un efecto contrario al esperado. Hay que resaltar que la inhibición de la Cox por este grupo de fármacos, no excluye de forma absoluta el papel trombogénico de las plaquetas, ya que éstas pueden ser activadas a través de otras rutas. Este aspecto contribuye a explicar que la terapéutica antitrombótica con salicilatos no sea eficaz en todos los casos.

Diferentes estrategias alternativas han sido estudiadas, con el fin de hallar antitrombóticos más eficientes. Entre los fármacos de más interés estudiados, a parte de los inhibidores del receptor GPIIb-IIIa plaquetario, se encuentran los inhibidores directos de la trombina, como la r-Hirudina. Estos compuestos inhiben más eficientemente la trombosis que la aspirina o la heparina (Meyer BJ *et al.*, 1994), pero como reacción adversa esta inhibición se acompaña con una alteración la función hemostática y riesgo de complicaciones hemorrágicas (también ocurre con los inhibidores del receptor GPIIb-IIIa), por ello su utilización es limitada (Antman EM, TIMI 9^a Investigators, 1994; GUSTO IIa Investigators, 1994). Recientemente, ha sido estudiada una nueva alternativa dirigida a inhibir la producción de trombina bloqueando la *vía del TF*, responsable de la trombosis desencadenada por lesiones ateroscleróticas vasculares. La ventaja tentativa de estos compuestos respecto a los anteriores, es que consiguen un efecto antitrombótico local sin interferir en la hemostasia a nivel sistémico (Harker L, *et al.*, 1996). El rTFPI, los anticuerpos anti-TF y el rFVIIai (FFR-rFVIIa, DEGR-rFVIIa) han despertado interés dentro de este último grupo. Los estudios con los inhibidores del TF son muy recientes y estos compuestos no se utilizan todavía en el tratamiento rutinario de pacientes con riesgo trombótico, aunque ya se han iniciado los primeros ensayos clínicos (Lincoff AM, 2000; Abraham E *et al.*, 2001; Erhardsten E, 2001) y los resultados preliminares son optimistas.

La hipercolesterolemia se considera como un factor de riesgo independiente que afecta al desarrollo de la enfermedad aterosclerótica, por lo que su control mediante

fármacos hipolipemiantes es prioritario. Los primeros fármacos de este tipo en aparecer fueron los fibratos, como el genfibrocilo, que demostró su efectividad reduciendo la concentración plasmática de colesterol total, así como la tasa acumulada de eventos coronarios al cabo de 5 años (Frick MH *et al.*, 1987). Posteriormente, aparecieron los inhibidores de la HMG-CoA reductasa (estatinas), con los que se abrieron nuevas perspectivas puesto que su capacidad hipolipemiante era mayor. Los ensayos clínicos realizados con algunas estatinas demostraron que podían disminuir la mortalidad coronaria tanto en prevención secundaria (estudio CARE y 4S) como primaria (estudio WOSCOPS). Sin embargo, las evidencias obtenidas de los ensayos clínicos sugieren que el beneficio terapéutico de las estatinas se debe, además de la reducción de los lípidos plasmáticos, a otros mecanismos, ya que se describen efectos positivos que aparecen antes de que se detecte regresión de la lesión (Sacks FM *et al.*, 1996; West of Scotland Prevention Study Group, 1998). De hecho, numerosos estudios *in vitro* han demostrado efectos de las estatinas sobre diferentes procesos implicados en la patología aterosclerótica, inclusive en el proceso trombótico.

Teniendo en cuenta las perspectivas terapéuticas actuales, en esta tesis se ha estudiado como afectan la presentación del proceso aterotrombótico tres grupos de fármacos, los inhibidores del TF, los inhibidores de la Cox y los inhibidores de la HMG-CoA reductasa.

Para estudiar los mecanismos de formación de trombos (deposición plaquetar) utilizamos una cámara de perfusión ampliamente utilizada en el área cardiovascular (Badimon L *et al.*, 1986; Badimon L *et al.*, 1987; Badimon L *et al.*, 1989; Fernández-Ortiz A *et al.*, 1994; Badimon JJ *et al.*, 1997; Badimon JJ *et al.*, 1999). La ventaja principal del estudio de la deposición plaquetar en una cámara de perfusión (sistema *ex vivo*) sobre los sistemas de agregación *in vitro* es que se modela las condiciones de flujo que existen *in vivo*. Hay interacciones plaqueta-plaqueta o plaqueta-vaso que sólo ocurren a velocidades de cizalladura determinadas, mientras que en la agregación *in vitro* la velocidad de cizalladura es arbitraria y con agonistas exógenos. Con respecto a los sistemas *in vivo*, la ventaja principal es que se puede controlar el vaso que se expone y además la velocidad de cizalladura está determinada por el grosor del canal, variables que en los experimentos *in vivo* están incontroladas ya que los procesos de vasoconstricción y vasorrelajación no pueden evaluarse. Uno de los inconvenientes de

este modelo, es que en los sistemas de perfusión extracorpóreo es necesario heparinizar al animal para evitar la activación del sistema de coagulación. No obstante, la heparinización controlada, a un nivel determinado de aPTT no altera la deposición de plaquetas ni fibrinógeno respecto a valores basales (Badimon L *et al.*, 1986). A lo largo de todos los experimentos realizados en cerdos, el aPTT se mantuvo entre el 139% y 330% del valor basal tras la administración de heparina, y entre el 120% y 180% el valor basal en los conejos.

Existen otros parámetros que pueden alterar la trombosis, como la cantidad de plaquetas y de eritrocitos en sangre. Se ha demostrado que la concentración de eritrocitos afecta en gran medida a la interacción plaqueta-pared a alta velocidad de cizalladura (Turitto VT & Weiss HJ, 1980) por un mecanismo físico y químico. Además, la disponibilidad de las plaquetas cerca de la pared está afectada por la concentración de glóbulos rojos (Aarts PA *et al.*, 1988), ya que cuando la sangre circula con un flujo laminar las plaquetas se concentran en la proximidad de la pared vascular y los eritrocitos circulan por el centro del vaso. En los grupos evaluados en este estudio se tuvieron en cuenta estos parámetros para evitar su interferencia en los resultados obtenidos. No se hallaron alteraciones significativas del recuento de eritrocitos o de plaquetas, los parámetros del marcaje de plaquetas (lisis de plaquetas, eficiencia del marcaje, número de plaquetas radiactivas inyectadas y dosis) tampoco fueron diferentes entre grupos, lo que indica que *a priori* tales parámetros no alteraron los resultados de deposición plaquetar.

INHIBIDOR DEL FACTOR TISULAR, FFR-rFVIIa

Para la elección de las dosis en la administración sistémica de FFR-rFVIIa, se realizó un estudio preliminar con varias dosis, con el objetivo de determinar cuales eran las más adecuadas para obtener un efecto antitrombótico (pared vascular no aterosclerótica) (0,1-2 mg/kg, bolo i.v.). En la bibliografía, no se hallaron estudios realizados en esta especie, pero varios trabajos en otras especies y con modelos experimentales de trombosis *in vivo* (Rao L & Ezban M, 2000), obtuvieron un efecto

antitrombótico con rFVIIai (FFR-rFVIIa y/o DEGR-rFVIIa) administrado sistémicamente, a dosis similares o más elevadas a las escogidas en este trabajo que fueron de 0,5 y 1 mg/kg (bolo i.v.). Al realizar el estudio de trombosis en lesiones ateroscleróticas también se evaluó una dosis más elevada (4 mg/kg), debido al mayor contenido de TF de la pared vascular. Las diferentes dosis de FFR-rFVIIa se correlacionaron significativamente con la concentración de FFR-rFVIIa en plasma, coincidiendo con los resultados de Erhardsten E *et al.* (2001), que también halló una proporcionalidad entre los valores de concentración máxima en plasma (C_{max}) y área bajo la curva ($AUC_{0-\infty}$) y la dosis de FFR-rFVIIa en humanos.

Los valores hematológicos y bioquímicos basales no variaron entre los diferentes grupos y se encontraron dentro de los intervalos de normalidad para el modelo. Tales resultados indican que *a priori* no hubieron factores de variación entre los grupos que pudiesen afectar las determinaciones obtenidas durante el procedimiento experimental.

Las diferentes dosis de FFR-rFVIIa evaluadas aumentaron significativamente y de manera dosis-dependiente el PT, mientras que los valores de aPTT y fibrinógeno se mantuvieron dentro de los intervalos de normalidad. Además, los niveles de PT se correlacionaron con la concentración plasmática de fármaco. La afectación del PT por el FFR-rFVIIa demuestra que hay una inhibición de la *vía del TF (extrínseca)*, ya que ésta es la prueba de elección para evaluar la funcionalidad de esta vía. La falta de efecto sobre el aPTT y el fibrinógeno, confirma que este compuesto no actúa sobre la *vía por contacto (intrínseca)* de la coagulación. La elongación del PT por la administración i.v. de FFR-rFVIIa concuerda con los resultados obtenidos tras la administración sistémica de este fármaco y de otros inhibidores del TF en humanos (Erhardsten E *et al.*, 2001; Kristensen AT *et al.*, 1999; Lev EI *et al.*, 2002), conejos (Jang Y *et al.*, 1995; Arnljots B *et al.*, 2000; Ragni M *et al.*, 1996) y ratas (Han X *et al.*, 1999). Por el contrario, la administración local de FFR-rFVIIa no implicó una modificación del PT (Arnljots B *et al.*, 1997; Holts J *et al.*, 1998; Arnljots B *et al.*, 2000), ya que la cantidad que podía llegar a ser absorbida era tan baja que su efecto no era detectable.

TROMBOSIS

Se ha demostrado que el núcleo graso es el componente más trombogénico de las placas ateroscleróticas (Fernández-Ortiz A *et al.*, 1994) y el TF, presente en grandes cantidades en este tipo de lesiones, parece ser el desencadenante de la inducción del trombo cuando estas lesiones sufren rotura (Toschi V *et al.*, 1997). Debido a que el TF supone un factor de riesgo trombótico determinante en la patología cardiovascular, se evaluó el efecto del FFR-rFVIIa, un inhibidor competitivo de este factor, sobre la trombosis desencadenada por pared vascular lesionada.

De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente en nuestro grupo (Badimon L *et al.*, 1986; Badimon L *et al.*, 1988; Badimon L & Badimon JJ, 1989; Lassila R *et al.*, 1990; Fernández-Ortiz A *et al.*, 1994), en este estudio se observó que la deposición sobre lesión ligera (subendotelio) fue mucho menor que sobre lesión severa (túnica media), y en ambos casos siempre fue mayor a alta velocidad de cizalladura, ya que la exposición de capas internas del vaso y velocidades de cizalladura altas producen un mayor estímulo trombogénico. También se apreció que el tamaño del trombo resultante a los cinco minutos sobre lesión ligera, se mantuvo o incluso se redujo entre los cinco y los diez minutos, debido a una interacción plaqueta-pared poco estable; mientras que sobre lesión severa el trombo creció de manera lineal a lo largo del tiempo siendo su tamaño cada vez mayor, ya que el trombo en este caso es mucho más estable y se une firmemente a la superficie vascular.

Después de la administración intravenosa de FFR-rFVIIa la deposición plaquetaria, a ambas velocidades de cizalladura, disminuyó cuando se expuso a la circulación sanguínea la túnica media aórtica, pero no se modificó con la exposición del subendotelio. El análisis de la deposición axial de plaquetas coincidió con los resultados obtenidos en la deposición total, y se obtuvo que el patrón característico (segmento a \geq segmento b \geq segmento c) demostrado anteriormente (Badimon L *et al.*, 1989), se mantenía en la mayoría de los casos a pesar de la inhibición. El mecanismo principal mediante el cual se depositan las plaquetas sobre subendotelio es la adhesión. Durante este proceso, las plaquetas expresan el receptor GP Ib, GP Ia-IIa o/y GPIIa-IIIb, dependiendo de la velocidad de cizalladura (Sakariassen KS *et al.*, 1986; Hawiger J,

1987), y se adhieren a la superficie mediante su unión a su ligando (vWF u otros). Este mecanismo es independiente de la activación de la cascada de la coagulación, y por ello no se acompaña de la deposición de fibrina (Badimon L *et al.*, 1990a), lo cual explica que el bloqueo del TF por FFR-rFVIIa no influya en el depósito de plaquetas. Al realizar el estudio inmunohistoquímico del trombo formado sobre subendotelio, se confirmó que éste estaba compuesto por una monocapa de plaquetas adheridas al vaso sin presencia de fibrina, y que no había diferencias entre el grupo control y el tratado con FFR-rFVIIa. Por otro lado, cuando se produce una exposición de estructuras internas de la pared vascular (lesión severa), se origina un estímulo trombogénico muy importante que da lugar a la activación de las plaquetas y de la *vía del TF*, así como de la producción de trombina, que conduce a la formación de agregados de plaquetas y de una malla de fibrina que estabiliza el trombo y lo adhiere firmemente al vaso (Badimon L *et al.*, 1990a). El bloqueo por FFR-rFVIIa del TF que participa en la formación del trombo en estas condiciones, explica la menor deposición plaquetaria obtenida, ya que se inhibe la formación de trombina, que está implicada tanto en la formación de fibrina como en la activación plaquetaria (Krishnaswamy S *et al.*, 1992). Este efecto inhibitorio se observó en las dos condiciones de flujo estudiadas, lo que sugiere que la actividad del FFR-rFVIIa sobre la activación plaquetaria no depende de la velocidad de cizalladura. El estudio inmunohistoquímico mostró que el trombo estaba formado por agregados de plaquetas unidos a la superficie mediante una importante capa de fibrina, y que la cantidad de plaquetas y de fibrina depositadas sobre la superficie del substrato en el grupo tratado con FFR-rFVIIa era menor que en el grupo control, lo que demuestra la participación de la *vía del TF*.

Como se ha comentado previamente, el PT se alargó de manera dosis-dependiente con la administración de FFR-rFVIIa, demostrando la inhibición de la *vía del TF*. Al analizar la relación entre los valores de PT y los niveles de FFR-rFVIIa en plasma y la deposición plaquetaria sobre lesión severa, se obtuvo una cierta correlación (inversa), lo cual indica que la *vía del TF* de la coagulación y la activación plaquetaria están relacionadas cuando se produce un estímulo trombogénico importante. Sin embargo, sobre lesión ligera no se halló ninguna relación, confirmado la independencia de la *vía del TF* en presencia de estímulos poco trombogénicos.

De acuerdo con nuestros resultados, estudios previos en diferentes modelos *in vivo* e *in vitro* han demostrado la inhibición de la trombosis con inhibidores del TF. En un estudio realizado en humanos con el mismo modelo de trombosis *ex vivo* (1700 s^{-1}) utilizado en este trabajo (cámara L.Badimon), anticuerpos contra TF y rTFPI redujeron la deposición plaquetaria y de fibrina en arterias normales lesionadas severamente, y con lesión aterosclerótica -donde hay gran cantidad de TF (Toschi V *et al.*, 1997)- pero a diferencia de nuestro estudio el tratamiento se aplicó localmente (Badimon JJ *et al.*, 1999). En modelos *in vitro* con células que expresan TF, el rFVIIai (FFR-rFVIIa ó DEGR-rFVIIa) inhibió la activación plaquetaria y la generación de trombina en un sistema estático, y cuando se sometieron a velocidades de cizalladura entre 65 y 650 s^{-1} se observó una reducción en la deposición de fibrina (Rao L & Ezban M, 2000). El tratamiento tópico y sistémico con rFVIIa también disminuyó la trombosis sobre lesión severa, expresada como deposición de plaquetas y/o de fibrina, en modelos *in vivo*, donde no se controlan las condiciones de flujo (Kirchhofer D *et al.*, 1995; Jang Y, *et al.*, 1995; Harker L *et al.*, 1996; Rao L & Ezban M, 2000; Lev EI *et al.*, 2002).

Otro indicio que apunta hacia el mecanismo de inhibición de la trombosis sobre lesión severa por FFR-rFVIIa a través del bloqueo de la *vía del TF*, es que la agregación plaquetar *ex vivo* inducida por colágeno y ADP no se modificó con la administración de este compuesto. Estos resultados indican que el bloqueo de esta vía de la coagulación es independiente de la activación plaquetaria si en el medio hay agonistas plaquetarios. Cuando existe una lesión vascular *in vivo*, la trombosis desencadenada depende básicamente de la *vía del TF* (Nemerson Y, 1988; Rappaport SI & Rao VM, 1996; Fuster V *et al.*, 1996), donde la activación de plaquetas se debe en casi su totalidad a la trombina presente en el medio (Krishnaswamy *et al.*, 1992), y por tanto el bloqueo del TF produce una disminución en la producción de trombina y, consecuentemente, de la agregación plaquetaria y de la formación de fibrina. Trabajos previos coinciden con nuestro estudio, ya que observaron que la agregación plaquetaria *ex vivo* en PRP de animales tratados con FFR-rFVIIa no se modificó tras la adición de ADP (Ragni M *et al.*, 1996; Golino P *et al.*, 1998; Golino P *et al.*, 2000). Resultados similares se obtuvieron al utilizar colágeno como agonista, cuando el tratamiento se realizó con un anticuerpo contra el TF (AP-1) (Pawashe AB *et al.*, 1994; Ragni M *et al.*, 1996).

Tradicionalmente, se ha pensado que la trombosis se desencadena cuando se produce una lesión vascular y se expone el TF de las estructuras internas del vaso a la circulación sanguínea (Zeldis SM *et al.*, 1972; Nemerson, 1988; Fuster V *et al.*, 1996; Fuster V *et al.*, 1997). Según esta premisa, la aplicación local de FFR-rFVIIa en la pared vascular lesionada (lesión severa) debería producir un efecto inhibitorio de la trombosis. Sin embargo, y en contradicción con esta hipótesis, la deposición plaquetaria desencadenada por pared vascular sana lesionada ligera y severamente tratada con este fármaco, no se modificó significativamente en ninguna de las condiciones estudiadas. La falta de efecto al aplicar localmente FFR-rFVIIa, demuestra que este fármaco se ha de administrar sistémicamente para obtener un efecto inhibitorio sobre la trombosis. Probablemente, esta falta de inhibición se deba a que en la pared vascular sana hay muy poco TF (Maynard JR *et al.* 1977). Para confirmarlo, realizamos un estudio inmunohistoquímico de los substratos vasculares, que demostró que prácticamente no había TF en ninguna de las estructuras expuestas a la sangre (subendotelio y túnica media), mientras que el trombo formado sobre túnica media era altamente positivo para este factor. Estos resultados sugieren que el TF que participa en la formación del trombo proviene de la sangre, tal como afirman trabajos recientes que indican la presencia de un pool de TF en la circulación sanguínea -contenido en leucocitos y microvesículas- que se activa y participa en los sucesos trombóticos (Suefuji H, 1997; Key NS, 1998; Giesen PL *et al.*, 1999). Para demostrar esta hipótesis se realizaron estudios de actividad procoagulante del TF, que mostraron la existencia de TF potencialmente activo en sangre. Además, se observó una inhibición significativa de su actividad por FFR-rFVIIa (*in vivo* e *in vitro*), indicando la efectividad de este compuesto a nivel circulante. Por otro lado, el hecho de que sólo el trombo formado sobre túnica media fuese positivo para TF, mientras que el formado sobre subendotelio no lo fuera, confirma que el TF sólo participa cuando el estímulo trombogénico es importante, y por ello su bloqueo por FFR-rFVIIa únicamente sea efectivo en presencia de lesión severa. Recientemente, se ha descrito que los monocitos y otros leucocitos (neutrófilos) transfieren el TF a las plaquetas activadas en la zona de formación del trombo, contribuyendo así a la propagación de éste (Rauch U *et al.*, 2000a). Incluso se ha sugerido que las propias plaquetas contienen y secretan microvesículas con TF cuando se activan, promoviendo la formación de fibrina localmente y consecuente desarrollo y estabilización del trombo (Müller I *et al.*, 2003). Estos resultados coincidirían con los observados en esta tesis, ya que el TF se localizó en el trombo (túnica media) y además éste colocalizó con la

fibrina, indicando que es necesaria la presencia de TF en la zona del trombo para que se lleve a cabo la formación de fibrina, y que posiblemente este TF se hallé en la superficie de las plaquetas que es donde se lleva a cabo la reacción en cascada de la coagulación (*vía del TF*). Según esto posiblemente, el mecanismo más adecuado para explicar la expansión explosiva del trombo consista en que la reacción de coagulación se produzca localmente en la superficie de formación del trombo, lo que se traduce en la superficie de las plaquetas activadas.

Los resultados de este estudio explican los obtenidos en trabajos realizados *in vivo* en los que se induce una lesión arterial en un vaso sano mediante métodos quirúrgicos o mecánicos (angioplastia) (Zeldis SM *et al.*, 1972; Nemerson, 1988; Fuster V *et al.*, 1996; Fuster V *et al.*, 1997), y demuestran una inhibición de la trombosis al administrar inhibidores del TF, los cuales pueden estar actuando sobre el TF circulante. La diferencia de los modelos *in vivo* mencionados respecto al nuestro, es que la lesión vascular se produce en un sistema vivo y nosotros utilizamos substratos arteriales *in vitro*. En el caso de los modelos *in vivo*, en la zona lesionada se produce una inducción de la expresión de TF al cabo de un tiempo (a partir de las 2 horas) (Marmur JD *et al.*, 1993), el cual contribuye al proceso trombótico y puede ser inhibido por los inhibidores del TF; en cambio, en los substratos *in vitro* la expresión inicial de TF, que es muy reducida, obviamente no varía a lo largo del tiempo. En esta última situación, la mayor parte del TF probablemente proviene de la sangre.

Como se ha comentado previamente, el TF se encuentra de manera abundante en las lesiones ateroscleróticas (Toschi V *et al.*, 1997) confiriéndoles una condición protrombótica. Por ello, la adición de un inhibidor del TF debería producir una inhibición de la trombosis. En este trabajo se evaluó el efecto del FFR-rFVIIa sobre la trombosis inducida por pared vascular aterosclerótica humana. Tras aplicar FFR-rFVIIa sistémicamente (1 y 4 mg/kg), se obtuvo una tendencia a la inhibición en la deposición plaquetaria y una inhibición significativa en la deposición de fibrina, lo que sugiere que este fármaco además del TF circulante, también inhibe el TF presente en la lesión aterosclerótica. La inhibición de la deposición plaquetaria fue más efectiva con la dosis más alta (4 mg/kg) en las dos condiciones de flujo, sugiriendo que es necesaria una mayor cantidad de inhibidor para bloquear el TF en presencia de lesión aterosclerótica, debido al gran contenido de este factor. Sin embargo, la deposición de fibrina se inhibió

de manera similar con las dos dosis, por lo que se concluyó que ambas dosis fueron igualmente efectivas.

Por tanto, se puede afirmar que la inhibición de la trombosis por FFR-rFVIIa se produce mayoritariamente mediante el bloqueo del TF activado de la sangre que participa en la formación del trombo. Cuando la pared vascular expresa TF, ya sea por presencia de una lesión aterósclerótica o porque ha recibido una agresión, este fármaco puede ser efectivo inhibiendo el TF presente en el vaso, además del aportado por la circulación sanguínea.

INHIBIDORES DE LA CICLOOXIGENASA

En esta parte de la tesis doctoral, los fármacos se administraron por dos vías, intravenosa y oral. La elección de la dosis de aspirina para el *tratamiento agudo* (5 mg/kg bolo i.v.) se basó en dos estudios realizados con el mismo modelo experimental de trombosis secundaria realizado en cerdo (Meyer J *et al.*, 1994; Meyer J *et al.*, 1998). Las dosis de triflusal y HTB (10 mg/kg bolo i.v.) se eligieron en función de su potencia respecto la aspirina (la dosis equivalente de triflusal es 30-50% mayor a la dosis de la aspirina; Cruz JP & Sánchez de la Cuesta F, 1995), y de varios estudios realizados en ratas y conejos donde las dosis de triflusal entre 10 y 50 mg/kg (i.v. o p.o.) tuvieron efecto sobre la trombosis (Cruz JP & Sánchez de la Cuesta F, 1995). Para elegir las dosis para el *tratamiento crónico*, al igual que con el FFR-rFVIIa se realizó un estudio preliminar a partir varias dosis (aspirina, 10, 20 y 30 mg/kg/día p.o; triflusal, 15, 30 y 40 mg/kg/día), para determinar las dosis mínimas con efecto antitrombótico. Las dosis que se eligieron finalmente fueron mayores que las dosis con efecto antitrombótico del estudio agudo (30 mg/kg/día para la aspirina y 40 mg/kg/día para el triflusal), debido a que la vía de administración era diferente (p.o. se requieren dosis mayores que i.v., ya que no se administran directamente en la sangre).

En los conejos tratados crónicamente con estos fármacos (8 días), los parámetros bioquímicos no se modificaron con la administración de aspirina o triflusal, y todos los

valores obtenidos se encontraron dentro de los intervalos de normalidad para esta especie, al igual que los valores hematológicos y el peso, indicando que los fármacos no produjeron toxicidad o efectos colaterales.

Los valores de coagulación obtenidos fueron similares entre grupos. Estos resultados muestran que el tratamiento con aspirina, triflusal y HTB no altera la cascada de la coagulación, ya que su efecto antitrombótico se basa en la modificación de la funcionalidad plaquetaria. Los efectos de la aspirina y otros salicilatos han sido ampliamente estudiados y en humanos se ha observado que las dosis terapéuticas no causan alteraciones de la hemostasia, a no ser que exista una alteración de la hemostasia subyacente (Patrono C, 2001). Sólo en casos de dosis altas se produce un alargamiento del PT debido a una inhibición de la síntesis hepática de factores VII, IX y X (Owens MR & Cumino CD, 1980).

TROMBOSIS

En el proceso aterotrombótico, una vez se ha formado el trombo sobre una lesión aterosclerótica que ha sufrido rotura, éste puede lisarse por fibrinólisis fisiológica o inducción farmacológica. La presencia de este trombo mural residual predispone a la oclusión trombótica recurrente del vaso (Van Lierde *et al.*, 1990; Fuster V *et al.*, 1990; Davies SW *et al.*, 1990; Gulba DC *et al.*, 1991), por lo que supone un factor de riesgo trombótico importante. Debido a que en muchos casos el tratamiento antitrombótico se aplica tras la aparición de síntomas isquémicos, donde hay presencia de un trombo residual, se evaluó la eficacia de dos inhibidores de la Cox (aspirina y triflusal) sobre la trombosis inducida en estas condiciones (trombosis secundaria).

A fin de realizar el estudio con los fármacos, previamente se estandarizaron las condiciones experimentales para tener un modelo de trombosis secundaria adecuado. Para ello, se evaluó la trombosis primaria, es decir aquella desencadenada por la pared vascular lesionada, y la trombosis secundaria en el grupo control. En las diferentes condiciones evaluadas, se obtuvo una mayor deposición plaquetaria al perfundir sangre sobre un trombo ya preformado (trombosis secundaria). Estos resultados demuestran

que el estímulo trombogénico del trombo es mucho mayor que el de la pared vascular lesionada, ya sea una simple desendotelización (subendotelio) o la exposición de capas profundas de la pared (túnica media). Estos resultados coinciden con diferentes estudios clínicos, que demuestran que la existencia de un trombo residual predispone a la reoclusión trombótica del vaso (Van Lierde *et al.*, 1990; Fuster V *et al.*, 1990; Davies SW *et al.*, 1990; Gulba DC *et al.*, 1991). Además, Meyer J *et al.* (1994), utilizando el mismo abordaje experimental en el modelo porcino, también obtuvieron una mayor trombosis secundaria sobre túnica media, perfundiendo a alta velocidad de cizalladura (1700 s^{-1}). Con nuestro modelo hemos demostrado que a menor velocidad de cizalladura (212 s^{-1}), la deposición sobre un trombo preformado también es significativamente superior que sobre pared vascular, independientemente del grado de lesión. Asimismo, los resultados de trombosis secundaria obtenidos sobre lesión ligera, sugieren que además de la deposición plaquetaria producida por el mecanismo de adhesión de las plaquetas a la superficie vascular (Badimon L *et al.*, 1990a), también se está produciendo agregación plaquetaria. De hecho, una cierta proporción de plaquetas que forman parte del trombo primario, pueden estar activadas y cuando se perfunde nuevamente sangre, éstas estimularían nuevas plaquetas formando agregados minúsculos. Confirmando esta hipótesis, el estudio inmunohistoquímico demostró la presencia de fibrina y pequeños agregados plaquetarios sobre la superficie subendotelial, aunque el tamaño del trombo resultante (primario y secundario) era mucho menor que el obtenido sobre túnica media, el cual también se componía de fibrina y de agregados plaquetarios.

La administración de un único bolo i.v. de aspirina, triflusal y HTB redujo significativamente el tamaño del trombo secundario formado sobre lesión ligera y severa. Este efecto antitrombótico también se observó tras la administración oral de aspirina y triflusal durante 8 días. Estos resultados demuestran que estos fármacos, a las dosis utilizadas, son capaces de inhibir la activación plaquetaria estimulada por un trombo preexistente, y que el triflusal junto a su metabolito HTB tienen una eficacia similar a la aspirina. A diferencia del FFR-rFVIIa, que inhibe indirectamente la activación plaquetaria a través de la reducción de la producción de trombina, los salicilatos ejercen un efecto directo sobre la plaqueta sin alterar la cascada de coagulación. Su mecanismo de acción se basa en la inhibición irreversible de la Cox-1 plaquetar y consecuentemente de la producción de TXA_2 , que participa en la activación

plaquetaria (Roth GJ & Majerus PW, 1975; Roth GJ & Calverley DC, 1994). Además, el triflusal y sobretodo su metabolito, el HTB, tienen un efecto añadido sobre las plaquetas ya que son capaces de inhibir la fosfodiesterasa aumentando consecuentemente los niveles de cAMP intraplaquetario (García-Rafanell J *et al.*, 1986), el cual tiene una acción contraria al TXA₂, y por tanto inhibe la agregación plaquetaria.

Se ha demostrado que el crecimiento del trombo sobre un trombo preformado sobre una superficie vascular severamente lesionada, perfundida a alta velocidad de cizalladura, depende básicamente de la trombina que se forma en grandes cantidades en el trombo (Meyer J *et al.*, 1994; Meyer J *et al.*, 1998). Como se ha comentado previamente, la trombina se produce principalmente por la *vía del TF* en condiciones de lesión vascular. El mecanismo de crecimiento del trombo sobre un trombo preformado, tanto a alta como a baja velocidad de cizalladura, en los modelos de lesión severa y ligera estudiados, probablemente también dependa de trombina, aunque en el caso de lesión ligera de una manera muy tenue, debido a que el estímulo trombogénico es menor. En este estudio, dos tipos de salicilatos (aspirina y triflusal) y el metabolito activo de uno de ellos (HTB), han inhibido el crecimiento del trombo, indicando que a pesar de la importante participación de la trombina en el proceso, el bloqueo de la formación de TXA₂ plaquetario reduce la capacidad de las plaquetas para agregarse. *A priori*, la trombina y el TXA₂ actúan en la plaqueta por dos vías independientes, aunque se ha demostrado que la aspirina a dosis altas también inhibe la agregación secundaria inducida por trombina, colágeno y AA, ya que reduce la producción plaquetaria de diacilglicerol (Werner MH *et al.*, 1991). Este último mecanismo podría ser el responsable de la inhibición plaquetaria en este modelo. Respecto al trombo secundario formado sobre lesión ligera, en el que se ha sugerido que participan ambos mecanismos de agregación y adhesión plaquetaria, se ha descrito que tanto la aspirina como el triflusal también ejercen inhibición de la adhesión de las plaquetas al subendotelio (Cruz JP *et al.*, 1995). Meyer J *et al.* (1994, 1998) demostraron que la aspirina administrada en bolo i.v. a la dosis de 5 mg/kg en cerdo es incapaz de inhibir la trombosis secundaria a alta velocidad de cizalladura. En nuestro modelo, la dosis de 5 mg/kg i.v. de aspirina se utilizó en el estudio de trombosis realizado a baja velocidad de cizalladura, y se administró una dosis mayor (30 mg/kg/día p.o.) y repetida (8 tomas), en el estudio realizado a alta velocidad de cizalladura. Ésto sugiere que la inhibición del crecimiento del trombo secundario se consigue utilizando una mayor dosis de antiagregante, y que

una dosis incapaz de inhibir la trombosis a alta velocidad de cizalladura, donde el estímulo trombogénico es elevado, sí induzca inhibición a velocidades de cizalladura menores. Además, se ha de tener en cuenta que la especie animal utilizada no fue la misma, de manera que las dosis no tienen por qué ser equiparables. Los efectos de la aspirina a las dosis utilizadas se pueden extrapolar a los del triflusal y HTB, ya que las dosis de éstos fueron corregidas para ser equivalentes.

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que la aspirina y el triflusal, a las dosis utilizadas, inhiben con la misma eficacia la trombosis desencadenada por un trombo preexistente, situación altamente trombogénica, mediante la inhibición de la agregación plaquetaria.

EXPRESIÓN DE LA CICLOOXIGENASA VASCULAR

Existen al menos dos isoformas de la Cox, una constitutiva (Cox-1) y una inducible (Cox-2), las cuales tienen acciones catalíticas similares (Smith WL *et al.*, 1996). La Cox-1 se expresa de manera constitutiva en el endotelio de los vasos y es responsable de la síntesis de prostaciclina (PGI₂) (Smith WL *et al.*, 1996), de propiedades vasodilatadoras y antitrombóticas, además de la formación de TXA₂ en la plaqueta e induciendo, por tanto, la agregación plaquetaria. Sin embargo, el descubrimiento de la isoforma Cox-2, que inicialmente se vinculó a procesos inflamatorios y es inducida por diferentes productos de la inflamación (Herschman HR, 1996; Wu KK, 1995), desveló posteriormente, que es la isoforma mayoritariamente productora de PGI₂ en la pared vascular. Esta isoforma se ha implicado también en el proceso aterosclerótico (Ross R, 1993; Gordon D, 1996; Schönbeck U *et al.*, 1999; Baker C *et al.*, 1999). Recientemente, se ha atribuido a los salicilatos la capacidad de inhibir el factor nuclear de transcripción NF-κB (Kopp E & Ghosh S, 1994), que es responsable de la regulación de la expresión de varios genes implicados en el proceso inflamatorio (Baeuerle PA & Baltimore D, 1996), entre los que se encuentran la Cox-2 y la i-Nos. El hecho de que fármacos como la aspirina o el triflusal tengan la capacidad de inhibir la expresión de estos genes, explicaría el gran potencial antiinflamatorio de los salicilatos que no es posible atribuir a la simple inhibición de la actividad de la Cox.

Debido a que los salicilatos se utilizan normalmente en la prevención y tratamiento de la aterotrombosis, en este trabajo se estudió el efecto de la aspirina y del triflusal, a dosis antitrombóticas, sobre la expresión de la Cox en la pared vascular sana, ya que el tratamiento antitrombótico en zonas de lesión está asociado al tratamiento de zonas arteriales con endotelio sano, que podrían verse alteradas.

La expresión de mRNA de Cox-1 en aorta de conejos no se modificó por el tratamiento durante 8 días con aspirina y triflusal, aunque cabría mencionar que los niveles en el grupo tratado con triflusal fueron variables y el valor medio estaba por debajo del control. Por el contrario, la expresión de mRNA y de proteína de Cox-2 se redujo de manera significativa en los dos grupos tratados con aspirina y triflusal, sobretodo los niveles de proteína. Estos resultados indican que en primer lugar, la Cox-1 vascular está afectada mínimamente por la aspirina y el triflusal; y segundo lugar, la pared vascular sana de conejo expresa ambas isoenzimas. La mayoría de trabajos publicados resaltan que así como la Cox-1 se encuentra de manera constitutiva y se halla normalmente en muchos tejidos, la Cox-2 es prácticamente inexistente (Schönbeck U *et al.*, 1999; Stemme V *et al.*, 2000; Hong BK *et al.*, 2000; Catella-Lawson F *et al.*, 2001; Wong E *et al.*, 2001), y para observar su expresión debe de haber sido inducida por moléculas implicadas en el proceso inflamatorio (Wu KK, 1996). El hecho de que en este estudio se describa la presencia de mRNA y de proteína de Cox-2 en pared vascular sana, coincide con estudios recientes que sugieren un papel fisiológico de este enzima. En el sistema circulatorio se ha demostrado que este enzima puede estar relacionada con la producción de PGI₂ vascular tanto en individuos sanos como en pacientes ateroscleróticos (Catella-Lawson F *et al.*, 1999; McAdam BF *et al.*, 1999). Tales resultados sugieren que la Cox-2 ejerce un papel fisiológico. Además, en otros tejidos, como la mucosa gástrica, se ha descrito que la Cox-2 se expresa de manera constitutiva y que probablemente, esté implicada en diversas funciones fisiológicas (Feng L *et al.*, 1993; O'Neill GP & Ford-Hutchinson AW, 1993; Zimmermann KC *et al.*, 1998; Wallace JL, 1999).

El efecto de este tipo de fármacos sobre la expresión de Cox es un aspecto que todavía no ha sido aclarado, ya que los resultados publicados hasta ahora son contradictorios. Por lo que se refiere a la Cox-1, en ningún estudio se ha observado una modificación de su expresión por esta familia de fármacos (Barrios-Rodiles M *et al.*,

1996). Respecto la Cox-2, hay estudios en los que no se observa una afectación, o incluso, como caso aislado, se ha demostrado una inducción tras la administración de aspirina en mucosa gástrica (Davies NM *et al.*, 1997). En cambio, hay otros que afirman una inhibición de su expresión por aspirina, triflusal y otros salicilatos (NSAIDs), tanto *in vitro* como *in vivo*, en diferentes tipos celulares y tejidos. Cuando todavía no se había descubierto la existencia de dos isoformas de Cox, Wu KK *et al.* (1991) demostraron que la aspirina inhibía la inducción de Cox en células endoteliales (HUVEC) estimuladas con IL-1. La aspirina y su metabolito, el salicilato sódico, redujeron los niveles de mRNA y de proteína de Cox-2 en diferentes tipos celulares *in vitro* e *in vivo* (Xu XM *et al.*, 1999). Recientemente, se ha descrito que el HTB y el triflusal, pero no la aspirina, inhibieron la expresión de Cox-2 en monocitos y células de astrocitoma *in vitro* (Fernández de Arriba A *et al.*, 1999; Hernández M *et al.*, 2001) y en células inflamatorias *in vivo* (Fernández de Arriba A *et al.*, 1999). Por otro lado, estos resultados no fueron reproducidos tras el tratamiento con aspirina a dosis mayores en varios trabajos *in vitro* donde se utilizaron fibroblastos (Kujubu DA & Herschman HR, 1992), macrófagos (O'Sullivan MG *et al.*, 1993; Barrios-Rodiles M *et al.*, 1996) y células epiteliales de pulmón (Mitchell JA *et al.*, 1997). La contradicción entre resultados puede deberse a una regulación específica de la Cox-2 por salicilatos según el tipo celular o a una respuesta dependiente del tipo de estímulo (Fernández de Arriba A *et al.*, 1999). El mecanismo más probable mediante el cual los salicilatos parecen estar inhibiendo la expresión de mRNA de Cox-2, y consecuentemente, de proteína, es mediante el bloqueo del factor de transcripción NF- κ B (Kopp E & Ghosh S, 1994). Este efecto se ha descrito recientemente con HTB y triflusal (Bayón Y *et al.*, 1999).

En todos los trabajos hasta ahora publicados, previamente al tratamiento, se indujo la expresión de Cox-2 mediante diversos estímulos (lipopolisacáridos (LPS), IL-1, ésteres de forbol, etc.). En esta tesis, sin embargo, se describe que los salicilatos inhiben la Cox-2 basal en la pared vascular aórtica sin previa inducción. Con los datos actuales es difícil discernir si el mecanismo de inhibición de la expresión de este enzima por salicilatos es el mismo que cuando ha habido una inducción previa. Sería interesante estudiar la expresión del factor de transcripción NF- κ B en situación basal y determinar si existe una relación con la expresión de Cox-2. Por otro lado, si los salicilatos son capaces de inhibir niveles basales de Cox-2, también podrían ser potentes inhibidores de

esta isoenzima en situaciones de inflamación, como en la aterosclerosis, donde la Cox-2 se encuentra inducida de manera importante.

En estos últimos años se ha potenciado la utilización de inhibidores específicos de Cox-2 en procesos inflamatorios. Debido a que estos fármacos no ejercen efecto sobre la Cox-1, era esperable una reducción en la incidencia de reacciones adversas descritas con los salicilatos clásicos. Diversos estudios clínicos han demostrado que los inhibidores de la Cox-2 no son tan beneficiosos como se esperaba, ya que tanto en pacientes ateróscleróticos como en voluntarios sanos se ha observado una reducción en los niveles de PGI₂ vascular, que además se acompaña de mayores niveles de TXA₂ debido a la falta de inhibición de la Cox-1 plaquetaria. Como resultado, se obtiene una situación de vasoconstricción generalizada que puede favorecer los procesos aterotrombóticos. Mediante el uso de aspirina y otros salicilatos que inhiben (funcionalmente) ambas isoenzimas, el equilibrio PGI₂-TXA₂ se mantiene y por ello el resultado global es un beneficio en la enfermedad isquémica coronaria. Pero este equilibrio se obtiene siempre que no se utilicen dosis elevadas, ya que nuestro estudio demuestra que dosis considerables de aspirina y triflusal, con las que se consigue reducir la trombosis cuando el estímulo trombogénico es importante (trombo residual), podrían estar afectando la expresión de Cox-2 vascular. De hecho, la terapéutica con salicilatos ha demostrado que dosis bajas de salicilatos son tan efectivas como antitrombóticas como dosis elevadas, debido a que las dosis bajas inhiben la Cox plaquetaria sin afectación de la Cox vascular, mientras que las dosis altas sí la afectan (Patrono C, 2001). Cabe resaltar que en este estudio se ha observado una tendencia a una mayor reducción de Cox-2 a nivel proteico en el grupo tratado con aspirina que en el grupo tratado con triflusal. Tal observación es importante, ya que podría explicar que el triflusal y su metabolito HTB preserven los niveles de PGI₂ mientras que la aspirina los reduzca de manera importante, cuando se utilizan a dosis equivalentes (McNeely W & Goa KL, 1998). Sin embargo, en este trabajo no se determinaron los niveles de PGI₂, y no podemos concluir si existía afectación por los fármacos utilizados.

Los resultados obtenidos en la pared vascular demuestran que la aspirina y el triflusal no modifican la expresión de Cox-1, mientras que inducen la inhibición de la expresión de Cox-2, lo cual junto a su efecto directo sobre la funcionalidad del enzima, se podría traducir en una reducción de la síntesis de PGI₂.

INHIBIDORES DE LA HMG-CoA REDUCTASA

El objetivo del estudio con estatinas consistió en evaluar el efecto de éstas sobre la trombosis de manera independiente a su efecto hipolipemiante, por lo que se seleccionaron unas dosis y un protocolo de administración tales que no produjesen una reducción significativa de los lípidos plasmáticos. Para ello, la administración de los fármacos se inició una vez se había obtenido un animal dislipémico, es decir, con lípidos plasmáticos elevados y presencia de lesiones (alimentación con dieta hiperlipémica durante 50 días), lo que hacía más difícil obtener una reducción de los lípidos con el tratamiento. La homeostasis del colesterol está regulada por la absorción intestinal del colesterol y por la síntesis endógena (hepática) de colesterol. El aumento de la absorción produce una reducción en su síntesis y viceversa. Los niveles elevados de lípidos en plasma conseguidos por una dieta rica en colesterol priman el mecanismo de absorción intestinal de colesterol y reducen la síntesis endógena. Al ser esta síntesis endógena de colesterol la que es bloqueable por estatinas, en nuestro modelo dicha inhibición no produjo cambios importantes en niveles de lípidos que provenían mayoritariamente de la absorción (tratamiento durante 50 días).

Para la elección de la dosis de pravastatina (5 y 10 mg/kg/día p.o.) se tuvieron presentes estudios previos realizados en nuestro grupo sobre inhibición de la inducción de hiperlipemia, donde la dosis mínima de esta estatina con la que se obtuvo una inhibición del aumento de lípidos en plasma, acompañada de la inhibición de la progresión de la lesión en cerdos, fue de 3 mg/kg/día administrada conjuntamente con una dieta hiperlipémica (Alfón J *et al.*, 1999b). Las dosis de simvastatina (2,5 y 5 mg/kg/día) se escogieron en función de su potencia en relación a la pravastatina (las dosis equipotenciales de la simvastatina son un 50% inferiores a las de pravastatina, Roth BD *et al.*, 1991; Lea AP & McTavish, 1997). También se tuvieron presentes otros estudios con modelos similares, pero hay muy pocos estudios con estatinas que utilicen como modelo experimental el cerdo. En uno de ellos, la simvastatina utilizada a dosis entre 1 y 5,3 mg/kg/día redujo los niveles plasmáticos de colesterol total y colesterol LDL en cerdos con hipercolesterolemia familiar (Hasler-Rapacz J *et al.*, 1996). En otros modelos experimentales ateroscleróticos (mono, conejo, cobaya), existen numerosos trabajos donde se administraron diferentes estatinas a un rango de dosis muy amplio

(entre 0,1 y 50 mg/kg/día) con efectos a nivel de lípidos plasmáticos y de las lesiones ateroscleróticas (Ishida F, *et al.*, 1990; Bocan TMA *et al.*, 1994; Shiomi M *et al.*, 1995; Harsch M *et al.*, 1997; Williams JK *et al.*, 1998; Conde K *et al.*, 1999; Fukumoto Y *et al.*, 2001; Miyazaki A & Koga T, 2002). Según estos trabajos, y teniendo en cuenta las diferencias de dosificación debido a la especie animal, las dosis utilizadas en este estudio se situaron en un rango medio-alto. Una vez elegidas las dosis, al iniciar la administración se observó hepatotoxicidad con la de 10 mg/kg/día, por lo que esta dosis fue descartada del estudio.

El objetivo de este estudio fue evaluar como se puede ver afectado el proceso aterotrombótico por las estatinas en condiciones de dislipemia. Para conseguir estas condiciones, los cerdos se alimentaron con una dieta enriquecida en 1% de colesterol, 2% de ácido cólico y 20% de sebo de ternera. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Pueyo Palazón C *et al.*, 1998; Alfón J *et al.*, 1999a; Alfón J *et al.*, 1999b; Royo T *et al.*, 2000) demostraron que el ácido cólico, que es un ácido biliar, ayuda a aumentar los niveles plasmáticos de colesterol cuando se administra conjuntamente con el colesterol y el sebo de ternera en la dieta. El sebo de ternera se utilizó como fuente de ácidos grasos saturados, ya que es especialmente rico en los ácidos mirístico (C₁₄) y esteárico (C₁₈). Sin embargo, este tipo de dieta no induce elevación de los triglicéridos plasmáticos. La administración de esta dieta durante 50 días indujo la elevación de los niveles plasmáticos de colesterol acompañada de la formación de estría grasa y placa aterosclerótica en la aorta abdominal y en las coronarias de los animales (Pueyo Palazón C *et al.*, 1998; Alfón J *et al.* 1999a; Alfón J *et al.* 1999b; Royo T *et al.*, 2000).

Todos los cerdos alimentados con dieta hiperlipémica y tratados con estatinas (100 y 150 días), aumentaron de peso a un ritmo muy similar. Que el ritmo de ganancia de peso sea parecido entre grupos es importante para el análisis posterior del efecto de las estatinas sobre los lípidos y la aterogénesis, ya que indica una similitud de ingesta. Al igual que en los conejos, ni la dieta ni los fármacos, a las dosis utilizadas, produjeron efectos tóxicos, ya que los parámetros hematológicos y bioquímicos tuvieron una evolución similar entre grupos y se encontraron prácticamente dentro de los intervalos de normalidad para el cerdo, sin relacionarse con el tipo de dieta o tratamiento.

No se hallaron alteraciones destacables de los parámetros de coagulación en ningún caso. Según estudios previos, no está claro si las estatinas y/o la hiperlipemia ejercen algún efecto sobre los parámetros de coagulación. Se ha descrito que la hipercolesterolemia está relacionada con niveles elevados de fibrinógeno, aunque los datos de la bibliografía sobre el efecto de las estatinas sobre el fibrinógeno son contradictorios (Koh KK, 2000). En estudios anteriores realizados en nuestro grupo la atorvastatina, pero no la simvastatina, aumentó el aPTT sin afectar al resto de parámetros en conejos, y los grupos hiperlipémicos alcanzaron niveles de fibrinógeno ligeramente superiores (Alfón J *et al.* 1998a). En cambio, y de acuerdo con nuestros resultados, los valores fueron similares entre los grupos en cerdos tratados con pravastatina y simvastatina (Alfón J, 1998). Tampoco hubo modificación de los niveles de fibrinógeno y aPTT en pacientes tratados con pravastatina y simvastatina (Rauch U *et al.*, 2000b).

EVOLUCIÓN DE LOS LÍPIDOS PLASMÁTICOS

La administración de la dieta hiperlipémica indujo un aumento de los niveles plasmáticos de colesterol total y de las tres fracciones lipoproteicas en los cerdos. A diferencia de otros modelos ateroscleróticos, en el modelo utilizado en este estudio no se obtuvo un incremento de los niveles de triglicéridos, como ya se había descrito en estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio con el mismo modelo (Pueyo Palazón C *et al.*, 1998; Alfón J *et al.* 1999b; Royo T *et al.*, 2000). Tal como esperábamos, la administración de pravastatina y simvastatina durante 50 días no produjo una reducción significativa de los niveles de colesterol total, ni de colesterol LDL respecto al grupo control hiperlipémico. Al aumentar el tiempo de tratamiento a 100 días, en cambio, se halló una tendencia a la reducción por las dos estatinas del colesterol total y colesterol LDL, incluso del colesterol VLDL y de ambos ratios, que llegó a ser significativa en algunos casos con pravastatina. Los niveles de colesterol HDL se mantuvieron prácticamente constantes en ambos protocolos de administración, aunque en el tratamiento de 100 días tendieron a aumentar.

En la mayoría de los modelos ateroscleróticos que aparecen en las referencias bibliográficas, si la inducción de hiperlipemia se acompaña de la administración de estatinas y, exceptuando algunos casos donde las dosis son muy bajas, se obtienen reducciones significativas del colesterol total y colesterol LDL en pocas semanas (entre el 15-60%) (Ishida F, *et al.*, 1990; Bocan TMA *et al.*, 1994; Shiomi M *et al.*, 1995; Hasler-Rapacz J *et al.*, 1996; Harsch M *et al.*, 1997; Williams JK *et al.*, 1998; Alfón J *et al.* 1999a; Alfón J *et al.* 1999b; Conde K *et al.*, 1999; Fukumoto Y *et al.*, 2001; Miyazaki A & Koga T, 2002). A diferencia de éstos, e intentado simular lo que pasa en pacientes hipercolesterolémicos, en este estudio se aplicó un periodo de progresión, con el objetivo de alcanzar un estado de dislipemia (administración de dieta hiperlipémica sin tratamiento), y seguidamente se inició el tratamiento con estatinas. *A priori*, este modelo aterosclerótico es más extremo y parece más difícil conseguir una modulación de los lípidos una vez la hiperlipemia, debida a absorción intestinal de colesterol, está instaurada. Los ensayos clínicos en humanos han demostrado extensivamente el efecto hipolipemiante de las estatinas, pero hay que tener en cuenta que, a diferencia de nuestro modelo, en la mayoría de los casos el tratamiento farmacológico se acompañó de una normalización de la dieta. Simulando esta situación, en un estudio realizado en conejos a los que se les administró dieta aterogénica durante 4 semanas, y dieta normal junto con atorvastatina (5 mg/kg/día) durante 4 semanas más, se obtuvo una reducción significativa del colesterol total y colesterol LDL (Bustos C *et al.*, 1998), lo que sugiere que la normalización de la dieta es un factor casi tan importante como el tratamiento farmacológico, sobretodo en el conejo que muestra niveles extremos de LDL (alrededor de unos 1200 mg/ml) tras dos semanas de ingesta de dieta hiperlipémica. Por el contrario, en humanos hay una población muy importante que tiene una alteración del metabolismo lipídico (hipercolesterolemia familiar) donde el colesterol endógeno es el responsable de la elevación de los lípidos plasmáticos, por ello el bloqueo de su ruta metabólica por las estatinas implica un efecto hipolipemiante muy evidente. La efectividad de este tipo de fármacos sobre el metabolismo del colesterol se observó en un estudio en el que la administración de simvastastina (0,7-5,3 mg/kg/día) durante 3 semanas a cerdos con hipercolesterolemia familiar, redujo significativamente los niveles de colesterol total y colesterol LDL (25-27%) (Hasler-Rapacz *et al.*, 1996).

El efecto hipolipemiante de las estatinas no se limita al bloqueo de la síntesis endógena de colesterol, ya que también inducen un incremento de la expresión de

receptores hepáticos de LDL, con lo que se aumenta la captación de LDL (Goldstein JL & Brown MS, 1977). Éste fenómeno podría explicar que tras administrar pravastatina y simvastatina durante 100 días sí se observase una modesta reducción de los lípidos mientras que administrándolas durante 50 días no. De hecho, se ha descrito que el efecto hipolipemiante de la atorvastatina en cerdos proviene mayoritariamente de la inhibición de la secreción de apolipoproteína B de las VLDL y no de la regulación al alza de los receptores hepáticos de LDL (Burnett JR *et al.*, 1997). Estos resultados concordarían con los obtenidos con nuestro estudio (tratamiento de 100 días), ya que la fracción más afectada por la pravastatina y la simvastatina (administradas durante 100 días) fue la VLDL.

TROMBOSIS

Los inhibidores de la HMG-CoA reductasa son un grupo farmacológico que se ha utilizado tradicionalmente en la prevención de la aterosclerosis, debido a su potencial hipolipemiante y la consecuente mejoría de las lesiones ateroscleróticas. Debido a que la hiperlipemia parece estar relacionada con la activación plaquetaria (Badimon JJ *et al.*, 1991; Lacoste L *et al.*, 1995; Rosenson RS & Lowe GDO, 1998), se pensó que las estatinas podrían ejercer un efecto antitrombótico mediante la reducción de los lípidos plasmáticos. Recientemente, se ha sugerido que estos fármacos producen efectos beneficiosos en las células de la pared vascular a través de mecanismos a diferentes niveles, independientemente de su efecto hipolipemiante (Lefer AM *et al.*, 2001; Takemoto M & Liao, 2001). Nuestro objetivo fue investigar posibles efectos sobre la trombogenicidad de la sangre, que fueran independientes de los efectos de las estatinas sobre la lipemia sistémica.

Al evaluar el efecto las estatinas sobre la trombosis desencadenada por pared vascular lesionada, se observó que sólo la pravastatina (5 mg/kg/día) inhibió significativamente la deposición plaquetaria inducida tanto por lesión ligera como severa, en condiciones de alta velocidad de cizalladura y flujo laminar paralelo. En cambio, en condiciones de estenosis y flujo no laminar paralelo (turbulento) se obtuvieron reducciones en los grupos tratados con pravastatina y simvastatina (5

mg/kg/día), aunque la significación estadística sólo se alcanzó en ambos tipos de lesión con la pravastina. La deposición en la zona de estenosis máxima (segmento axial b de los substratos vasculares), estaba significativamente incrementada en el grupo hiperlipémico control respecto a los segmentos no estenosados, y al resto de grupos. Tales resultados indican que, por un lado, ambas estatinas inhiben la trombogenicidad de la sangre, aunque la pravastatina parece ser más potente que la simvastatina, a pesar de que esta última se utilice a una dosis el doble de potente (2,5 mg/kg/día de simvastatina equivalen a 5 mg/kg/día de pravastatina), ya que inhibe la deposición plaquetaria en todas las condiciones evaluadas, e incluso alcanza valores de deposición por debajo del control normolipémico, mientras que la simvastatina sólo tiene efecto en condiciones de flujo con estenosis. Por otro lado, en el modelo utilizado la hiperlipemia sólo indujo un incremento de la deposición plaquetaria en condiciones de flujo no laminar paralelo y estenosis, mientras que en condiciones de flujo laminar paralelo y velocidad de cizalladura alta los valores obtenidos fueron similares al grupo normolipémico control. Además, la hiperlipemia tampoco indujo una mayor agregación *ex vivo* evaluada en agregómetro.

Para comprobar si la deposición plaquetar estaba influida por los lípidos plasmáticos, se estudió la correlación entre ambos factores. No se obtuvieron valores significativos y los coeficientes de correlación fueron muy bajos, además, como se ha comentado previamente, no se obtuvo una reducción significativa de los niveles de colesterol total y tampoco de las fracciones lipoproteicas con ninguna de las dos estatinas. Asimismo, los grupos hiperlipémicos, con niveles elevados de lípidos, no mostraron una deposición plaquetar claramente superior al grupo normolipémico. Estos resultados sugieren que el mecanismo por el cual la simvastatina y la pravastatina (sobretudo esta última) reducen la deposición plaquetaria es independiente de su efecto sobre los lípidos plasmáticos; y que en este modelo los niveles de lípidos plasmáticos no están relacionados con el estímulo trombogénico.

Los datos de la literatura son contradictorios en cuanto al efecto de las estatinas sobre la activación plaquetar y la trombosis. Se ha descrito que la simvastatina reduce la reactividad plaquetar *in vitro* en pacientes con hipercolesterolemia del tipo IIa, tratados con 20 mg/día de simvastatina, de manera dependiente de la reducción del colesterol total (Notarbartolo A *et al.*, 1995). Sin embargo, existe un estudio similar (Broijersen A

et al., 1997), en el que la simvastatina redujo el colesterol total sin modificar la agregabilidad plaquetar *ex vivo*. Tampoco se obtuvo una reducción de la deposición plaquetar *ex vivo* sobre lesión severa y ligera en conejos hiperlipémicos tratados con simvastatina (2,5 mg/kg/día) (Alfón J *et al.*, 1999a). En estudios de trombosis *ex vivo* en pacientes hipercolesterolémicos, la simvastatina (20 mg/día) tampoco inhibió el trombo desencadenado por lesión severa (Lacoste L & Lam JYT, 1996), mientras que en un estudio realizado en condiciones similares sí se obtuvo inhibición, y este efecto se atribuyó a la reducción de los lípidos plasmáticos (Rauch U *et al.*, 2000b). Se ha descrito que la simvastatina administrada a pacientes hipercolesterolémicos reduce la producción de trombina y de varios factores de coagulación reduciendo la coagulación sanguínea (Szczeklik A *et al.*, 1999; Undas A *et al.*, 2001), sin embargo, como se ha comentado previamente en nuestro estudio ni la pravastatina ni la simvastatina modificaron significativamente los parámetros de coagulación. Respecto a la pravastatina, y al igual que en esta tesis, varios trabajos también afirman que inhibe la trombosis. Así, Lacoste L *et al.* (1995, 1996) y Rauch U *et al.* (2000b) obtuvieron una reducción de la trombosis *ex vivo* sobre túnica media porcina (lesión severa) a alta (2546 y 1700 s⁻¹) y baja velocidad de cizalladura (754 s⁻¹) en pacientes hipercolesterolémicos tratados con 40 mg/día de pravastatina, sin embargo esta inhibición la atribuyeron a la reducción del colesterol plasmático, mientras que en otro estudio en humanos se obtuvieron resultados similares, pero no se observó una relación significativa con los niveles de colesterol (Dangas G *et al.*, 2000). Otras estatinas también han demostrado un efecto inhibitorio sobre la trombosis, como la atorvastatina, que inhibió la deposición plaquetaria sobre lesión ligera a alta velocidad de cizalladura (Alfón J *et al.*, 1999a y 1999b) y la activación plaquetaria en ratones normocolesterolémicos (Laufs U *et al.*, 2000); o la fluvastatina, que redujo la agregación plaquetaria *ex vivo* en pacientes hipercolesterolémicos (Oshamah H *et al.*, 1997).

Aunque hay evidencias de que las estatinas puedan tener un efecto sobre la trombosis y la actividad plaquetaria, el mecanismo por el cual ejercen esta acción no está claro. Como se ha comentado, diferentes estudios relacionan el efecto antitrombótico con la disminución de los niveles de lípidos plasmáticos (Lacoste L *et al.*, 1995; Lacoste L *et al.*, 1996; Rauch U *et al.* 2000b; Dangas G *et al.*, 2000), que es el objetivo terapéutico del tratamiento con estatinas. Notarbartolo A *et al.* (1995) describió

una reducción de la excreción urinaria de 11-deshidro-TXB₂, que es un marcador de la biosíntesis del factor proagregante TXA₂, en pacientes con hipercolesterolemia del tipo IIa tratados con simvastatina, en los que la reactividad plaquetar *in vitro* estaba reducida. Esta reducción se correlacionó con la reducción del colesterol total. Sin embargo, hay un estudio que se contradice con éste (Broijersen A *et al.*, 1997), en el cual la simvastatina redujo el colesterol total sin modificar la excreción de 11-deshidro-TXB₂, ni los niveles de β -tromboglobulina (un indicador de la secreción plaquetar), ni la agregabilidad plaquetar *ex vivo*. Por otro lado, existen trabajos que apuntan a una reducción de la relación colesterol/fosfolípidos de la membrana plaquetar debido a su efecto hipolipemiente (Oshamah H *et al.*, 1997; Lijnen P *et al.*, 1996), que se traduce en una menor activación plaquetaria. No obstante, en el mismo estudio en el que se observó una reducción de la relación colesterol/fosfolípidos de la membrana plaquetar acompañada de una menor agregación plaquetar *ex vivo*, en pacientes hipercolesterolémicos tratados con fluvastatina, esta estatina también redujo la agregación *in vitro* (Oshamah H *et al.*, 1997), indicando que el efecto era independiente de los lípidos. Asimismo, otras familias de hipolipemiantes, como los que interfieren la absorción intestinal del colesterol (Schor k *et al.*, 1990) o la secreción hepática de VLDL (Pueyo Palazón C *et al.*, 1998), reducen los lípidos sin modificar la reactividad plaquetar, mientras que en este trabajo hemos obtenido una reducción de la deposición plaquetaria por estatinas sin reducción de los lípidos plasmáticos, lo cual sugiere que la estatinas tienen un efecto directo sobre las plaquetas que es independiente de su acción hipolipemiente.

Previamente se ha comentado que el TF está presente en la circulación sanguínea, contenido en monocitos o libre, y se ha descrito que sus niveles están aumentados en pacientes con riesgo de incidente cardiovascular (Suefuji H, 1997; Key NS, 1998; Giesen PL *et al.*, 1999). En este trabajo hemos demostrado que este *pool* de TF circulante participa activamente en la trombosis desencadenada por lesiones severas (*Estudio con Inhibidor del TF, FFR-rFVIIa*). Las estatinas podrían estar ejerciendo un efecto inhibitorio sobre el TF circulante que reduciría el riesgo protrombótico, ya que se ha descrito que inhiben la expresión de este factor en macrófagos en cultivo y en las lesiones ateroscleróticas (Aikawa M *et al.*, 2001; Baetta R *et al.*, 2002). En este trabajo no se ha determinado directamente el TF en sangre, pero en caso de existir una reducción es posible que se tradujese en una menor de deposición plaquetar sobre lesión

severa sin cambios en lesión ligera. Ya que hemos hallado una reducción de la trombosis en ambos tipos de lesión sin relación con los parámetros de coagulación, el mecanismo apunta hacia un efecto directo sobre la plaqueta sin afectación de la cascada de coagulación.

Al inhibir la HMG-CoA reductasa, las estatinas también reducen la síntesis de los intermediarios de la vía del mevalonato (Goldstein JL & Brown MS, 1990; Van AL & D'Souza-Schorey C, 1997). Alguno de los productos de esta vía son los isoprenoides, como el geranilgeraniol (GGPP), que están implicados en la modificación post-transcripcional de las proteínas. Entre las numerosas proteínas que han de sufrir cambios postranscripcionales para ser funcionales se incluyen las Rho GTPasas (Hall A, 1998). Tras la isoprenalización de Rho, el Rho inactivo situado en el citosol es activado y se transloca a la membrana. Se ha demostrado que las estatinas reducen los niveles de Rho activo en diferentes tipos celulares (Essig M *et al.*, 1998; Laufs U *et al.*, 1999; Amerongen GP *et al.*, 2000), lo que supone una acción independiente a la modulación de los lípidos. Uno de los efectos de la inhibición de la isoprenalización de Rho es el aumento de la expresión de eNOS (Laufs U *et al.*, 1998), enzima responsable de la producción de NO, en diferentes tipos celulares. Este efecto de las estatinas también se ha descrito en trombocitos y plaquetas (Laufs U *et al.*, 2000), acompañado de una reducción de su actividad debido a la mayor producción de NO.

En este estudio hemos observado por primera vez en la literatura que la pravastatina induce una inhibición significativa de los niveles de Rho A activado presente en la membrana plaquetar. La simvastatina también mostró niveles de Rho A activado reducidos respecto al grupo control hiperlipémico. El grado de inhibición de esta proteína se acompañó de la reducción de la deposición plaquetar en las diferentes condiciones (sobretudo en las condiciones de estenosis vascular), lo que indica una cierta relación entre el Rho A activado y la actividad plaquetar. No hemos evaluado los niveles de eNOS en las plaquetas, pero se podría hipotetizar que un aumento en la expresión de eNOS como consecuencia de la reducción de Rho activado, implicaría una menor activación plaquetaria *in vivo* y *ex vivo*, debido a un aumento de la producción de NO. El NO inhibe la activación y agregación plaquetaria ya que incrementa los niveles intraplaquetarios de AMPc (Ånggard E, 1994). Esto concordaría con nuestros resultados de deposición plaquetaria, ya que se observó una reducción con estatinas; pero no con

los obtenidos en la agregación *ex vivo*, donde la respuesta a ADP y colágeno fue similar y no se vio reducida en los grupos tratados (PRP y sangre total).

Rho A en su forma activada también está implicado en el cambio conformacional de las células, necesario para la expresión de receptores de membrana así como su contractibilidad (Chardin P *et al.*, 1989; Mackay DJ & Halls A, 1998; Kaibuchi K *et al.*, 1999), sucesos que se llevan a cabo durante la activación plaquetaria. La unión de agonistas plaquetarios, como la trombina, a los receptores de superficie causan la activación de Rho A (Bodie SL *et al.*, 2001). Rho A participa en la organización del citoesqueleto de actina a través de los complejos de adhesión focal, que son los responsables del anclaje de las integrinas de la superficie plaquetar (Chrzanowska-Wodnicka M & Burridge K *et al.*, 1996). Se ha sugerido que Rho A está implicado en la expresión del receptor GP IIb-IIIa en la superficie de la plaqueta, ya que la adición de exoenzima C3, antagonista de Rho A, inhibe la agregación plaquetaria (Morii N *et al.*, 1992). Los resultados obtenidos en los estudio de trombosis y de agregación *ex vivo* podrían explicarse por la inhibición del Rho A activado. La afectación de esta proteína podría ejercer un efecto de pasivación en las plaquetas, mediante la inhibición del receptor GP IIb-IIIa, y/o alteración en el cambio conformacional, ambos procesos necesarios para la funcionalidad plaquetaria. Tal efecto se revertiría al añadir dosis elevadas de agonistas plaquetarios o sería independiente de las vías de activación plaquetaria por APD o colágeno, en los estudios de agregación *ex vivo*. De hecho, Gachet C *et al.* (1997) sugirió que Rho A no está implicado en la activación plaquetaria por ADP. Sin embargo, los resultados de trombosis sugieren de manera más firme, que estos fármacos ejercen su efecto a través de la interacción plaqueta-pared vascular. Los receptores GP Ib plaquetarios son los responsables de la adhesión de las plaquetas a la superficie vascular lesionada, mediante ligandos como el vWF o el colágeno (Kieffer N & Phillipis DR, 1990). Alfón J *et al.* (1999a, 1999b) obtuvo una reducción de la deposición plaquetaria *ex vivo* sobre lesión ligera a alta velocidad de cizalladura (1700 s^{-1}) en conejos y cerdos hipercolesterolémicos tratados con atorvastatina, y sugirió que esta estatina modificaba la función del receptor GP Ib, aunque no lo pudo demostrar. Ya que Rho A activado participa en el proceso de exteriorización y funcionalidad de diversas integrinas como el receptor GP IIb-IIIa (Morii N *et al.*, 1992), su inhibición por las estatinas podría tener un efecto sobre el receptor plaquetario GP Ib produciendo una alteración en la adhesión

plaquetaria. Recientemente se ha descrito que la integrina plaquetaria GP IIb-IIIa, también llamada integrina $\alpha_{IIb}\beta_3$, además de en la agregación plaquetaria, participa junto a la GP Ib en la adhesión de la plaqueta a la superficie vascular (Yap Cl *et al.*, 2000). Schoenwaelder SM *et al.* (2002) demostraron que Rho A tiene un papel crítico en la regulación de esta integrina plaquetaria, debido a que proporciona estabilidad a la adhesión de la plaqueta a la superficie vascular a altas velocidades de cizalladura. De hecho, los resultados sobre Rho A plaquetario son todavía preliminares y serían necesarios estudios adicionales que demuestraran esta hipótesis.

Respecto al efecto de la hiperlipemia sobre la trombosis, ha sido ampliamente descrita la existencia de un relación entre valores incrementados de colesterol en plasma y un estado de hipercoagulabilidad de la sangre. Lacoste L *et al.* (1995), obtuvieron un aumento de la deposición plaquetaria en pacientes hipercolesterolémicos utilizando un modelo de trombosis *ex vivo* con la cámara de perfusión de Badimon en condiciones de alta velocidad de cizalladura (754 y 2546 s^{-1}). Otros estudios realizados *in vitro* demostraron que las plaquetas procedentes de este tipo de pacientes eran más sensibles a agonistas plaquetarios (Rosenson RS & Lowe GDO, 1998). Badimon JJ *et al.* (1991) también obtuvo mayor deposición plaquetaria a alta velocidad de cizalladura (1700 s^{-1}) en conejos hiperlipémicos, y este efecto se atribuyó a una mayor interacción plaqueta- pared vascular. Numerosos trabajos han demostrado que niveles elevados de LDL incrementan la reactividad plaquetaria en humanos, debido a un incremento de los niveles de TXB₂ (Carvalho AC *et al.*, 1974; Stuart MT *et al.*, 1980; Davi G *et al.*, 1992), y de trombina plaquetarios (Aoki I *et al.*, 1997) de β -tromboglobulina y factor plaquetario 4 en plasma, o de microagregados plaquetarios circulantes (Rosenson RS & Lowe GDO, 1998). Se ha atribuido a un efecto directo de las partículas LDL sobre la plaquetas (Andrews HE *et al.*, 1987; Nofer JR *et al.*, 1997), ya que producen un incremento de la relación colesterol/fosfolípidos de la membrana plaquetar (Oppen C *et al.*, 1995). También se ha descrito un incremento de los niveles plasmáticos de varios factores de la coagulación en pacientes hiperlipémicos, como el factor VIIa, el fibrinógeno y el TF (Rosenson RS & Lowe GDO, 1998). Además, niveles anormalmente incrementados de lípidos y fibrinógeno elevan la viscosidad de la sangre, la cual es más propensa a formar trombos (Rosenson RS & Lowe GDO, 1998). Sin embargo, el hecho que en este trabajo la trombosis no se incrementase por la hiperlipemia en todos los casos, cuestiona la hipótesis preestablecida de que los niveles

elevados de lípidos por sí solos provoquen un estado de hipercoagulabilidad. De hecho, sólo en condiciones de estenosis vascular del 60-70% se obtuvo un incremento de la trombosis en el grupo hiperlipémico control, lo que sugiere que los mecanismos de trombosis en situación de flujo con turbulencias difieren a las de flujo laminar paralelo. Otra explicación podría ser que nuestro modelo sólo tiene un factor de riesgo que es la hiperlipemia, a diferencia de los pacientes humanos, que suelen tener varios (tabaco, hipertensión...), lo que podría explicar que no haya una mayor trombogenicidad de la sangre en todas las condiciones evaluadas. Otro aspecto a tener en cuenta es que otros modelos hiperlipémicos como el conejo, alcanzan niveles de lípidos 4 y 5 veces superiores al modelo porcino, la viscosidad de la sangre en este caso es mucho mayor y también podría estar contribuyendo al estado protrombótico.

Se puede afirmar entonces, que la pravastatina y en menor medida la simvastatina afectan, independientemente de su efecto hipolipemiante, la trombosis desencadenada por lesiones vasculares (erosión y ruptura), probablemente a través de la interacción plaqueta-pared vascular.

DESARROLLO DE LA LESIÓN ATEROSCLERÓTICA

Uno de los efectos más importantes que se atribuye a las estatinas es su capacidad de modificar el tamaño y la composición de la lesión, haciéndola más estable y reduciendo así los episodios trombóticos. Inicialmente se pensó que este efecto estaba relacionado con su acción hipolipemiante, pero los trabajos de los últimos años sugieren que estos efectos son independientes de la reducción de lípidos (efectos pleiotrópicos). Probablemente ambos tipos de efectos contribuyen en la modificación de la lesión aterosclerótica. Recientemente, ha adquirido relevancia la modificación de la composición de la lesión mediante tratamiento farmacológico respecto a la reducción del tamaño de la placa, ya que se han observado beneficios desde el punto de vista clínico sin prácticamente modificación del tamaño de las lesiones (Werner N *et al.*, 2001).

Por ello, como parte de este trabajo, y paralelamente al estudio de la trombosis, se evaluó el efecto de la pravastatina y la simvastatina sobre el desarrollo de las lesiones ateroscleróticas. Trabajos previos en nuestro grupo han demostrado que la administración de dieta hiperlipémica a cerdos durante 50 días es suficiente para obtener un incremento de los lípidos plasmáticos y lesiones tempranas (estría grasa) en el árbol arterial (Pueyo C *et al.*, 1998; Alfón J *et al.* 1999a; Alfón J *et al.* 1999b; Royo T *et al.*, 2000). Por ello, en este estudio se administró una dieta hiperlipémica durante este periodo de tiempo y, una vez obtenidos niveles elevados de lípidos en plasma y lesiones arteriales, se inició el tratamiento con estatinas manteniendo la dieta hiperlipémica (50 días y 100 días).

Se estudiaron varios aspectos clave relacionados con el desarrollo de la aterosclerosis, lo que incluye el tamaño de la lesión -evaluada como extensión de la lesión, engrosamiento de la capa íntima y grado de estenosis vascular-, y algunos de sus componentes, como la infiltración de lípidos, fibrinógeno, CML, macrófagos y TF. También se analizó la expresión de MCP-1, eNOS y Cox (1 y 2) en la pared vascular, todos ellos relacionados con la patología aterosclerótica y la funcionalidad vascular.

Tamaño y Composición de la Lesión

La dieta hiperlipémica indujo el desarrollo de lesiones moderadas (estría grasa) en la aorta y en las coronarias, sobretodo en la aorta torácica donde prácticamente no habían lesiones. El tratamiento con estatinas durante 50 y 100 días no modificó la extensión de la lesión, ni el porcentaje de estenosis vascular ni de engrosamiento de la capa íntima en los vasos evaluados, incluso se obtuvieron lesiones mayores en alguno de los animales tratados con estatinas. Estos resultados sugieren que en el modelo experimental utilizado, que es muy similar al humano, las estatinas no son capaces de inducir cambios en lesiones muy iniciales ya que el estímulo de la hiperlipemia sistémica no se ha modificado. Además, quizás se necesiten periodos de tratamiento superiores para obtener este efecto, tal como se ha descrito en pacientes ateroscleróticos (Crouse III JR *et al.*, 1995; Corti R *et al.*, 2001).

Tanto el grado de estenosis vascular y de engrosamiento de la capa íntima en la aorta abdominal se correlacionaron significativamente (o una tendencia) con el colesterol total y LDL en los animales hiperlipémicos (pravastatina, simvastatina y placebo) tratados durante 50 días, mientras que en los tratados durante 100 días no se obtuvo ningún tipo de relación. En el primer caso, se demuestra una dependencia del desarrollo de la lesión con la concentración de lípidos circulantes, lo cual es lógico ya que las estatinas no produjeron una reducción significativa de éstos. En cambio, al tratar durante 100 días con estatinas se comenzó a observar un efecto hipolipemiante de ambas estatinas, que no se reflejó en la lesión, ya que no estaba reducida en los grupos tratados, y por ello no se obtuvo dependencia entre lípidos y tamaño de la lesión. Tales resultados sugieren que el efecto de las estatinas sobre el tamaño de la lesión aterosclerótica es dependiente de su efecto sobre los lípidos plasmáticos, es decir, es necesaria una reducción sostenida de los lípidos para obtener una regresión de la placa.

Cabría comentar que el engrosamiento de la lesión fue mayor en la coronaria izquierda descendente (LAD) que en la aorta abdominal, y que el grupo normolipémico (de edad correspondiente a los hiperlipémicos) tenía lesiones en la LAD de tamaño similar a los grupos hiperlipémicos, consistente con el hecho de que las lesiones eran muy iniciales. Debido a que las muestras de los vasos se obtuvieron próximas a la bifurcación con el arco aórtico, era esperable hallar lesiones en esta zona en animales normales, fenómeno ampliamente descrito en el cerdo y en humanos (Stary HC *et al.*, 1994).

El modelo utilizado en este trabajo ha intentado simular la situación de la patología aterosclerótica en humanos, ya que el tratamiento se inició una vez se había instaurado la dislipemia. Los resultados de este estudio coinciden con los descritos en varios trabajos realizados con pacientes hipercolesterolémicos, ya que demuestran que es necesario un periodo largo de tratamiento con estatinas para obtener una reducción del tamaño de las lesiones, y normalmente producen reducciones muy poco importantes. Corti R *et al.* (2001) obtuvieron una moderada reducción del área de la capa íntima de la aorta y carótida en pacientes tratados con simvastatina durante 12 meses, pero a los 6 meses de tratamiento todavía no se había detectado modificación de las lesiones, cuando ya existía una reducción de los lípidos plasmáticos. Resultados similares se obtuvieron con la pravastatina en el estudio PLAC-II (Crouse III JR *et al.*, 1995). A diferencia de

nuestro trabajo, en otros estudios en modelos de hiperlipemia en cerdo y conejo, donde el tratamiento con estatinas se inició al mismo tiempo que la dieta, se observó una reducción en la progresión de la lesión a las pocas semanas de tratamiento (4-8) (Ishida F, *et al.*, 1990; Bocan TM *et al.*, 1994; Shiomi M *et al.*, 1995; Harsch M *et al.*, 1996; Alfón J *et al.*, 1999a; Alfón J *et al.*, 1999b), lo que sugiere que las estatinas son mucho más eficientes inhibiendo la progresión de las lesiones ateroscleróticas que no induciendo su regresión una vez ésta se ha desarrollado.

Las lesiones formadas en la LAD y aorta abdominal se componían básicamente de lípido, fibrinógeno, CML y macrófagos, y también había presencia de TF. Se analizó la composición relativa de cada marcador en la placa y su contenido total en el vaso. Esta consideración es importante ya que la cantidad relativa de los diferentes componentes de la lesión determina la estabilidad de la placa. No se obtuvieron modificaciones significativas de la composición de la lesión en los animales tratados con estatinas. Al igual que en lo referente al tamaño de la lesión, se halló una correlación significativa (o una tendencia) entre los niveles plasmáticos de colesterol total y colesterol LDL y los cinco marcadores evaluados en los grupos hiperlipémicos tratados (pravastatina, simvastatina y placebo) durante 50 días. En cambio, este efecto no se observó a los 100 días de tratamiento, lo que corrobora que en el periodo de tratamiento más corto había una dependencia entre la composición de la lesión y los lípidos plasmáticos, mientras que en el periodo más largo ambas estatinas produjeron un efecto a nivel de lípidos plasmáticos mientras que todavía no había efectos evidentes a nivel de la lesión. Estos resultados sugieren, como en el caso del tamaño de la lesión, que es necesaria una reducción de los lípidos en plasma durante un tiempo prolongado para obtenerse cambios en la composición de la lesión. Por otro lado, y como era de esperar, se hallaron valores de correlación elevados entre el tamaño (estenosis vascular y engrosamiento de la capa íntima) y los marcadores de la lesión.

La hipercolesterolemia y otros factores de riesgo inducen disfunción endotelial, que da lugar a una serie de alteraciones de la funcionalidad vascular, entre las que se puede destacar la pérdida del tono vascular y el incremento de la permeabilidad de la pared vascular, lo que favorece la entrada de los lípidos plasmáticos y proteínas como el fibrinógeno. La determinación del fibrinógeno infiltrado da una idea del grado de permeabilidad de la pared vascular. En los animales no hubo una reducción significativa

del fibrinógeno con ninguna de las dosis en los periodos de tiempo estudiados, lo que podría sugerir que no hubo una recuperación de la disfunción endotelial.

La proporción de macrófagos y de CML determina la estabilidad de la placa aterosclerótica, puesto que los macrófagos son los responsables de la secreción de proteasas que digieren la matriz extracelular. La matriz extracelular proporciona estabilidad a la lesión y es sintetizada por las CML (Fuster V *et al.*, 1992b). En el núcleo graso de la placa hay restos de membranas de macrófagos y vesículas secretadas por CML que contienen TF activado (Mallat A, *et al.*, 1999; Schechter AD *et al.*, 2000). En caso de rotura la exposición a la sangre del TF de la lesión produce un estímulo trombogénico muy importante (Toschi V *et al.*, 1997). El estudio inmunohistoquímico mostró colocalización entre CML y macrófagos, y TF, lo que sugiere que una relación entre el TF y ambos tipos celulares.

Hasta ahora no hay una evidencia científica clara en relación al efecto de las estatinas sobre el contenido de lípidos, macrófagos, TF y CML en la placa aterosclerótica, aunque en muchos casos se ha descrito inhibición. Contrariamente a nuestros resultados, Shiomi M *et al.* (1995) observaron una reducción de los macrófagos y de contenido lipídico en las lesiones ateroscleróticas de conejos hiperlipémicos tratados con pravastatina durante 48 semanas (50 mg/kg/día), mientras que el contenido en CML aumentó. En un estudio similar, la pravastatina administrada durante 8 semanas a una menor dosis (2,5 mg/kg/día) no afectó el contenido en macrófagos, en cambio la simvastatina y la fluvastatina sí produjeron una reducción (Bocan TM *et al.*, 1994). Varios trabajos han demostrado que las estatinas lipofílicas, como la simvastatina, atorvastatina o lovastatina, pero no las hidrófilicas, como la pravastatina, reducen la proliferación de CML en las lesiones (Soma MR *et al.*, 1993; Guijarro C *et al.*, 1998; Fukumoto Y *et al.*, 2001). Se ha sugerido que el mecanismo mediante el cual las estatinas producen esta inhibición es a través del bloqueo de la isoprenalización de las Rho GTPasas (Takemoto M & Liao J, 2001). Respecto al TF, hay estudios que demuestran que las estatinas reducen el TF gracias a la inhibición del número y/o activación de los macrófagos en la placa (Aikawa M *et al.*, 2001; Baetta R *et al.*, 2002). Sin embargo y contrariamente a estos trabajos, en nuestro estudio tampoco se obtuvo un efecto claro de las estatinas sobre el contenido de CML ni de TF de la lesión.

Los resultados obtenidos en esta tesis respecto al tamaño de la lesión y su composición, sugieren que las estatinas no tienen efecto a corto plazo y que posiblemente sea necesaria una reducción de los niveles de lípidos plasmáticos previa a la obtención de efectos en la pared vascular.

Expresión Génica de MCP-1, eNOS, Cox-1 y Cox-2 en la Pared Vascular

La aterosclerosis es un proceso complejo de tipo inmunoproliferativo e inflamatorio, que se acompaña de la inducción de enzimas y proteínas diversas implicadas en el proceso inflamatorio. También se acompaña de una alteración de la funcionalidad normal de la pared vascular, lo que implica una inhibición de enzimas y/o de sus substratos relacionados con la fisiología vascular. Por ello, en este trabajo hemos evaluado el efecto de las estatinas sobre la expresión de algunas de estas proteínas, como MCP-1 y Cox-2, ambas relacionadas con el proceso inflamatorio, y eNOS y Cox-1, relacionadas con la funcionalidad vascular.

Como ya se ha comentado, las estatinas pueden inhibir la producción de isoprenoides, los cuales son esenciales para la activación de la transducción del señal, inhibiendo la activación de factores de transcripción. Entre estos últimos se encuentra la proteína nuclear NF- κ B, que está presente en su forma activa en las lesiones ateroscleróticas (Collins T, 1993). Entre los genes regulados por este factor de transcripción se encuentran el MCP-1, VCAM-1, iNOS y Cox-2 (Kopp E & Ghosh S, 1994; Barnes PJ & Karin M, 1997). La inhibición del factor de transcripción NF- κ B por los inhibidores de HMG-CoA reductasa, conferiría a este grupo farmacológico propiedades antiinflamatorias, mecanismo que también se ha sugerido para los salicilatos (Kopp E & Ghosh S, 1994).

MCP-1

MCP-1 es una proteína quimiotáctica de monocitos, que se expresa en células endoteliales, CML, macrófagos y fibroblastos (Rollins BJ, 1991) y que participa activamente en la migración de los monocitos hacia la placa aterosclerótica. MCP-1 se ha detectado en lesiones ateroscleróticas de humanos, conejos (Ylä-Herttuala S *et al.*, 1991) y primates (Yu X *et al.*, 1992).

En nuestro modelo, donde MCP-1 estaba inducido por la hiperlipemia (en toda la aorta abdominal y en la capa superior, íntima y subendotelio), el tratamiento con estatinas durante 50 y 100 días no modificó su expresión en la aorta abdominal. Trabajos previos en nuestro grupo han demostrado que la atorvastatina y la pravastatina reducen la expresión de MCP-1 en la pared vascular de cerdos hiperlipémicos, independientemente de los lípidos plasmáticos (Martínez-González J *et al.*, 2001a). En este estudio el tratamiento se administró conjuntamente con la dieta hiperlipémica, frenando el incremento de los lípidos plasmáticos y el desarrollo de la lesión. Sin embargo, en nuestro estudio, en el cual el tratamiento se administró una vez la hiperlipemia y las lesiones se habían instaurado, no se obtuvo reducción de los lípidos en plasma ni del tamaño de las lesiones. Estas diferencias entre ambos estudios podrían explicar que nosotros no obtengamos una reducción de MCP-1 con las estatinas. Ya que los lípidos fueron similares entre grupos (tratamiento 50 días) o sólo hubo una tendencia a la reducción (tratamiento 100 días), es posible que sea necesario obtener una reducción sostenida de los lípidos para obtener inhibición de MCP-1 acompañándose, o no, de la regresión de la lesión, lo cual sugiere que en caso que existiese un efecto sobre este gen, éste no sería totalmente independiente de los lípidos.

eNOS

La eNOS se expresa de manera constitutiva en el endotelio de los vasos sanguíneos y, junto a la Cox-1, es responsable de mantener el tono vascular (Pollock JS *et al.*, 1991) e inhibir la agregación plaquetaria (Moncada S *et al.*, 1976) mediante la producción de NO. La hipercolesterolemia induce disfunción endotelial, que es uno de

los procesos más tempranos del desarrollo de la lesión aterosclerótica. La disfunción endotelial se acompaña de una reducción de la disponibilidad de NO (Laufs U & Liao JK, 2000; Takemoto M & Liao J, 2001). Se ha sugerido que esta reducción de NO se debe a una menor expresión de eNOS (Lefer AM *et al.*, 2001; Martínez-González *et al.*, 2001c), ya que se ha descrito que las LDL oxidadas, el TNF- α y las condiciones de hipoxia reducen su estabilidad y tiempo de vida media (Laufs U *et al.*, 1998).

En este estudio, la hiperlipemia redujo la expresión de eNOS en la pared vascular de animales tratados durante 50 días, en cambio en los tratados durante 100 días no se observó una reducción significativa, lo cual podría deberse a la variabilidad individual y/o al reducido tamaño de muestra. La dosis de 5 mg/kg/día de simvastatina administrada durante 50 días aumentó significativamente los niveles de eNOS respecto al grupo tratado con placebo en la aorta abdominal. Sin embargo, la dosis de 2,5 mg/kg/día durante 100 días no indujo eNOS en la capa superior de la arteria, incluso este grupo tuvo niveles inferiores al grupo hiperlipémico control. La pravastatina no produjo efecto en ningún caso. Estos resultados sugieren que la menor dosis de simvastatina es inefectiva, o que podría ser un efecto reversible con el tiempo. Diferentes trabajos han demostrado que la simvastatina y otras estatinas aumentan la expresión de eNOS *in vitro* e *in vivo* (Laufs U *et al.*, 1998; Kureishi Y *et al.*, 2000; Laufs U *et al.*, 2000). Además, estudios realizados en nuestro grupo demuestran que la simvastatina induce la expresión de eNOS en células endoteliales, previamente inhibida por concentraciones aterogénicas de LDL nativas (no modificadas) (Martínez-González J *et al.*, 2001c). El mecanismo propuesto consiste en la inhibición de la isoprenalización de Rho por las estatinas, lo cual conlleva un incremento de la expresión de eNOS gracias a la prolongación de su vida media.

Los niveles de eNOS en la capa inferior (túnica media) de la aorta abdominal, fueron muy reducidos respecto a los de la capa superior (endotelio y subendotelio). Su expresión probablemente provenga del endotelio de los pequeños vasos de pared vascular y de los restos de adventicia, lo cual explica las diferencias de expresión en las dos capas de la arteria.

Cox-1 y Cox-2

Como ya se ha comentado previamente, existen dos isoformas de Cox, una constitutiva, la Cox-1, y otra inducible en situaciones de inflamación, la Cox-2. La Cox-1 vascular, expresada básicamente por el endotelio, tiene una función similar a la eNOS en el mantenimiento del tono vascular, mediante la producción de PGI₂ (Smith WL *et al.*, 1996). Sin embargo, hay trabajos que han descrito un incremento de la expresión de Cox-1 en las lesiones ateroscleróticas acompañado de mayores niveles de TXB₂ (Belton *et al.*, 2000). Por otro lado, la expresión de Cox-2 está aumentada en las lesiones ateroscleróticas (Ross R, 1993; Gordon D, 1996; Schönbeck U *et al.*, 1999; Baker C *et al.*, 1999). Esta isoforma es responsable de la síntesis de prostaglandinas inflamatorias en las zonas de inflamación (Simon L, 1999). Aunque, como se ha comentado previamente, recientemente también se atribuye a la Cox-2 un papel en la producción de PGI₂ vascular en condiciones normales y de aterosclerosis (Catella-Lawson F *et al.*, 1999; McAdam BF *et al.*, 1999). De hecho, estudios previos en nuestro grupo han demostrado que las HDL incrementan la producción de PGI₂ en CML a través de la inducción de Cox-2 (Viñals M *et al.*, 1997). Tales observaciones sugieren que el papel de las dos isoformas en la patología aterosclerótica no está claro, y cambian el concepto clásico, en el que a nivel vascular la Cox-1 es beneficiosa y la Cox-2, en cambio, es perjudicial. Esta última podría incluso ejercer un papel protector en la patología aterosclerótica.

En este estudio, los niveles de Cox-1 se redujeron por la hiperlipemia y no se modificaron con las estatinas. En cambio, ni la hiperlipemia ni el tratamiento modificaron los niveles de Cox-1 en la capa inferior del vaso, cuya presencia probablemente proviene del endotelio de pequeños vasos y de las CML de la túnica media (DeWitt *et al.*, 1983). Estos resultados sugieren que la expresión de Cox-1 está disminuida en las lesiones ateroscleróticas, y, al igual que lo que se observó con los salicilatos, las estatinas no ejercen ningún efecto sobre este gen. La reducción de Cox-1 en la íntima vascular de animales hiperlipémicos podría ser indicativa de disfunción endotelial, como ya se ha descrito para eNOS (Lefer AM *et al.*, 2001). Existen pocas publicaciones donde se examine el efecto de la hipercolesterolemia y de las estatinas sobre la Cox-1. Contrariamente a nuestros resultados, en ninguno de los estudios

realizados *in vivo* se ha descrito una reducción de su expresión en la pared vascular aterosclerótica (Schönbeck U *et al.*, 1999; Belton *et al.*, 2000; McGeer P *et al.*, 2002). Sin embargo, hay un estudio *in vitro* donde la expresión de Cox-1 en CML enriquecidas con colesterol estaba reducida (Pomerantz BK *et al.*, 1993). Por lo que se refiere al efecto de las estatinas, y de acuerdo con nuestros resultados, ni la atorvastatina (Hernández-Presa MA *et al.*, 2002), simvastatina (Cipollone F *et al.*, 2003), mevastatina o fluvastatina (Degraeve F *et al.*, 2001) modificaron los niveles de Cox-1 *in vitro* o *in vivo* en conejo.

Respecto a la Cox-2, su expresión en la totalidad de la aorta abdominal no se indujo significativamente en los animales ateroscleróticos, aunque se observó una tendencia. En cambio, en la capa intimal (superior) de la aorta, su expresión estaba significativamente incrementada en los tres grupos hiperlipémicos, y reducida en la capa media (inferior), respecto al grupo normolipémico. Las estatinas no tuvieron efecto significativo sobre la Cox-2 en ningún caso, aunque se obtuvieron valores ligeramente superiores con la pravastatina administrada durante 50 días, y con la simvastatina administrada durante 100 días. Los resultados obtenidos sugieren que la Cox-2 está inducida en las lesiones ateroscleróticas, y que las arterias sanas también la expresan pero básicamente en la túnica media. Como previamente se ha comentado, y coincidiendo con los resultados de este trabajo, varios estudios confirman que la Cox-2 está inducida en las lesiones ateroscleróticas (Ross R, 1993; Gordon D, 1996; Schönbeck U *et al.*, 1999; Baker C *et al.*, 1999), y se expresa en macrófagos y CML. Sin embargo, también se ha observado que la pared vascular no aterosclerótica no expresa Cox-2 (Belton O *et al.*, 2000), aunque hay estudios que coinciden con el nuestro, donde sí se obtiene una expresión basal de este isoenzima (Stemme V *et al.*, 2000). La presencia de Cox-2 en pared vascular no aterosclerótica, probablemente expresada por CML y endotelio, coincide con los resultados obtenidos en aortas de conejos normolipémicos, lo que sugiere un papel fisiológico de este enzima. La menor expresión de Cox-2 en la capa inferior arterial de los vasos ateroscleróticos respecto a vasos sanos es un aspecto que no está claro, y que no ha sido previamente descrito.

Según este estudio las estatinas, a diferencia de la aspirina y triflusal en conejo, parecen no tener un efecto claro sobre la expresión de Cox-2. El efecto de las estatinas sobre la expresión de Cox-2 está muy poco estudiado, y los trabajos publicados son

contradictorios. Degraeve F *et al.* (2001) obtuvieron una inducción de Cox-2 en CML al tratar con estatinas, acompañada de un incremento de la producción de PGI₂, a través de la inhibición de la activación de Rho. Por otro lado, Hernández-Presa MA *et al.* (2002) y Cipollone F *et al.* (2003) describieron una reducción de su expresión en la placa aterosclerótica y en CML en cultivo, y se atribuyó al mismo mecanismo mediante el cual las estatinas reducen la expresión de MCP-1: a través de una menor activación del factor de transcripción NF-κB, causada por la inhibición de la isoprenalización de las proteínas involucradas en la señal de transducción intracelular necesaria para su actividad.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Para confirmar de manera más sólida los resultados obtenidos en los diferentes apartados de esta tesis doctoral, lo más adecuado habría sido partir de un tamaño de muestra superior al utilizado. Debido a la dificultad y al volumen de trabajo que supone llevar a cabo los protocolos experimentales utilizados, así como la limitación en la obtención de determinadas muestras, como es el caso de las aortas humanas, no fue posible tener un tamaño de muestra superior.

En el estudio realizado con FFR-rFVIIa, al evaluar la trombosis sobre aortas ateroscleróticas humanas no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en todos los casos. Esto probablemente se debió a la gran variabilidad obtenida en los resultados de deposición plaquetaria, ya que se utilizaron lesiones ateroscleróticas de diversos grados de severidad debido a la baja disponibilidad de muestras humanas. Además, la utilización de muestras no conservadas de manera óptima también podría haber contribuido a la falta de significación. Las aortas humanas se obtuvieron a partir de autopsias y el tiempo medio entre la muerte de los individuos y la recogida de la muestra osciló entre 15 y 25 horas, pudiendo ser que la mayoría del TF presente se hubiese degradado. De hecho, se intentó localizar TF en la pared vascular, pero los tejidos no eran óptimos para inmunohistoquímica y los resultados no fueron concluyentes.

Por otro lado, en el estudio de la afectación de la expresión de Cox vascular por salicilatos y estatinas, no se puede concluir categóricamente si la síntesis de PGI₂ estaba afectada por el tratamiento, y si existía relación con la Cox-2, ya que no se llevó a cabo la determinación de metabolitos en orina.

En el estudio realizado con estatinas, no se pudo concluir si la falta de efecto de la simvastatina sobre la lesión aterosclerótica a los 100 días de tratamiento, se debió a la menor dosis utilizada respecto al tratamiento de 50 días (2,5 vs. 5 mg/kg/día) o a una ineffectividad del fármaco. Asimismo, el estudio debería ser completado ampliando el periodo de tratamiento, para evaluar posibles efectos de la pravastatina y simvastatina a más largo plazo. Hay que tener en cuenta que las estatinas son fármacos para uso crónico y los ensayos clínicos habitualmente plantean objetivos a 3/5 años de tratamiento para medir efectos en objetivos duros (infarto, isquemia o muerte).

CONCLUSIONES

Basándose en los resultados obtenidos en este trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones para cada uno de los objetivos fijados:

1. Respecto al **Objetivo 1**: Estudio del efecto de un inhibidor de la vía del TF, el FFR-rFVIIa, sobre la aterotrombosis:

- El FFR-rFVIIa bloquea la *vía del TF* de manera dosis-dependiente, ya que alarga el PT sin modificar el aPTT.
- El FFR-rFVIIa, administrado sistémicamente, disminuye la deposición plaquetaria y de fibrina desencadenada por pared vascular sana lesionada severamente, pero no por pared vascular sana con lesión ligera, sin afectar la agregación plaquetar inducida *ex vivo*; por lo que se confirma que el FFR-rFVIIa inhibe la formación de trombina a través de la *vía del TF*, que es el principal mecanismo implicado en la formación del trombo sobre lesiones vasculares severas.
- El FFR-rFVIIa inhibe el TF proveniente de la circulación sanguínea cuando se expone pared vascular sana a la sangre, ya que la aplicación local de FFR-rFVIIa no reduce la deposición plaquetaria (lesión ligera y severa), el TF se localiza en el trombo y no en las estructuras de la pared vascular expuestas a la circulación sanguínea, y hay presencia de actividad procoagulante del TF en sangre que es inhibida por FFR-rFVIIa.
- El FFR-rFVIIa, administrado sistémicamente, disminuye la deposición plaquetaria desencadenada por pared vascular aterosclerótica, lo cual sugiere que este compuesto es efectivo bloqueando el TF contenido en las lesiones ateroscleróticas, además del procedente de la sangre.

2. Respecto al **Objetivo 2**: Estudio del efecto de dos fármacos inhibidores de la Cox plaquetaria, triflusal y aspirina, sobre la aterotrombosis:

- El triflusal, su metabolito HTB, y la aspirina (tratamiento agudo y crónico) reducen el trombo desencadenado por un trombo residual formado sobre pared vascular sana lesionada ligera y severamente (trombo secundario), con una eficacia similar; indicando que en condiciones dependientes de trombina la inhibición de la formación de TXA₂ es efectiva en la reducción de la actividad plaquetaria.
- El triflusal y la aspirina (tratamiento crónico), a dosis antitrombóticas, reducen la expresión de Cox-2 vascular, sin afectación de Cox-1. La presencia de Cox-2 en la pared vascular sana y la confirmación por estudios recientes de su implicación en la síntesis de PGI₂ vascular, sugieren que el efecto antitrombótico obtenido es el resultado del equilibrio entre la inhibición del TXA₂ plaquetar y de la PGI₂ vascular.

3. Respecto al **Objetivo 3**: Estudio del efecto de dos estatinas, pravastatina y simvastatina, sobre la aterotrombosis.

- La pravastatina y simvastatina inhiben la trombogenicidad de la sangre, ya que reducen la deposición plaquetaria desencadenada por pared vascular lesionada ligera y severamente en condiciones de estenosis vascular y de flujo no laminar paralelo. Además, la pravastatina es más potente como antitrombótica que la simvastatina debido a que también inhibe la trombosis en condiciones de flujo laminar paralelo y alta velocidad de cizalladura.

-
- La independencia del efecto antiplaquetar de los niveles plasmáticos de lípidos sugieren un efecto directo sobre la plaqueta. La no modificación de los parámetros de coagulación ni de la agregación plaquetar *ex vivo*, y la reducción de los niveles de Rho A activado en la plaqueta, proteína implicada en la expresión de receptores de adhesión en la superficie, sugieren un mecanismo dependiente de la interacción plaqueta-pared vascular.
 - Ni el tamaño, ni la composición de la lesión vascular en condiciones de dislipemia basal, se modifican al tratar con estatinas durante menos de 100 días. Además, durante los primeros 50 días de tratamiento son dependientes de los niveles plasmáticos de lípidos mientras que a los 100 días de tratamiento, cuando hay una reducción de éstos, ya no existe esta dependencia, lo cual sugiere que las estatinas podrían inducir regresión de la lesión vascular y modificar su composición a más largo plazo mediante su efecto hipolipemiante.
 - En condiciones de dislipemia basal el tratamiento con estatinas durante menos de 100 días, en general, no modifica la expresión de MCP-1, eNOS, Cox-1 y Cox-2 en la pared vascular.

REFERENCIAS

-A-

- Aarts PA, Vander Broeck SA, Prins GW, Kuiken GDC, Sixma J, Meethar RM.** Blood platelets are concentrated near the wall and red blood cells in the center of flowing blood. *Arteriosclerosis* 1988; 8:819-824.
- Abraham E, Reinhart K, Svoboda P, Seibert A, Olthoff D, Dal Nogare A, Postier R, Hempelmann G, Butler T, Martin E, Zwengelstein C, Percell S, Shu V, Leighton A, Creasey AA.** Assessment of the safety recombinant tissue factor pathway inhibitor in patients with severe sepsis: a multicenter, randomized, placebo-controlled, single-blind, dose escalation study. *Crit Care Med* 2001; 29:2081-2089.
- Adams PC, Badimon JJ, Badimon L, Chesebro JH, Fuster V.** Role of platelets in atherogenesis: relevance to coronary arterial restenosis after angioplasty. *Cardiovasc Clin* 1987; 18:49-71.
- Aikawa M, Rabkin E, Sugiyama S, Voglic SJ, Fukumoto Y, Furukawa Y, Shiomi M, Schoen FJ, Libby P.** An HMG-CoA reductase inhibitor, cerivastatin, suppresses growth of macrophages expressing matrix metalloproteinases and tissue factor in vivo and in vitro. *Circulation* 2001; 103:276-283.
- Alfón J, Pueyo Palazón C, Royo T, Badimon L.** Effects of Statins in Thrombosis and Aortic Lesion Development in a Dyslipemic Rabbit Model. *Thromb Haemost* 1999a; 81:822-877.
- Alfón J, Royo T, García-Moll X, Badimon L.** Platelet deposition on eroded vessel walls at a stenotic shear rate is inhibited by lipid-lowering treatment with atorvastatin. *Arterioscl Thromb Vasc Biol* 1999b; 19:1812-1817.
- Alfón J.** Modulación de la aterotrombosis mediante inhibidores de la HMG-CoA reductasa. *Tesis Doctoral* 1998.
- Amerongen GP, Delft S, Vermeer MA, Collard JG, van Hinsbergh VW.** Activation of Rho A by thrombin in endothelial hypermeability: role of rho kinase and protein tyrosine kinases. *Circ Res* 2000; 87:335-340.
- Armstrong ML, Heistad DD.** Animal models of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1990; 85:15-23.
- Andreeva ER, Pugach IM, Orekhov AN.** Collagen-synthesizing cells in initial and advanced atherosclerotic lesions of human aorta. *Atherosclerosis* 1997; 130:133-142.
- Andrews HE, Aitken JW, Hassal DG, Skinner VO, Bruckdorfer KR.** Intracellular mechanisms in the activation of human platelets by low-density lipoproteins. *Biochem J* 1987; 242:559-564.
- Änggård E.** Nitric Oxide; mediator, murderer and medicine. *Lancet* 1994; 343:1199-1206.
- Antiplatelet Trialists' Collaboration.** Collaborative overview of randomized trials of antiplatelet therapy. I. Prevention of death, myocardial infarction, and stroke by prolonged antiplatelet therapy in various categories of patients. *Br Med J* 1994; 308:81-106.
- Antiplatelet Trialists' Collaboration.** Secondary prevention of vascular disease by prolonged antiplatelet treatment. *Br Med J* 1988; 296:320-331.
- Antithrombotic Trialists' Collaboration.** Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *Br Med J* 2002; 324:71-86.
- Antman EM, TIMI 9^a Investigators.** Hirudin in acute myocardial infarction: Safety report from the Thrombolysis and Thrombin Inhibition in Myocardial Infarction (TIMI) 9^a Trial. *Circulation* 1994; 90:1624-1630.

Aoki I, Aoki N, Kawano K, Shimoyama K, Maki A, Homori M, Yanagisawa A, Yamamoto M, Kawai Y, Ishikawa K. Platelet-dependent generation in patients with hiperlipidemia. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:91-96.

Arnljots B, Söderström T, Ezban M, Hedner U. Effect of locally-applied active site-blocked activated factor VII (ASIS) on experimental arterial thrombosis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 2000, 11: 145-148.

Arnljots B, Ezban M, Hedner U. Prevention of experimental arterial thrombosis by topical administration of active site-inactivated factor VII. *J Vasc Surg* 1997; 25:341-346.

Asada Y, Hara S, Tsuneyoshi A, Hatekayama K, Kisanuki A, Marutsaka K, Sato Y, Kamikubo Y, Simiyoshi A. Fibrin-rich and platelet-rich thrombus formation on neointima: Recombinant tissue factor pathway inhibitor prevents fibrin formation and neointimal development following reated balloon injury of rabbit aorta. *Thromb Haemost* 1998; 80:506-511.

Ashton JH, Benedict CR, Fitzgerald C, Raheja S, Taylor A, Campbell WB, Buja LM, Willerson JT. Serotonin as a mediator of cyclic flow variations in stenosed canine coronary arteries. *Circulation* 1986; 73:572-578.

-B-

Badimon JJ, Badimon L, Galvez A, Dische R, Fuster V. High density lipoprotein plasma fractions inhibit aortic fatty streaks in cholesterol-fed rabbits. *Lab Invest* 1989; 60:455-461.

Badimon JJ, Badimon L, Turitto VT, Fuster V. Platelet deposition at high shear rates is enhanced by high plasma cholesterol levels. In vivo study in the rabbit model. *Arterioscler Thromb* 1991; 11: 395-402.

Badimon JJ, Fuster V, Chesebro JH, Badimon L. Coronary Atherosclerosis: A multifactorial disease. *Circulation* 1993; 87: II-3-II-16.

Badimon JJ, Lettino M, Toschi V, Fuster V, Berrozpe M, Chesebro J, Badimon L. Local inhibition of tissue factor reduces the thrombogenicity of disrupted human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1999; 99:1780-1787.

Badimon JJ, Meyer B, Feigen LP, Baron DA, Chesebro JH, Fuster V, Badimon L. Thrombosis triggered by severe arterial lesions is inhibited by oral administration of glycoprotein IIb/IIIa antagonist. *Eur J Clin Invest* 1997; 27:568-574.

Badimon L. Atherosclerosis and thrombosis: lessons from animal models. *Thromb Haemost* 2001; 86:356-365.

Badimon L, Badimon JJ, Fuster V. Thrombogenesis and inhibition of platelet aggregation. Experimental aspects and future approaches. *Z Kardiol* 1990a; 79:133-145.

Badimon L, Badimon JJ, Galvez A, Chesebro JH, Fuster V. Influence of arterial damage and wall shear rate on platelet deposition. Ex vivo study in a swine model. *Arteriosclerosis* 1986; 6:312-320.

Badimon L, Badimon JJ, Lassila R, Heras M, Chesebro JH, Fuster V. Thrombin inhibition by hirudin decreases platelet thrombus growth on areas of severe vessel wall injury. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13:145a. Abstract.

Badimon L, Badimon JJ. Mechanism of arterial thrombosis in non-parallel streamlines: Platelet grow at the apex of estenotic severely injured vessel wall. Experimental study in the pig model. *J Clin Invest* 1989; 84:1134-1144.

Badimon L, Badimon JJ, Penny W, Webster MW, Chesebro JH, Fuster V. Endothelium and atherosclerosis. *J Hypertension* 1992a; 10:43-50.

- Badimon L, Chesebro JH, Badimon J.J.** Thrombus formation on ruptured atherosclerotic plaques and rethrombosis on involving thrombi. *Circulation* 1992b; 86:74-85.
- Badimon L, Lassila R, Badimon JJ, Fuster V.** An acute surge of epinephrine stimulates platelet deposition to severely damaged vascular substrate. *J Am Coll Cardiol* 1990b; 15:181a. Abstract.
- Badimon L, Lassila R, Badimon JJ, Vallabhajosula S, Chesebro JH, Fuster V.** Residual thrombus is more thrombogenic than severely damaged vessel wall. *Circulation* 1988; 78:119, #0474. Abstract.
- Badimon L, Martínez J, Badimon JJ.** Hemostasia primaria. En: Trombosis, fármacos antitrombóticos y enfermedad cerebrovascular. Ed: Castillo J, Martínez-Vila E. *J. Uriach & Cia*, Barcelona 1995, pp.21-39.
- Badimon L, Martínez J, Royo T, Lassila R, Badimon JJ.** A sudden increase in plasma epinephrine levels transiently enhances platelet deposition on severely damaged arterial wall. Studies in porcine model. *Thromb Haemost* 1999; 82:1736-1742.
- Badimon L, Meyer BJ, Badimon JJ.** Thrombin in arterial thrombosis. *Haemostasis* 1994; 24:69-80.
- Badimon L, Turitto V, Rosemark JA, Badimon JJ, Fuster V.** Characterization of a tubular flow chamber for studying platelet interaction with biologic and prosthetic materials: Deposition of indium 111-labeled platelets on collagen, subendothelium, and expanded polytetrafluoroethylene. *J Lab Clin Med* 1987; 110:706-718.
- Baetta R, Camera M, Comparato C, Altana C, Ezekowitz MD, Tremoli E.** Fluvastatin reduces tissue factor expression and macrophage accumulation in carotid lesions of cholesterol-fed rabbits in the absence of lipid lowering. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:692-698.
- Baeuerle P, Baltimore D.** NF-kappa B: ten years after. *Cell* 1996; 87:13-20.
- Bahadori L, Milder J, Gold L, Botney M.** Active macrophage-associated TGF-beta colocalizes with type I procollagen gene expression in atherosclerotic human pulmonary arteries. *Am J Pathol* 1995; 146:1140-1149.
- Baker C, Hall R, Evans T, Pomerance A, Maclouf J, Creminon C, Yacoub M, Polak J.** Cyclooxygenase is widely expressed in atherosclerotic lesions affecting native and transplanted human coronary arteries and colocalizes with inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine particularly in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19:646-655.
- Barrios-Rodiles M, Keller K, Belley A, Chadee K.** Nosteroidal antiinflammatory drugs inhibit cyclooxygenase enzyme activity but no mRNA expression in human macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 225:896-900.
- Barnes PJ, Karin M.** Nuclear factor- κ B: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* 1997; 336:1066-1071.
- Bauer KA.** Activation of the factor VII-tissue factor pathway. *Thromb Haemost* 1997; 78:108-111.
- Baumgartner HR, Muggli R, Tschopp TB, Turitto VT.** Platelet adhesion, release and aggregation in flowing blood: effects of surface properties and platelet function. *Thromb Haemost* 1976; 35:124-138.
- Baumgartner HR.** The role of blood flow in platelet adhesion, fibrin deposition and formation of the mural thrombi. *Microvas Res* 1973; 5:167-179.
- Bayón Y, Alonso A, Sánchez-Crespo M.** 4-fluoromethyl derivatives of salicylate, triflusal and its main metabolite 2-hidroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid, are potents inhibitors of nuclear factor κ B activation. *Brith J Pharmacol* 1999; 126:1359-1366.
- Beckman JS, Crow JP.** Pathological implications of nitric oxide, superoxide and peroxynitrite formation. *Biochem Soc Trans* 1993; 21:330-334.

- Belton O, Byrne D, Kearney D, Leahy A, Fitzgerald DJ.** Cyclooxygenase-1 and -2- dependent prostacyclin formation in patients with atherosclerosis. *Circulation* 2000; 102:840-846.
- Berg K.** A new serum system in man-the LP system. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1963; 59:369-382.
- Björkerud S, Björkerud B.** Growth-stimulating effect of lipoproteins on human arterial smooth-muscle cells and lung fibroblasts is due to apo B-containing lipoproteins, type LDL and VLDL, and requires LDL receptors. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1268:237-247.
- Blann AD, Kirkpatrick U, Devine C, Naser S, McCollum CN.** The influence of acute smoking on leucocytes, platelets and the endothelium. *Atherosclerosis* 1998; 141:133-139.
- Bodie SL, Ford I, Greaves M, Nixon GF.** Thrombin-induced activation of Rho A in platelet shape change. *Biochem Biophys Res Com* 2001; 287:71-76.
- Bocan TMA, Mazur MJ, Mueller SB, Brown EQ, Sliskovic DR, O'Brien PM, Creswell MW, Lee H, Uhlendorf PD, Roth BD, Newton RS.** Antiatherosclerotic activity of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A in cholesterol-fed rabbits: a biochemical and morphological evaluation. *Atherosclerosis* 1994; 11:127-142.
- Boers GH.** Hyperhomocysteinemia as a risk factor for arterial and venous disease. A review of evidence and relevance. *Thromb Hemost* 1997; 78:520-522.
- Bombeli T, Schwartz BR, Harlam JM.** Adhesion of activated platelets to endothelial cells : evidence for a GPIIb-IIIa-dependent bridging mechanism and novel roles for endothelial intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), $\alpha_v\beta_3$ integrin, and GPIba. *J Exp Med* 1998; 187:329-339.
- Bonita R.** Epidemiology of stroke. *Lancet* 1992; 339: 342-344.
- Bourcier T, Libby P.** HMG-CoA reductase inhibitors reduce plasminogen activator inhibitor-1 expression by human vascular smooth muscle and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20:556-562.
- Bourgain RH, Vermarien H, Andries R, Vereecke F, Jacqueloot J, Blockel E, Six F.** A standardized in vivo model for the study of experimental arterial thrombosis. Description of a method. *Adv Exp Med Biol* 1984; 180:635-650.
- Brakman P, Kluft C.** Plasminogen activation. In: Fibrinolysis, in tissue remodeling and in development. *Ann NY Acad Sci*, vol 667. New York, 1992.
- Brand K, Page S, Rogler G, Bartsch A, Brandl R, Knuechel R, Page M, Kaltschmidt C, Baeuerle PA, Neumeier D.** Activated transcription factor nuclear factor-kappa B is present in the atherosclerotic lesion. *J Clin Invest* 1996; 97:1715-1722.
- Brass LF, Hoxie JA, Fieber-Emmons T.** Agonists receptors and G proteins as mediators of platelet activation. *Platelets* 1994; 5:130-134.
- Bredt DS, Hwang PM, Galtt CE, Lowenstein C, Reed RR, Snyder SH.** Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* 1991; 351:714-718.
- Broijersen A, Eriksson M, Leijed B, Angelin B, Hjemdahl P.** No influence of simvastatin treatment on platelet function in vivo in patients with hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:273-278.
- Brown MS, Goldstein JL.** Scavenging for receptors. *Nature* 1990; 343:508-509.
- Buchwald H, Campos CT, Boen JR, Nguyen PA, Williams SE.** Disease-free intervals after partial ilial bypass in patients with coronary heart disease and hipercolesterolemia: reports from the program on the surgical control of the hyperlipidemias (POSCH). *J Am Coll Cardiol* 1995; 26:351-357.

Burch RM, Axelrod J. Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A₂. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84:6374-6378.

Burnett JR, Wilcox LJ, Telford DE, Kleinstiver SJ, Barrett PH, Newton RS, Huff MW. Inhibition of HMG-CoA reductase by atorvastatin decreases both VLDL and LDL apolipoprotein B production in miniature pigs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2589-2600.

Bustos C, Hernández-Presa MA, Ortego M, Tuñón J, Ortega L, Pérez F, Días C, Hernández G, Egido J. HMG-CoA reductase inhibition by atorvastatin reduces neointimal inflammation in a rabbit model of atherosclerosis. *JACC* 1998; 32:2057-2064.

-C-

Camejo G, Camejo EH, Olsson U, Bondjers G. Proteoglycans and lipoproteins in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1993; 4:385-391.

Camerer E, Kolsto AB, Prydz H. Cell biology of tissue factor, the principal initiator of blood coagulation. *Thromb Res* 1996; 81:1-41.

Carmeliet P, Collen D. Tissue factor. *Int J Biochem Cell Biol* 1998; 30:661-667.

Carroll KK, Guthrie N, Ravi K. Dolichol: function, metabolism, and accumulation in human tissues. *Biochem Cell Biol* 1992; 70:382-384.

Carvalho ACA, Colman RW, Lees RS. Platelet function in hyperlipoproteinemia. *N Engl J Med* 1974; 290:434-438.

Castillo J, Rodríguez JR, Suárez C. Ácido acetilsalicílico. En: Trombosis, fármacos antitrombóticos y enfermedad cerebrovascular. Ed: Castillo J, Martínez-Vila E. *J. Uriach & Cia*, Barcelona 1995, pp.175-192.

Catella-Lawson F, McAdam BW, Morrison BW, Kapoor S, Kujubu D, Antes L, Lasseter KC, Quan H, Gertz BJ, FitzGerald GA. Effects of selective inhibition of cyclooxygenase II on sodium balance, hemodynamics, and vasoactive eicosanoids. *J Pharm Exp Ther* 1999; 289:735-741.

Catella-Lawson F, Crofford LJ. Cyclooxygenase inhibition and thrombogenicity. *Am J Med* 2001; 110:28-32.

Cawthron KM, Van't Veer C, Lock JB, Di Lorenzo ME, Branda RF, Mann KG. Blood coagulation in hemophilia A and hemophilia C. *Blood* 1998; 91:4581-4592.

Chardin P, Boquet P, Madaule P, Popoff MR, Rubin EJ, Gill DM. The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by Clostridium botulinum exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. *EMBO J* 1989; 8:1087-1092.

Cheresh DA, Berliner SA, Vincente V, Ruggeri ZM. Recognition of distinct adhesive sites on fibrinogen by related integrins on platelets and endothelial cells. *Cell* 1989; 58:945-953.

Chesebro JH, Fuster V. The therapeutic challenge of plaque rupture: Value of biochemical markers. *J Am Coll Cardiol* 1987; 10:1005.

Chomczynski P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *BioTechniques*, 1993; 15:532-537.

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-159.

Chrzanowska-Wodnicka M, Burridge K. Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions. *J Cell Biol* 1996; 133:1403-1415.

Cipollone F, Fazio M, Iezzi A, Zucchelli M, Pini B, De Cesare D, Uchino S, Spigonardo F, Bajocchi G, Bei R, Muraro R, Artese L, Piattelli A, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A. Suppression of the functionally coupled cyclooxygenase-2/prostaglandin E synthase as a basis of simvastatin-dependent plaque stabilization in humans. *Circulation* 2003; 107:1479-1485.

Clark EA, Brugge JS. Integrins and signal transduction pathways: The road taken. *Science* 1995; 268:233-239.

Coggins JR, Kray W, Shaw E. Affinity labelling of proteinases with tryptic specificity by peptides with C-terminal lysine chloromethyl ketone. *Biochem J* 1974; 137:579-585.

Collins T. Endothelial nuclear factor- κ B and the initiation of the atherosclerotic lesion. *Lab Invest* 1993; 68:499-508.

Colman RW, Walsh PN. Mechanisms of platelet aggregation. En: Haemostasis and Thrombosis. Ed: Colman RW, Hirsh J, Marder VJ, Salzman EW. *Lippincott Co.*, Philadelphia, 1987; pp. 594-605.

Conde K, Pineda G, Newton, Fernández ML. Hypocholesterolemic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors in the guinea pig. *Biochem Pharmacol* 1999; 58:1209-1219.

Cooke JP, Tsao PS. Go with the flow. *Circulation* 2001; 103: 2773-2775.

Cooke JP, Tsao PS. Is NO an endogenous antiatherogenic molecule? *Arterioscler Thromb* 1994; 14:653-655.

Corti R, Fayad ZA, Fuster V, Worthley SG, Helft G, Chesebro J, Mercuri M, Badimon JJ. Effects of lipid-lowering by simvastatin on human atherosclerotic lesions: a longitudinal study by high-resolution, noninvasive magnetic resonance imaging. *Circulation* 2001;104:249-252.

Courtman DW, Schwartz SM, Hart CE. Sequential injury of the rabbit abdominal aorta induce intramural coagulation and luminal narrowing independent of intimal mass: extrinsic pathway inhibition eliminates luminal narrowing. *Circ Res* 1998; 82:996-1006.

Creager MA, Cooke JP, Mendelsohn ME, Gallagher SJ, Coleman SM, Loscalzo J, Dzau VJ. Impaired vasodilation of forearm resistance vessels in hypercholesterolemic humans. *J Clin Invest* 1990; 86:228-234.

Crouse III JR, Byington RP, Bond MG, Espeland MA, Craven TE, Sprinkle JW, McGovern ME, Furberg CD. Pravastatin, Lipids, and Atherosclerosis in the Carotid Arteries (PLAC-II). *Am J Cardiol* 1995; 75:455-459.

Cruz-Fernández JM, Bescos-López L, García-Dorado D, López García-Aranda V, Cabades A, Martí-Jadraque L, Velasco JA, Castro-Beiras A, Torres F, Marfil F, Navarro E. Randomized comparative trial of triflusal and aspirin following acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2000; 21:457-465.

Cruz JP, Mata JM, Sánchez de la Cuesta F. Triflusal vs aspirin on the inhibition of human platelet and vascular cyclooxygenase. *Gen Pharmacol* 1992; 23:297-300.

Cruz JP, Sánchez de la Cuesta F. Triflusal. En: Trombosis, fármacos antitrombóticos y enfermedad cerebrovascular. Ed: Castillo J, Martínez-Vila E. *J. Uriach & Cia*, Barcelona 1995, pp.21-39.

Cruz JP, Villalobos MA, García PJ, Smith-Agreda JM, Sanchez de la Cuesta. Ex vivo effect of triflusal on platelet vessel wall interaction. *Eur J Clin Pharmacol* 1995; 47:497-502.

Cybulsky MI, Grimbone MAJ. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991; 251:788-791.

-D-

Dangas G, Smith DA, Unger AH, Shao JH, Meraj P, Fier C, Cohen AM, Fallon JT, Badimon JJ, Ambrose JA. Pravastatin: an antithrombotic effect independent of the cholesterol-lowering effect. *Thromb Haemost* 2000; 83:688-692.

Davi G, Averna M, Catalan I, Barbagallo C, Ganci A, Nobartolo A, Ciabattini G, Patrono C. Increased thromboxane biosynthesis in type IIa hypercholesterolemia. *Circulation* 1992; 85:1792-1798.

Davies NM, Sharkey KA, Asfaha S, Macnaughton WK, Wallace JL. Aspirin causes rapid up-regulation of cyclo-oxygenase expression in the stomach of rats. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11:1101-1108.

Davies SW, Marchant B, Lyons JP, Timmis AD, Rothman MT, Layton CA, Balcon R. Coronary lesion morphology in acute myocardial infarction: demonstration of early remodeling after streptokinase treatment. *J Am Coll Cardiol* 1990; 16:1079-1086.

Degraeve F, Bolla M, Blaie S, Créminon C, Quere I, Boquet P, Lévy-Toledano S, Bertoglio J, Habib A. Modulation of COX-2 expression by statins in human aortic smooth muscle cells. *J Biol Chem* 2001; 276:46849-46855.

De Jong SC, van den Berg M, Rauwerda JA, Stehouwer CD. Hyperhomocysteinemia and atherothrombotic disease. *Semin Thromb Haemost* 1998; 24:381-385.

DeWitt DL, Day JS, Sonnenburg WK, Smith WL. Concentrations of prostaglandin endoperoxide synthase and prostaglandin I₂ synthase in the endothelium and smooth muscle of bovine aorta. *J Clin Invest* 1983; 72:1882-1888.

DiCorleto PE, Gimbrone MA Jr. Vascular endothelium. En: *Atherosclerosis and coronary disease*. Eds: Fuster V, Ross R, Topol EJ. *Lippincott-Raven*, Philadelphia 1996, pp387-389.

Doherty PW, Bushberg JT, Lipton MJ, Meares CF, Goodwin DA. The use of indium-111-labeled leukocytes for abscess detection. *Clin Nucl Med* 1978;3:108-110.

Drake TA, Ruf W, Morrissey JH, Edgington TS. Functional tissue factor is entirely cell surface expressed on lipopolysaccharide-stimulated human blood monocytes and a constitutively tissue factor-producing neoplastic cell line. *J Cell Biol* 1989; 109:389-395.

-E-

Edelberg JM, Gonzalez-Gronow M, Pizzo SV. Lipoprotein (a) inhibition of plasminogen activation by tissue-type plasminogen activator. *Thromb Res* 1990; 57:155-162.

Edgington T, Mackman N, Brand K, Ruf W. The structural biology of expression and function of tissue factor. *Thromb Haemost* 1991; 66:67-79.

Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res* 1992; 33:1569-1582.

Erhardsten E, Nilsson P, Johannessen M, Thomsen M. Pharmacokinetics and safety of FFR-rFVIIa after single doses in healthy subjects. *J Clin Pharmacol* 2001; 41:880-885.

Escolar G, Krumwiede M, White JG. Organization of the actin cytoskeleton of resting and activated platelets in suspension. *Am J Pathol* 1986; 123:86-94.

Essig M, Nguyen G, Prie, Escolubet B, Sraer JD, Friedlander G. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors increase fibrinolytic activity in rat aortic endothelial cells. Role of geranylgeranylation and Rho proteins. *Circ Res* 1998; 83:683-690.

-F-

Falk E. Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi. *Brit Heart J* 1983; 50:127-134.

Falk E. Unstable angina with fatal outcome: dynamic coronary thrombosis leading to infarction and/or sudden death. *Circulation* 1985; 132:6-13.

Feng L, Sun W, Xia Y, Tang WW, Chanmugam P, Soyoola E, Wilson CB, Hwang. Cloning two isoforms of rat cyclooxygenase: differential regulation of their expression. *Arch Biochem Biophys* 1993; 307:361-388.

Fernandez de Arriba A, Cavalcanti F, Miralles A, Bayón Y, Alonso A, Merlos M, García-Rafanell J, Forn J. Inhibition of cyclooxygenase expression by 4-trifluoromethyl derivatives of salicylate, triflusal, and its deacetylated metabolite, 2-hydroxy-4-trifluoromethylbenzoic acid. *Mol Pharm* 1999; 55:753-760.

Fernández-Ortiz A, Badimon JJ, Falk E, Fuster V, Meyer B, Mailhac A, Weng D, Shah PK, Badimon L. Characterization of the relative thrombogenicity of atherosclerotic plaque components: implications for consequences of plaque rupture. *J Am Coll Cardiol* 1994; 23:1462-1569.

Ferns GAA, Raines EW, Sprugel KH, Montani AS, Reidy MA, Ross R. Inhibition of neointimal smooth muscle accumulation after angioplasty by an antibody to PDGF. *Science* 1991; 253:1129-1132.

Fitzgerald GA, Lupinetti M, Charman SA, Charman WN. Presystemic acetylation of platelet by aspirin: reduction in rate of drug delivery to improve biochemical selectivity for thromboxane A₂. *J Pharmacol Exp Ther* 1991; 259:1043-1049.

Fitzgerald DJ, Fitzgerald GA. Role of thrombin and thromboxane A₂ in reocclusion following coronary thrombolysis with tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:7585-7589.

Fitzgerald LA, Philips DR. Calcium regulation of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem* 1985; 260:11366-11376.

Folts JD, Gallagher K, Rowe GG. Blood flow reductions in stenosed canine coronary arteries: vasospasm or platelet aggregation? *Circulation* 1982; 65:248-255.

Folts JD, Schafer AI, Loscalzo J, Willerson JT, Muller JE. A perspective on the potential problems with aspirin as antithrombotic agent: a comparison of studies in an animal model with clinical trials. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33:295-303.

Fox JE, Aggerbeck LA, Berndt MC. Structure of the glycoprotein Ib-IX complex from platelet membranes. *J Biol Chem* 1988; 263:4882-4890.

Francis CW, Markham RE Jr, Barlow GH, Florack TM, Dobrzynski DM, Marder VJ. Thrombin activity of fibrin thrombi and soluble plasmin derivatives. *J Lab Clin Med* 1983; 102: 220-230.

Freedman D, Newman WI, Tracy R. Black-white differences in aortic fatty streaks in adolescence and early adulthood: the Bogalusa heart study. *Circulation* 1988; 77:856-864.

Frick MH, Elo O, Haapa K, Heinonen OP, Heinsalmi P, Helo P, Huttunen JK, Kaitainiemi P, Koskinen P, Manninen V, Häenpää H, Mänttari M, Norola S, Pasternak A, Pikkarainen J, Romo M, Sjöblom T, Nikkilä E. Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary Herat disease. *N Engl Med* 1987; 317:1237-1245.

Frohman MA, Dush MK, Martin GR. Rapid production of full length cDNAs from rare transcripts: amplification of a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:8998-9002.

Fukumoto Y, Libby P, Rabkin E, Hill CC, Enomoto M, Hirouchi Y, Shiomi M, Aikawa M. Statins alter smooth muscle cell accumulation and collagen content in established atheroma of watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Circulation* 2001; 103:993-999.

Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing factor and contracting factor. *FASEB J* 1989; 3:2007-2018.

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. (Part I) *N Eng J Med* 1992a; 326:242-250.

Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. (Part II) *N Eng J Med* 1992b; 326:310-331.

Fuster V, Badimon L, Cohen M, Ambrose JA, Badimon JJ, Chesebro JH. Insights into the pathogenesis of acute ischemic syndromes. *Circulation* 1988; 77:1213-1220.

Fuster V, Chesebro JH, Fry RL, Elveback LR. Platelet survival and the development of coronary artery disease in the young adult: effects of cigarette smoking, strong family history and medical therapy. *Circulation* 1981; 63:546-551.

Fuster V, Fallon JT, Badimon JJ, Nemerson Y. The unstable atherosclerotic plaque: clinical significance and therapeutic intervention. *Thromb Haemost.* 1997;78:247.

Fuster V, Fallon JT, Nemerson Y. Coronary thrombosis. *Lancet.* 1996; 348:7-10.

Fuster V, Stein B, Badimon L, Badimon JJ, Ambrose JA, Chesebro JH. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis: involving concepts. *Circulation* 1990; 82:47-59.

-G-

Gachet C, Payrastre B, Guinebault C, Trumel C, Ohlmann P, Mauco G, Cazenave JP, Plantavid M, Chap H. Reversible translocation of phosphoinositide 3-kinase to the cytoskeleton of ADP-aggregated human platelets occurs independently of Rho A and without synthesis of phosphatidylinositol (3,4)-bisphosphate. *J Biol Chem* 1997; 272:4850-4854.

García-Rafanell J, Ramis J, Gómez L, Forn J. Effect of triflusal and other salicylic acid derivatives on cyclic AMP levels in rat platelets. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1986; 284:155-165.

Gálvez A, Badimon L, Badimon JJ, Fuster. Electrical aggregometry in whole blood from human, pig, and rabbit. *Thrombosis Haemost* 1986; 56:128-132.

Geng YJ, Holm J, Nygren S, Bruzelius M, Stemme S, Hansson GK. Expression of the macrophage scavenger receptor in atheroma. Relationship to immune activation and the T-cell cytokine interferon-gamma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1995-2002.

Giesen PL, Rauch U, Bohrmann B, Kling D, Roque M, Fallon JT, Badimon JJ, Hember J, Riederer MA, Nemerson Y. Blood-borne tissue factor: another view of thrombosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:2311-2315.

- Girard TJ, Warren LA, Novotny WF, Likert KM, Brown SG, Miletich J.** The lipoprotein-associated coagulation inhibitor. *Nature* 1989; 338:518-520.
- Girerd XJ, Hirsch AT, Cooke JP, Dean VJ, Creage MA.** L-arginine augments endothelium-depenent vasodilation in cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 1990, 67:1301-1308.
- Goldstein JL, Brown MS.** The low density lipoprotein pathway and its relation to atherosclerosis. *Annu Rev Biochem* 1977; 46:897-930.
- Goldstein JL, Brown MS.** Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 1990; 343:425-430.
- Golino P, Ragni M, Cirillo P, D'Andrea D, Ravera A, Calabro P, Ezban M, Tommasini P, Scognamiglio M.** Effects of recombinant active site-blocked activated factor VII in rabbit models of carotid stenosis and myocardial infarction. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2000, 11:149-158.
- Golino P, Ragni M, Cirillo P, D'Andrea D, Scognamiglio A, Ravera A, Buono C, Ezban M, Corcione N, Vigorito F, Condorelli M, Chiarello M.** Antithrombotic effects of recombinant human, active site-blocked factor VIIa in a rabbit model of recurrent arterial thrombosis. *Circ Res* 1998; 82:39-46.
- Goodwin DA, Busberg TJ, Doherty PW, Lipton MJ, Conley FK, Diamanti CI, Meares CF.** Indium-111 labelled autologous platelets for location of vascular thrombi in humans. *J Nucl Med* 1978; 19:626-634.
- Gordon DJ, Probstfield JL, Garrison RJ, Neaton JD, Castelli WP, Jacobs JD Jr, Bangdiwala S, Tyroler HA.** High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. *Circulation* 1989; 79:8-15.
- Gordon D.** Transplanted atherosclerosis. In: Fuster V, Ross R, Topol EJ, eds. *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven Publishers; 1996:715-726.
- Grabowski EF, Herther KK, Didisheim P.** Human vs. dog platelet adhesion to cuprophane under controlled conditions of whole blood flow. *J Lab Med* 1976; 88:368-374.
- Guijarro C, Blanco-Colio LM, Ortego M, Alonso C, Ortiz A, Plaza JJ, Diaz C, Hernandez G, Egido J.** 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase and isoprenylation inhibitors induce apoptosis of vascular smooth muscle cells in culture. *Circ Res* 1998; 83:490-500.
- Guijarro C, Tuñón J, Bustos MA, Hernández-Presa MA, Ortego M, Plaza JJ, Egido J.** La formación de la placa aterosclerosa: un proceso inflamatorio y fibroproliferativo. *Clin Invest Arteriosclerosis* 1997; 9:3-14.
- Gulba DC, Barthels M, Westhoff-Bleck M, Jost S, Rafflenbeul W, Daniel WG, Hecker H, Lichtlen PR.** Increased thrombin levels during acute myocardial infarction. Relevance for the success of therapy. *Circulation* 1991; 83: 937-944.
- GUSTO IIa Investigators.** Randomized trial of intravenous heparin versus recombinant hirudin for acute coronary syndromes. *Circulation* 1994; 60:1631-1637.

-H-

- Hackett D, Davies G, Chierchia S, Maseri A.** Intermittent coronary occlusion in acute myocardial: value of combined thrombolytic and vasodilator therapy. *N Engl Med* 1987; 317:1055-1059.
- Hadjiisky P, Bourdillon MC, Grisgogeat Y.** Modèles expérimentaux d'athérosclérose. Apports, limites et perspectives. *Archives Mal Coeur* 1991; 84:1593-1603.
- Hall A.** Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* 1998; 279:509-514.

- Hamik K, Setiad H, Bu G, McEver RP, Morrissey JH.** Down-regulation of monocyte tissue factor mediated by tissue factor pathway inhibitor and the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem* 1999; 274:4962-4969.
- Han X, Girard T, Baum P, Abendschein D, Broze G.** Structural requirements for TFPI-mediated inhibition of neointimal thickening after balloon injury in the rat. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19:2563-2567.
- Hanson SR, Harker L.** Interruption of acute platelet-dependent thrombosis by the synthetic antithrombin D-phenylalanyl-L-prolyl-L-arginyl chloromethylketone. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85:3184-3188.
- Haria M, McTavish D.** Pravastatin: a reappraisal of its pharmacological properties and therapeutic use in the management of coronary Herat disease. *Drugs* 1997; 53:299-336.
- Harker L, Hanson SR, Kelly AB.** Antithrombotic strategies targeting thrombin activities, thrombin receptors and thrombin generation. *Thromb Haemostas* 1997; 78:736-741.
- Harker L, Hanson S, Wilcox J, Kelly AB.** Antithrombotic and antilesion benfits without hemorrhagic risks by inhibiting tissue factor pathway. *Haemostasis* 1996; 26:76-82.
- Harsch M, Braesen JH, Niendorf A.** Effects of low-dose pravastatin sodium on plasma cholesterol levels and aortic atherosclerosis of heterozygous WHHL rabbits fed a low cholesterol (0.03%) enriched diet for one year. *Atherosclerosis* 1997; 128:139-147.
- Hasler-Rapacz J , Kemppen HJ, Princen HMG, Kudchodkar BJ, Lacko A, Rapacz J.** Effects of simvastatin on plasma lipids and apolipoproteins in familial hypercholesterolemic swine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996; 16:137-143.
- Hasler-Rapacz J, Prescott MF, Von Lindel-Reed J, Rapacz JM Jr, Hu Z, Rapacz J.** Elevated concentrations of plasma lipids and apolipoproteins B, C-III, and E are associated with progression of coronary artery disease in familial hypercholesterolemic swine. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:583-592.
- Hawiger J.** Formation and regulation of platelet and fibrin hemostatic plug. *Hum Pathol* 1987; 18:111-122.
- Hawker RJ, Hawket LM, Wilkinson AR.** The use of Indium-111/oxine to label human platelets. *Lancet* 1978; 2:483.
- Heart Protection Study Collaborative Group.** MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2002; 360:7-22
- Heaton WA, Davis HH, Felch MJ, Mathias CJ, Joist JH, Sherman LH, Siegel BA.** Indium-111:a new radionuclide label for studying human platelet kinetics. *Br J Haematol* 1979; 42:613-622.
- Henry PD, Cabello OA, Chen CH.** Hypercholesterolemia and endothelial dysfunction. *Curr Opin Lipidol* 1995; 6:190-195.
- Hernández M, Fernández de Arriba A, Merlos M, Fuentes L, Sánchez-Crespo M, Nieto ML.** Effect of 4-trifluoromethyl derivatives of salicylate on nuclear factor κB-dependent transcription in human astrocytoma cells. *Brith J Pharmacol* 2001; 132:547-555.
- Hernández-Presa MA, Martín-Ventura JL, Ortego M, Gómez-Hernández A, Tuñón J, Hernández-Vargas P, Blanco-Colio LM, Mas S, Aparicio C, Ortega L, Vivanco F, Gómez Gerique J, Díaz C, Hernández G, Egido J.** Atorvastatin reduces the expression of cyclooxygenase-2 in a rabbit model of atherosclerosis in cultured vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 2002; 160:49-58.
- Herschman HR.** Prostaglandin synthase 2. *Biochim Biophys Acta* 1996; 1299:125-140.

Holmsem H. Metabolism of platelets. En: *Hematology*. Ed: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA. McGraw-Hill, New York 1990a. pp. 1200-1233.

Holmsem H. Metabolism of platelets. En: *Hematology*. Ed: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA. McGraw-Hill, New York 1990b. pp. 1182-1200.

Holmsen H, Weiss HJ. Secretable storage pools in platelets. *Ann Rev Med* 1979; 30: 119-134.

Holts J, Kristensen AT, Kristensen HI, Exban M, Hedner U. Local application of recombinant active site-inhibited human clotting factor VIIa reduces thrombus weight and improves patency in a rabbit venous thrombosis model. *Eur J Vasc Endvasc Surg* 1998; 15:515-520.

Hong BK, Kwon HM, Lee BK, Kim D, Kim IJ, Kang SM, Jang Y, Cho SH, Kim HK, Jang BC, Cho SY, Kim HS, Kim MS, Kwon HC, Lee N. Coexpression of cyclooxygenase-2 and matrix metalloproteinases in human aortic atherosclerotic lesions. *Yonsei Med J* 2000; 41:82-88.

Huang EM, Detwiler TC. Stimulus-response coupling mechanisms. In: Philips DR, Shuman MC, eds. *Biochemistry of Platelets*. New York: Academic Press; 1986; 1-68.

Huhle G, Abletshauser C, Mayer N, Weidinger G, Harenberg J, Heene DL. Reduction of platelet activity markers in type II hypercholesterolemic patients by a HMG-CoA-reductase inhibitor. *Thromb Res* 1999; 95:229-234.

Hunt BJ. The relation between abnormal hemostatic function and the progression of coronary disease. *Curr Opin Cardiol* 1990; 5:758-765.

-I-

Ignarro LJ. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1990; 30:535-560.

Ishida F, Waatabe K, Sato A, Taguchi D, Kakubari K, Kittani K, Kamei T. Comparative effects of simvastatin (MK-733) and pravastatin (CS-514) on hypercholesterolemia induced by cholesterol feeding in rabbits. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1042:365-373.

-J-

Jang Y, Guzman LA, Lincoff AM, Gottsauner-Wolf M, Forudi F, Hart CE, Courtman DW, Ezban M, Ellis SG, Topol EJ. Influence of blockade at specific levels of the coagulation cascade on restenosis in a rabbit model atherosclerotic femoral artery injury model. *Circulation* 1995; 92:3041-3050.

Johnson CI. Renin-angiotensin system: A dual tissue and hormonal system for cardiovascular control. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20:1-5.

Jones CJH, Kuo L, Davis MJ, DeFily DV, Chilian WM. Role of nitric oxide in coronary microvascular responses to adenosine and increased metabolic demand. *Circulation* 1995; 91: 1807-1813.

-K-

Kaibuchi K, Kuroda S, Amano M. Regulation of the cytoskeleton and cell adhesion by the Rho family GTPases in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 1999; 68:459-486.

- Kettner C, Shaw E.** Inactivation of trypsin-like enzymes with peptide of arginine chloromethyl ketone. *Methods Enzymol* 1981; 80 Pt C:826-842.
- Key NS, Slungaard A, Dandele L, Nelson SC, Moertel C, Styles LA, Kuypers FA, Bach RR.** Whole blood tissue factor procoagulant activity is elevated in patients with sickle cell disease. *Blood* 1998; 91:4216-4223.
- Kieffer N, Phillipis DR.** Platelet membrane glycoproteins: functions in cellular interactions. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6:329-357.
- Kim DN, Lee KT, Scheeme J, Thomas WA.** Quantification of intimal cell masses and atherosclerotic lesions in coronary arteries of control and hyperlipidemic swine. *Atherosclerosis* 1984; 52:115-122.
- Kirchhofer D, Tschopp TB, Baumgartner HR.** Active site-blocked factors VIIa and Ixa and IX differentially inhibit fibrin formation in a human ex vivo thrombosis model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1098-1106.
- Kjalke M, Olivier JA, Monroe DM, Hoffman M, Ezban M, Hedner U, Roberts HR.** The effects of active site-inhibited factor VIIa on tissue factor-initiated coagulation using platelets before and after aspirin administration. *Thromb Haemost* 1997; 78:1202-1208.
- Kloczewiack M, Timmons S, Lukas TJ, Hawiger J.** Platelet receptor recognition site on human fibrinogen. Synthesis and structure-function relationship of peptides corresponding to the carboxyterminal segment of the γ chain. *Biochemistry* 1984; 23:1767-1774.
- Knowles RG, Moncada S.** Nitric oxide synthase in mammals. *Biochem J* 1995; 298:249-258.
- Koh KK.** Effects of HMG-CoA reductase inhibitor on hemostasis. *Intern J Cardiol* 2000; 76:23-32.
- Kopp E, Ghosh S.** Inhibition of NF- κ B binding by sodium salicylate and aspirin. *Science* 1994; 265:956-959.
- Krishnaswamy S, Field KA, Eding ton TS, Morrissey JH, Mann KG.** Role of the membrane surface in the activation of human coagulation factor X. *J Biol Chem* 1992; 267:26110-26120.
- Kristensen AT, Kristensen HI, Ezban M.** Active site inhibited recombinant factor VIIa (FFR-rFVIIa) dose dependently inhibits thrombin generation in a whole vessel ex vivo model. *XVII Congress of the international Society of Thrombosis and Haemostasis*, Washington D.C. USA, August 14-21, 1999. Abstract.
- Kroll MH, Schafer AI.** Biochemical mechanisms of platelet activation. *Blood* 1989; 74:1181-1195.
- Kujubu DA, Herschman HR.** Dexamethasone inhibits mitogen induction of the TIS10 prostaglandin synthase /cyclooxygenase gene. *J Biol Chem* 1992; 267:7991-7994.
- Kureishi Y, Luo Z, Shiojima I, Bialik A, Fulton D, Lefer DJ, Sessa WC, Walsh K.** The HMG-CoA reductase inhibitor simvastatin activates the protein kinase Akt and promotes angiogenesis in normocholesterolemic animals. *Nat Med* 2000; 6:1004-1010.

-L-

- Lacoste L, Lam JYT, Hung J, Letchacovski, G, Solymoss CB, Waters D.** Hyperlipidemia and coronary disease. *Circulation* 1995; 92:3172-3177.
- Lacoste L, Lam JYT.** Comparative effect of pravastatin and simvastatin on platelet-thrombus formation in hypercholesterolemic coronary patients. *J Am Coll Cardiol* 1996; 36:413A. Abstract.

- Laemmli UK.** Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227:680-685.
- Lam JYT, Chesebro JH, Steele PM, Badimon L, Fuster V.** Is vasospasm related to platelet deposition? Relationship in a porcine preparation of arterial injury in vivo. *Circulation* 1987; 75:243-248.
- Lassila R, Badimon JJ, Vallbhajosula S, Badimon L.** Dynamic monitoring of platelet deposition on severely damaged vessel wall in flowing blood. Effects of different stenosis on thrombus growth. *Arteriosclerosis* 1990; 10:306-315.
- Laufs U, Gertz K, Huang P, Nickenig G, Böhm, Dirnagl U, Endres M.** Atorvastatin upregulates type III nitric oxide synthase in thrombocytes, decreases platelet activation, and protects from cerebral ischemia in normocholesterolemic mice. *Stroke* 2000; 31:2437-2449.
- Laufs U, La Fata V, Plutzky J, Liao JK.** Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG-CoA reductase inhibitors. *Circulation* 1998; 97:1129-1135.
- Laufs U, Liao J.** Direct vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Trends Cardiovasc Med* 2000; 10:143-148.
- Laufs U, Marra D, Node K, Liao JK.** 3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitors attenuate vascular smooth muscle proliferation by preventing rho GTPase-induced downregulation of p27 (Kip1). *J Biol Chem* 1999; 274:21926-21931.
- Lea AP, McTavish.** Atorvastatin: a review of its pharmacology and therapeutic potential in the management of hyperlipidaemias. *Drugs* 1997; 53:828-847.
- Lefler AM, Scalia R, Lefler D.** Vascular effects of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) unrelated to cholesterol lowering: new concepts for cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 2001; 49:281-287.
- Lev EI, Marmur JD, Zdravkovic M, Osende JJ, Robbins J, Delfin JA, Richard M, Erhardtson E, Thomsen MS, Lincoff AM, Badimon JJ.** Antithrombotic effect of tissue factor inhibition by inactivated factor VIIa. An ex vivo human study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1036-1041.
- Libby P.** Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420:868-874.
- Libby P, Ross R.** Cytokines and growth regulatory molecules in atherosclerosis. In: *Atherosclerosis and Coronary Artery Disease*; eds. Fuster V, Ross R, Topol EJ; ed. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia 1996; pp 585-594.
- Lijnen P, Echevaria-Vazquez D, Petrov V.** Influence of cholesterol lowering on plasma membrane lipids and function. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1996; 18:123-136.
- Lincoff AM.** First clinical investigation of a tissue-factor inhibitor administered during percutaneous coronary revascularization: a randomized, double-blinded, dose-escalation trial: assessing safety and efficacy of FFR-rFVIIa in percutaneous transluminal coronary angioplasty (ASIS) trial. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:312-313. Abstract.
- Lindahl AK, Wildgoose P, Lumsden AB, Allen R, Kelly AB, Harker LA, Hanson LA.** Active site-inhibited VIIa blocks tissue factor activity and prevents arterial thrombus formation in baboons (abstract). *Circulation* 1993; 88 (suppl)147.
- Lipid Research Clinics Program.** Manual of Laboratory Operation. DHEW Publ No NIH75-628. Washington DC. Mayo 1974, US Government Printing Office.
- Loscalzo J.** Lipoprotein(a): a unique risk factor for atherothrombotic disease. *Arteriosclerosis* 1990; 57:155-62.
- Loscalzo J, Welch G.** Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis* 1995; 38:87-104.

-LL-

Llorente-Cortes V, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Esterified cholesterol accumulation induced by aggregated LDL uptake in human vascular smooth muscle cells is reduced by HMG-CoA reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998;18:738-46.

Llorente-Cortes V, Otero-Vinas M, Hurt-Camejo E, Martinez-Gonzalez J, Badimon L. Human coronary smooth muscle cells internalize versican-modified LDL through LDL receptor-related protein and LDL receptors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:387-93.

-M-

MAAS investigators. Effect of simvastatin on coronary atheroma: the Multicentre Anti-Atheroma Study (MAAS). *Lancet* 1994; 344:633-638.

Mackay JG, Halls A. Rho GTPases. *J Biol Chem* 1998; 273:20685-20688.

Mailhac A, Badimon JJ, Lassila R, Heras M, Chesebro JH, Fuster V, Badimon L. Effect of an eccentric severe stenosis on fibrin(ogen) deposition on severely damaged vessel wall in arterial thrombosis. Relative contribution of fibrin(ogen) and platelets. *Circulacion* 1994; 90:988-996.

Malek AM, Alper SI, Izummo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA* 1999; 282:2035-2042.

Malinov MR, Maruffo CA. Aortic atherosclerosis in free-ranging howler monkeys. *Nature* 1965; 206: 948-949.

Mallat Z, Hugel B, Ohan J, Leseche G, Freyssenet J, Tedgui A. Shed membrane microparticles with procoagulant potential in human atherosclerotic plaques: A role for apoptosis in plaque thrombogenicity. *Circulation* 1999; 99:348-353.

Mann KG. Membrane-bound enzyme complexes in blood coagulation. *Prog Hemost Thromb* 1984; 7:1-23.

Marcus A, Safier LB. Thromboregulation: Multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. *FASEB J* 1993; 7:516-522.

Marmur JD, Rossikhina M, Guha A, Fyfe B, Friedrich V, Mendlowitz M, Nemerson Y, Taubman MB. Tissue factor is rapidly induced in arterial smooth muscle after balloon injury. *J Clin Invest* 1993; 91:2253-2259.

Martínez-González J, Alfon J, Berrozpe M, Badimon L. HMG-CoA reductase reduce vascular monocyte chemotactic protein-1 expression in early lesions from hypercholesterolemic swine independently of their effect on plasma cholesterol levels. *Atherosclerosis* 2001a; 159:27-33.

Martinez-Gonzalez J, Berrozpe M, Varela O, Badimon L. Heterogeneity of smooth muscle cells in advanced human atherosclerotic plaques: intimal smooth muscle cells expressing a fibroblast surface protein are highly activated by platelet-released products. *Eur J Clin Invest* 2001b; 31:939-949.

Martinez-Gonzalez J, Raposo B, Rodriguez C, Badimon L. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme a reductase inhibition prevents endothelial NO synthase downregulation by atherogenic levels of native LDLs: balance between transcriptional and posttranscriptional regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001c; 21:804-9.

- Martinez-Gonzalez J, Badimon L.** Human and porcine smooth muscle cells share similar proliferation dependence on the mevalonate pathway: implication for in vivo interventions in the porcine model. *Eur J Clin Invest* 1996; 26:1023-1032.
- Mayer B, John M, Heinzl B, Werner ER, Wachter H, Schultz G, Böhme E.** Brain nitric oxide synthase is a biopterin-and flavin-containing multi-functional oxido-redutase. *FEBS Lett* 1991; 288:187-191.
- Maynard JR, Dreyer BE, Stemerman MB, Pitlick FA.** Tissue factor coagulation activity of cultured human endothelial and smooth muscle cells and fibroblasts. *Blood* 1977; 50:387-396.
- McAdam BF, Catella-Lawson F, Mardini IA, Kapoor S, Lawson JA, FitzGerald GA.** Systemic biosynthesis of prostacyclin by cyclooxygenase (COX)-2: the human pharmacology of a selective inhibitor of COX-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:272-277.
- McGeer P, McGeer EG, Yasojima K.** Expression of COX-1 and COX-2 mRNAs in atherosclerosis plaques. *Exp Geront* 2002; 37:925-929.
- McLean JW, Tomlinson JE, Kuang WJ, Eaton DL, Chen EY, Fless GM, Scanu AM, Lawn RM.** cDNA sequence of human apolipoprotein (a) is homologous to plasminogen. *Nature* 1987; 330:132-137.
- McNeely W, Goa KL.** Triflusal. *Drugs* 1998; 55: 823-833.
- Meade TW, Mellows S, Brozovic M, Miller GJ, Chakrabarti RR, North WR, Haines AP, Stirling Y, Imeson JD, Thompson SG.** Haemostatic function and ischaemic hearth disease: principal results of the Northwick Park Hearth Study. *Lancet* 1986; 2:533-537.
- Meyer BJ, Badimon JJ, Mailhac A, Fernández-Ortiz A, Chesebro J, Fuster V, Badimon L.** Inhibition of Growth of Thrombus on Fresh Mural Thrombus. Targeting Optimal Therapy. *Circulation* 1994; 90:2432-2438.
- Meyer BJ, Badimon JJ, Mailhac A, Chesebro J, Fallon J, Fuster V, Badimon L.** Dissolution of mural thrombus by specific thrombin inhibition with r-Hirudin. Comparison with heparin and aspirin. *Circulation* 1998; 97:681-685.
- Mitchell JA, Sunders M, Barnes PJ, Newton R, Belvisi MG.** Sodium salicylate inhibits cyclooxygenase-2 activity independently of transcription factor (nuclear factor- κ B) activation: Role of arachidonic acid. *Mol Pharmacol* 1997. 51:907-912.
- Miura H, Wachtel RE, Liu Y, Loberiza FR Jr, Saito T, Miura M, Gutterman DD.** Flow-induced dilation of human coronary arterioles: Important role of Ca(2+)-activated K(+) channels. *Circulation* 2001; 103:1992-1998.
- Miyazaki A, Koga T.** Pravastatin sodium, an inhibitor of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase, decreases serum total cholesterol in Japanese White rabbits by two different mechanisms. *Atherosclerosis* 2002; 162:299-306.
- Mohri H, Ohkubo T.** Single-dose of enteric-coated aspirin on platelet function and thromboxane generation in middle-aged men. *Ann Pharmacother* 1993; 27:405-410.
- Moncada S, Gryglewski R, Bunting S, Vane JR.** An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelets aggregation. *Nature* 1976; 263:663-665.
- Moncada S, Higgs EA.** Molecular mechanism and therapeutic strategies related to nitric oxide. *FASEB J* 1995; 9:1319-1330.
- Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA.** Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-142.

Moncada S, Vane JR. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. *Pharmacol Rev* 1979; 30:293-331.

Monroe DM, Roberts H, Hoffman M. Platelet procoagulant assembly in a tissue factor-initiated system. *Br J Haematol* 1994; 88:364-371.

Morii N, Teru-uchi T, Tominaga T, Kumagai N, Kozaki S, Ushikubi F, Narumiya S. A rho gene product in human blood platelets. II. Effects of the ADP-ribosylation by botulinum C3 ADP-ribosyltransferase on platelet aggregation. *J Biol Chem* 1992; 267:20921-20926.

Muggli R, Baumgartner HR, Tschopp TB, Keller H. Automated microdensitometry and protein assays as a measure for platelet adhesion and aggregation on collagen-coated slides under controlled flow conditions. *J Lab Clin Med* 1980; 95:195-207.

Murakami T, Yamada N. Modification of macrophage function and effects on atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7:320-323.

-N-

Nakamura CE, Abeles RH. Mode of interaction of β -hydroxy- β -methylglutaryl coenzyme A reductase with strong binding inhibitors: Compactin and related compounds. *Biochemistry* 1985; 24:1364-1376.

Nathan C, Xie QW. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J Biol Chem* 1994; 269:13725-13728.

Nemerson Y. Mechanism of coagulation. In: Williams WJ, Beutler E, Erslev AJ, Lichtman MA, eds. *Hematology*. New York: McGraw-Hill: 1990; 1295-1304.

Nemerson Y. Tissue factor and hemostasis. *Blood* 1988; 71:1-8.

Nivelstein PFEM, Fogelman AM, Mottino G, Frank J. An ultrastructural study of lipoprotein accumulation in cardiac valves of the rabbit. *Arterioscler Thromb* 1994; 14:1151-1161.

Nofer JR, Tepel M, Kehrel B, Wierwille S, Walter M, Seedorf U, Zidek W, Assmann G. Low-density lipoproteins inhibit the Na⁺, H⁺ antiport in human platelets. A novel mechanism enhancing platelet activity in hypercholesterolemia. *Circulation* 1997; 95:1370-1377.

Notarbartolo A, Davi G, Averna M, Barbagallo CM, Ganci A, Giammarresi C, La Placa FP, Patrono C. Inhibition of thromboxane biosynthesis and platelet function by simvastatin in type IIa hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb* 1995; 14:1151-1161.

-O-

Olofsson BO, Dahlen G, Nilsson TK. Evidence for increased levels of plasminogen activator in plasma of patients with angiographically verified coronary artery disease. *Eur Heart J* 1989; 10:77-82.

Okajima F, Ui M. ADP-ribosylation of the specific membrane protein by islet-activating protein, pertussis toxin, associated with inhibition of a chemotactic peptide-induced arachidonate release in neutrophils. *J Biol Chem* 1984; 259:13863-13871.

O'Neill GP, Ford-Hutchinson AW. Expression of mRNA for cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human tissues. *FEBS Lett* 1993; 330:156-160.

Opper C, Clement C, Schwarz H, Krappe J, Steinmetz A, Schneider J, Wesemann W. Increased number of high sensitive platelets in hypercholesterolemia, cardiovascular diseases, and after incubation with cholesterol. *Atherosclerosis* 1995; 113:211-217.

Ortego M, Bustos C, Hernández-Presa MA, Tunon J, Díaz C, Hernández G, Egido J. Atorvastatin reduces NF-kappa B activation and chemokine expression in vascular smooth muscle cells and mononuclear cells. *Atherosclerosis* 1999; 147:253-261.

Oshamah H, Mira R, Sorina S, Sholomo K, Michael A. Reduced platelet aggregation after fluvastatin therapy is associated with altered platelet lipid composition and drug binding to the platelets. *Br J Clin Pharmacol* 1997; 44:77-83.

Osterud B. Factor VIII and hemostasis. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1990; 1:175-181.

O'Sullivan MG, Huggins EM Jr, McCall CE. LPS-induced expression of prostaglandin H synthase-2 in alveolar macrophages is inhibited by dexamethasone but not aspirin. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 191:1294-3000.

Owens MR, Cumino CD. The inhibitory effects of sodium salicylate on synthesis of factor VII by the perfused rat liver. *Thromb Res* 1980; 18:839-845.

-P-

Pairet M, Engelhardt G. Distinct isoforms (Cox-1 and Cox-2) of cyclooxygenase: possible physiological and therapeutic implications. *Fundam Clin Pharmacol* 1996; 10:1-15.

Paramo JA, Colucci M, Collen D. Plasminogen activator inhibitor in blood of patients with coronary artery disease. *Br Med J* 1985; 291: 573-574.

Parthasarthy S, Barnett J, Fong LG. High density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low-density lipoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1990; 1044:275-283.

Patrono C. Aspirin: new cardiovascular uses for an old drug. *Am J Med* 2001; 110:62-65.

Pawashe AB, Golino P, Ambrosio G, Migliaccio F, Ragni M, Pascucci I, Chiarello M, Bach R, Garen A, Konigsberg WK. A monoclonal antibody against rabbit tissue factor inhibits thrombus formation in stenotic injured rabbit carotid arteries. *Circ Res* 1994; 74:56-63

Pendurthi UR, Alok D, Rao LV. Binding of factor VIIa to tissue factor induces alteration in gene expression in human fibroblast cells: up-regulation of poly(A) polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; 94:12598-12603.

Peerschke EIB. The platelet fibrinogen receptor. *Semin Hematol* 1985; 22:241-249.

Pollock JS, Försterman U, Mitchell JA, Warner TD, Schmidt HHHW, Nakane N, Murad F. Purification and characterization of particulate endothelium-derived relaxing factor synthase from cultured and native bovine aortic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:10480-10484.

Pomerantz BK, Summers B, Hajjar PD. Eicosanoid metabolism in cholesterol-enriched arterial smooth muscle cells. Evidence for reduced posttranscriptional processing of cyclooxygenase I and reduced cyclooxygenase II gene expression. *Biochemistry* 1993; 32:13624-13635.

Poulsen LK, Jacobsen N, Sorensen BB, Bergenhem NC, Kelly JD, Foster DC, Thastrup O, Ezban M, Petersen LC. Signal transduction via the mitogen-activated protein kinase pathway induced by binding of coagulation factor VIIa to tissue factor. *J Biol Chem* 1998; 273:6228-6232.

Preston FE, Whipps S, Jackson CA, French AJ, Wyld PJ, Stoddard CJ. Inhibition of prostacyclin and platelet thromboxane A2 after low-dose aspirin. *N Engl J Med* 1981; 304:76-79.

Pueyo Palazón C, Alfón J, Gaffney P, Berrozpe M, Royo T, Badimon L. Effects of reducing LDL and increasing HDL with Gemfibrozil in experimental coronary lesion development and thrombotic risk. *Atherosclerosis* 1998; 136:333-345.

-R-

Ragni M, Cirillo P, Pascucci I, Scognamiglio A, D'Andrea, Eramo N, Ezekomitz MD, Pawashe AB, Chiariello M, Golino P. Monoclonal antibody against tissue factor shortens tissue plasminogen activator lysis time and prevents reocclusion in a rabbit model of carotid artery thrombosis. *Circulation* 1996; 93:1913-1918.

Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, Berniler JA, Navab M, Fogelman AM, Lusis AJ. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low density lipoproteins. *Nature* 1990; 344:254-257.

Rao L, Ezban M. Active site-blocked activated factor VII as an effective antithrombotic agent: mechanism of action. *Blood Coagulation and Fibrinolysis* 2000, 11:135-143.

Rappaport SI, Rao L. The tissue factor pathway: how it has become a "prima ballerina". *Thromb Haemost* 1995; 74:7-17.

Rauch U, Osende JO, Chesebro JH, Fuster V, Vorchheimer DA, Harris K, Harris P, Sandler DA, Fallon JT, Jayaraman Ss, Badimon JJ. Statins and cardiovascular diseases: the multiple effects of lipid-lowering therapy by statins. *Atherosclerosis* 2000; 153:181-189.

Read MS, Smith SV, Lamb MA, Brinkhous KM. Role of botrocetin in platelet agglutination: formation of an activated complex. *Blood* 1989; 74:1031-1035.

Richarson PD, Davies MJ, Born GVR. Influence of plaque configuration and stress distribution on fissuring of coronary atherosclerotic plaques. *Lancet* 1989; 2:941-944.

Rikitake Y, Kawashima S, Takeshita S, Yamashita T, Azumi H, Yasumara M, Nishi H, Inoue N, Yokoyama M. Anti-oxidative properties of fluvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, contribute to prevention of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 2001; 154:87-96.

Rollins BJ. JE/MCP-1: an early-response gene encodes a monocyte-specific cytokine. *Cancer Cells* 1991; 3:517-524.

Rosenson RS, Lowe GDO. Effects of lipids and lipoproteins on thrombosis and rheology. *Atherosclerosis* 1998; 140: 271-280.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: perspective for the 1990's. *Nature* 1993; 362:801-809.

Ross R. Atherosclerosis: An inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-126.

Roth BD, Bocan TMA, Blankley CJ, Chucholowski AW, Creger PL, Creswell MW, Ferguson E, Newton RS, O'Brien P, Picard JA, Roark WH, Sekerke CS, Slislovic DR, Wilson MW. Relationship between tissue selectivity and lipophilicity for inhibitors of HMG-CoA reductase. *J Med Chem* 1991; 34:463-466.

Roth GJ, Majerus. The mechanism of the effect of aspirin on human platelets. I, acetylation of a particulate fraction protein. *J Clin Invest* 1975; 44:669-694.

Roth GJ, Calverly DC. Aspirin, platelets and thrombosis. Theory and practise. *Blood* 1994; 83:885-98.

Rottingen JA, Enden T, Camerer E, Inversen JG, Prydz H. Binding of human factor VIIa to tissue factor induces cytosolic Ca²⁺ signals in J82 cells, transfected COS-1 cells, Madin-Darby canine kidney cells and in human endothelial cells induced to synthesize tissue factor. *J Biol Chem* 1995; 270:4650-4660.

Royo T, Alfon J, Berrozpe M, Badimon L. Effect of gemfibrozil on peripheral atherosclerosis and platelet activation in a pig model of hyperlipidemia. *Eur J Clin Invest* 2000; 30:843-852.

Rowland M, Riegelman S, Harris PA, Sholkoff SB. Absorption kinetics of aspirin in man following oral administration of an aqueous solution. *J Pharm Sci* 1972; 61:379-385.

-S-

Sacks FM, Pfeffer MA, Moya LA, Rouleau JL, Ruthford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JMO, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. *N Engl J Med* 1996; 335:1000-1009.

Sakariassen KS, Bolhuis PA, Sixma JJ. Human blood platelet adhesion to artery subendothelium is mediated by factor VII-von Willebrand factor bound to the subendothelium. *Nature* 1979; 279:636-638.

Sakariassen KS, Nievelstein PF, Collier BS, Sixma JJ. The role of platelet membrane glycoproteins Ib and IIb-IIIa in platelet adherence to human artery subendothelium. *Brit J Haematol* 1986; 63:681-691.

Sakon M, Kambayashi JI, Murata KH. The involvement of protein phosphatases in platelet activation. *Platelets* 1994; 5:130-134.

Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomized trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: the Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 1994; 344:1383-1389.

Schecter AD, Spirn B, Rossikhina M, Giesen PL, Bogdanov V, Fallon JT, Fisher EA, Schnapp LM, Nemerson Y, Taubman MB. Release of active tissue factor by human arterial smooth muscle cells. *Circ Res* 2000; 87:126-132.

Schoenwaelder SM, Hughans SC, Boniface K, Fernando S, Holdsworth M, Thompson PE, Salem HH, Jackson SP. Rho A sustains integrin $\alpha_{IIb}\beta_3$ adhesion contacts under high shear. *J Biol Chem* 2002; 277:14738-14746.

Schwartz GG, Olsson AG, Ezekowitz MD, Ganz P, Oliver MF, Waters D, Zeiher A, Chaitman BR, Leslie S, Stern T; Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study Investigators. Effects of atorvastatin on early recurrent ischemic events in acute coronary syndromes: the MIRACL study: a randomized controlled trial. *JAMA* 2001; 285:1711-1718.

Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, Isles CG, Lorimer AR, MacFarlane PW, McKillop JH, Packard J. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland coronary prevention study group. *N Engl J Med* 1995; 333:2419-2425.

Schönbeck U, Sukhova G, Graber P, Coulter S, Libby P. Augmented expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic lesions. *Am J Pathol* 1999; 155:1281-1291.

Schor K. Platelet reactivity and arachidonic acid metabolism in type II hyperlipoproteinaemia and its modification by cholesterol-lowering agents. *Eicosanoids* 1990; 3:67-73.

Sever PS, Dahlof B, Poulter NR, Wedel H, Beevers G, Caulfield M, Collins R, Kjeldsen SE, Kristinsson A, McInnes GT, Mehlsen J, Nieminen M, O'Brien E, Ostergren J; ASCOT investigators. Prevention of coronary and stroke events with atorvastatin in hypertensive patients who have average or lower-than-average cholesterol concentrations, in the Anglo-Scandinavian Cardiac Outcomes Trial--Lipid Lowering Arm (ASCOT-LLA): a multicentre randomised controlled trial. *Lancet* 2003; 361:1149-1158.

Shiomi M, Ito T, Tsukada T, Yata T, Watanabee Y, Tsujita Y, Fukami M, Fukushima J, Hosokawa T, Tamura A. Reduction of serum cholesterol levels alters lesion composition of atherosclerotic plaques. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:1938-1944.

Simmons DL, Levy DB, Yannoni Y, Erikson RL. Identification of aphorbol ester-repressible *v-src*-inducible gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:1178-1182.

- Simon L.** Role and regulation of cyclooxygenase-2 during inflammation. *Am J Med* 1999; 106:37-42.
- Smith A, Bruton J.** Atlas a color de técnicas de coloración histológicas. *Year Book Medical Publishing*, Chicago, 1997.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC.** Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal Biochem* 1985; 150:76-85.
- Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL.** Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996; 271:8089-8094.
- Soma MR, Donetti E, Parolini C, Mazzini G, Ferrari C, Fumagalli R, Paoletti R.** HMG CoA reductase inhibitors: in vivo effects on carotid intimal thickening in normocholesterolemic rabbits. *Arterioscler Thromb* 1993; 13:571-578.
- Sorensen BB, Persson E, Freskgard PO, Kjalke M, Ezban M, Williams T, Rao LVM.** Incorporation of an active site-inhibitor in factor VIIa alters the affinity for tissue factor. *J Biol Chem* 1997; 272:11863-11868.
- Sorensen BB, Rao L.** Interaction of factor VII and active site-inhibited factor VIIa with tissue factor. *Blood Coagul Fibrinolysis* 1998; 9:67-71.
- Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfield ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW.** A definition of initial, fatty streak and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation* 1994; 89:2462-2478.
- Stary H.** Evolution and progression of atherosclerotic lesions in coronary arteries of children and young adults. *Arteriosclerosis* 1989; 9:1-19.
- Steinberg D.** Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 1997; 272:20963-20966.
- Stein B, Fuster V, Israel DH, Cohen M, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH.** Platelet inhibitor drugs in cardiovascular disease: an update. En: *An Era in Cardiovascular Medicine*. Eds: Knowbel SZ, Kack S. *American College of Cardiology, Elsevier* 1991, pp 129-133.
- Steele PM, Chesebro JH, Stanson AW, Holmes DR Jr, Dewanjee MK, Badimon L, Fuster V.** Ballon angioplasty. Natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model. *Circ Res* 1985; 57:105-112.
- Stemme V, Swedenborg J, Claesson H, Hansson GK.** Expression of cyclo-oxygenase-2 in human atherosclerotic carotid arteries. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 2000; 20:146-152.
- Stuart MT, Gerrard JM, White JG.** Effect of cholesterol on production of thromboxane B₂ by platelets in vitro. *N Engl J Med* 1980; 302:6-10.
- Stuehr DJ, Cho HJ, Kwon NS, Weise MF, Nathan CF.** Purification and characterization of the cytokine-induced macrophage nitric oxide synthase: an FAD-and FMN-containing flavoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:7773-7778.
- Suefuji H, Ogawa H, Yasue H, Kaikita K, Soejima H, Motoyama T, Mizuno Y, Oshima S, Saito T, Tsuji I, Kumeda K, Kamikubo Y, Nakamura S.** Increased plasma tissue factor levels in acute myocardial infarction. *Am Heart J* 1997; 134:253-259.
- Szczeklik A, Musial J, Undas A, Gajewski P, Gora P, Swadzba J, Jankowski M.** Inhibition of thrombin generation by simvastatin and lack of additive effects of aspirin in patients with marked hypercholesterolemia. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33:1286-1293.

-T-

Takemoto M, Liao J. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:1712-1719.

Tanner FC, Noll G, Boulanger CM, Lüscher TF. Oxidized low density lipoproteins inhibit relaxations of porcine coronary arteries. Role of scavenger receptor and endothelium-derived nitric oxide. *Circulation* 1991; 83:2012-2020.

Thakur ML, Segal AW, Louis L, Welch MJ, Hopkins J, Peters TJ. Indium-111 labeled cellular blood components: mechanism of labeling and intracellular location in human neutrophils. *J Nucl Med* 1977; 18:1022-1026.

The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range or initial cholesterol levels. *N Engl J Med* 1998; 339:1449-1357.

Thompson SG, Kienast J, Pyke SD, Haverkate F, van de Loo JC. Hemostatic factors and the risk of myocardial infarction or sudden death in patients with angina pectoris. European Concerted Action on Thrombosis and Disabilities Angina Pectoris Study Group. *N Engl J Med* 1995; 332: 635-641.

Topol EJ, Bonan R, Jewitt D, Sigwart U, Kakkar VV, Rothman M, de Bono D, Ferguson J, Willerson JT, Strony J. Use of a direct antithrombin, hirulog, in place of heparin during coronary angioplasty. *Circulation* 1993; 87:1622-1629.

Toschi V, Gallo R, Lettino M, Fallon JT, Gaaert SD, Fernández-Ortiz A, Chesebro JH, Badimon L, Nemerson Y, Fuster V, Badimon JJ. Tissue factor modulates the thrombogenicity of human atherosclerotic plaques. *Circulation* 1997; 95:594-599.

Traub O, Berk BC. Laminar shear stress: Mechanisms by which endothelial cells transduce an atheroprotective force. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18:677-685.

Turitto VT, Weiss HJ. Red blood cells: Their dual role in thrombus formation. *Science* 1980;207:541-543.

Turpie AGG, Weits JI, Hirsh J. Advances in antithrombotic therapy: novel agents. *Thromb Res* 1995; 74:365-371.

Twbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci* 1979; 76:43-50.

-U-

Undas A, Brummel KE, Musial J, Mann GK, Szczeklik A. Simvastatin depresses blood clotting by inhibiting activation of prothrombin, factor V, and factor XIII and by enhancing factor Va inactivation. *Circulation* 2001; 103:2248-2253.

-V-

Valente AJ, Rozek MM, Sprague EA, Schwartz CJ. Mechanisms in intimal monocyte-macrophage recruitment. A special role for monocyte chemoattractant protein-1. *Circulation* 1992; 86:20-25.

Van AL, D'Souza-Schorey C. RhoGTPases and signaling networks. *Genes Dev* 1997; 11:2295-2322.

Van Lierde J, De Geest H, Verstraete M, Van de Werf F. Angiographic assessment of the infarct-related residual coronary stenosis after spontaneous or therapeutic thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 1990; 16:1545-1549.

Vane JR, Anggård EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990; 323:27-36.

Vanhoutte PM. Endothelium dysfunction and atherosclerosis. *Eur Heart J* 1997; 18: 19-29.

Varela O, Martínez-Gonzalez J, Badimon L. The response of smooth muscle cells to alpha-thrombin depends on its arterial origin: comparison among different species. *Eur J Clin Invest* 1998; 28:313-323.

Vaughan CJ, Gotto AMJ, Basson CT. The evolving role of statins in the management of atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol* 2000; 35:1-10.

Verbeuren TJ, Jordaens FH, Zonnekeyn LL, Van Hove CE, Coene M-C, Herman AG. Effect of hypercholesterolemia on vascular reactivity in the rabbit. *Circ Res* 1986; 58:552-554.

Verstraete M. Pharmacological aspects of unfractionated and low weight heparins. *Drugs* 1990; 40:498-530.

Vial JH, McLeod LJ, Roberts MS, Seville PR. Selective inhibition of platelet cyclooxygenase with controlled released, low-dose aspirin. *Aust N Z J Med* 1990; 20:652-656.

Vidal F, Colome C, Martínez-González J, Badimon L. Atherogenic concentrations of native low-density lipoproteins down-regulate nitric-oxide synthase RNA and protein levels in endothelial cells. *Eur J Biochem* 1998; 252:378-384.

Viñals M, Martínez-González J, Badimon JJ, Badimon L. HDL-induced prostacyclin release in smooth muscle cells is dependent on cyclooxygenase-2 (Cox-2). *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:3481-3488.

Vora DK, Fang ZT, Parhami F, Fogelman AM, Territo MC, Berliner JA. P-selectin induction by MM-LDL and its expression in human atherosclerotic lesions. *Circulation* 1994; 90:Y-83. Abstract.

-W-

Wallace JL. Distribution and expression of cyclooxygenase (COX) isoenzymes, their physiological roles, and the categorization of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Am J Med* 1999; 107:11-16.

Weibler BJ, Forström L, Mc Cullouch J. Studies of the kinetics of Indium-111 labeled granulocytes. *J Lab Clin Med* 1979; 94:246-255.

Weiss HJ, Turitto VT, Baumgartner HR. Effect of shear rate on platelet interaction with subendothelium in citrated and native blood. I. Shear rate-dependent decrease of adhesion in von Willebrand's disease and the Bernard-Soulier syndrome. *J Lab Clin Med* 1973; 5:167-179.

Weitz JI, Hudoba M, Massel D, Maragamore J, Hirsh J. Clot-bound thrombin is protected from inhibition by heparin-antithrombin III but is susceptible to inactivation by antithrombin III-independent inhibitors. *J Clin Invest* 1990; 86:385-391.

Werner MH, Senzel L, Bielawska A, Khan W, Hannun YA. Diacylglycerol overcomes aspirin inhibition of platelets: evidence for a necessary role for diacylglycerol accumulation in platelet activation. *Mol Pharmacol* 1991; 39:547-556.

Werner N, Nickening G, Laufs U. Pleiotropic effects of HMG-CoA reductase inhibitors. *Basic Res Cardiol* 2001; 97:105-116.

Wesselsch R, Likert K, Girard T, Wun TC, Broze GJ. Tissue factor pathway inhibitor: The carboxy-terminus is required for optimal inhibition of factor Xa. *Blood* 1992; 79:2004-2010.

West of Scotland Coronary Prevention Study Group. Influence of pravastatin and plasma lipids on clinical events in the West of Scotland coronary preventive study (WOSCOPS). *Circulation* 1998; 97:1440-1445.

White CR, Brock TA, Chang LY, Crapo J, Briscoe P, Ku D, Brandley WA, Gianturco SH, Gore J, Freeman BA, Tarpey MM. Superoxide and peroxynitrite in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:1044-1048.

Williams CS, Dubois RN. Prostaglandin endoperoxide synthase: Why two isoforms. *Am J Physiol* 1996; 270:393-400.

Williams JK, Sukhova GK, Herrington DM, Lubby P. Pravastatin has cholesterol-lowering independent effects on the artery wall of atherosclerotic monkeys. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31:684-691.

Winniford MD, Wheelan KR, Kremers MS, Ugolini V, van den Berg E Jr, Niggemann EH, Jansen DE, Hillis LD. Smoking induced coronary vasoconstriction in patients with atherosclerotic coronary artery disease: evidence for adrenergically mediated alterations in coronary artery tone. *Circulation* 1986; 73:662-667.

Wong E, Huang J, Tagari P, Riendeau D. Effects of Cox-2 inhibitors on aortic prostacyclin production in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 2001; 157:393-402.

Wu KK. Cyclooxygenase 2 induction: molecular mechanisms and pathophysiologic roles. *J Lab Clin Med* 1996; 128:242-245.

Wu KK. Inducible cyclooxygenase and nitric oxide synthase. *Adv Pharmacol* 1995; 33:170-207.

Wu KK, Sanduja R, Tsai AL, Ferhanoglu B, Loose-Mitchell DS. Aspirin inhibits interleukin 1-induced prostaglandin H synthase expression in cultured endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2384-2387.

-X-

Xu XM, Sansores-García L, Chen XM, Matijevic-Aleksic N, Du M, Wu KK. Suppression of inducible cyclooxygenase 2 gene transcription by aspirin and sodium salicylate. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 297:5292-5297.

-Y-

Yap CL, Hughan SC, Cranmer SL, Nesbitt WS, Rooney MM, Giuliano S, Kulkarni S, Doppeide SM, Yuan Y, Salem HH, Jackson SP. Synergistic adhesive interactions and signaling mechanisms operating between platelet glycoprotein Ib/IX and integrin alpha IIb beta 3. Studies in human platelets and transfected Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 2000; 275:41377-41388.

Ylä-Herttua S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Särkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:5252-5256.

Yu X, Graves DT, Zhang L, Antoniadis HN, Hollander W, Prusty S, Valente AJ, Schwartz CJ, Sonenshein GE. Elevated expression of monocyte chemoattractant protein 1 by vascular smooth muscle cells in hypercholesterolemic primates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:6953-6957.

-Z-

Zarins CK, Giddens DP, Bharadvaj BK. Carotid bifurcation atherosclerosis. Quantitative correlation of plaque localization with flow velocity profiles and wall shear stress. *Circ Res* 1983; 53:502-514.

Zeldis SM, Nemerson Y, Pitlick FA, Lentz TL. Tissue factor (thromboplastin): localization to plasma membranes by peroxidase-conjugated antibodies. *Science* 1972; 175:766-768.

Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science* 1992; 258:468-471.

Zimmermann KC, Sarbia M, Schror K, Weber AA. Constitutive cyclooxygenase-2 expression in human and rabbit gastric mucosa. *Mol Pharmacol* 1998; 54:536-540.

